

**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
AGROPECUARIAS Y FORESTALES**

PROGRAMA INSITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



**ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE *MICROPTERUS*
SALMOIDES EN EMBALSES INTERIORES DE TAMAULIPAS**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MVZ. SARA PATRICIA CHAGOLLA MORALES

Septiembre, 2014

Morelia, Michoacán



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS Y FORESTALES

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE *MICROPTERUS SALMOIDES* EN EMBALSES INTERIORES DE TAMAULIPAS

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MVZ. SARA PATRICIA CHAGOLLA MORALES

ASESORES:

DR. JOSÉ HERRERA CAMACHO

IIAF-UMSNH

DRA. ALEJANDRA SOBERANO MARTÍNEZ

IIAF-UMSNH

MC. ANTONIO GARCÍA VALLADARES

FMVZ-UMSNH

DR. GASPAR MANUEL PARRA BRACAMONTE

CBG-IPN

MC. WILLIAMS ARELLANO VERA

CBG-IPN

(

Septiembre, 2014

Morelia, Michoacán

AGRADECIMIENTOS

A mi esposo e hijas, por ser el motor en mi vida.

A mis padres, hermanos, suegros, cuñadas, sobrinos, por su apoyo incondicional, porque sin su ayuda jamás podríamos haber realizado este sueño.

A Paz y mis hermanos de fe, por su apoyo y amistad.

A mis amigas, por siempre estar y tener una palabra de aliento.

A mis compañeros y amigos de Reynosa, por su paciencia, asesorías, apoyo y siempre hacerme sentir como en casa.

A mis asesores, por su paciencia.

Al Dr. Herrera, por su asesoría, apoyo, guía y comprensión.

A CONACYT por otorgarme la beca para realizar la maestría.

DEDICATORIA

“A DIOS, gracias Padre por permitirme vivir esta experiencia y nunca haberme abandonado.”

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Generalidades <i>Micropterus salmoides</i> | 2 |
| 1.2 Ubicación Taxonómica | 4 |
| 1.3 Biodiversidad y estructura genética..... | 5 |
| 1.4 Marcadores moleculares para la determinación de la variabilidad genética | 7 |
| 1.5 Los SSR (Secuencias Repetidas Cortas) o Microsatélites | 9 |
| 1.6 Estudios genéticos realizados en <i>Micropterus salmoides</i> | 11 |
| 2. JUSTIFICACIÓN | 12 |
| 3. HIPÓTESIS | 13 |
| 4. OBJETIVOS | 13 |
| 4.1 OBJETIVO GENERAL..... | 13 |
| 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:..... | 13 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS | 14 |
| 5.1 Descripción del área de estudio | 14 |
| 5.1.1 Presa Derivadora Las Blancas | 14 |
| 5.1.2 Presa Marte R. Gómez..... | 15 |
| 5.2 Material Biológico | 15 |
| 5.3 Extracción de ADN | 15 |
| 5.4 Cuantificación de ADN..... | 16 |
| 5.5 Banco de Diluciones | 16 |
| 5.6 Marcadores Microsatélite | 16 |
| 5.6.1 Amplificación de ADN..... | 17 |
| 5.6.2 Separación de fragmentos | 18 |
| 5.6.3 Asignación de genotipos..... | 18 |
| 5.7 Análisis genéticos de las poblaciones de <i>Micropterus salmoides</i> | 18 |
| 5.7.1 Variabilidad genética..... | 18 |
| 5.7.2 Análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg..... | 19 |
| 5.7.3 Análisis de estructura poblacional | 20 |
| 5.7.3.1 Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) | 20 |
| 5.7.4 Determinación de distancias genéticas | 21 |
| 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 22 |
| 6.1 Informatividad del panel de cinco marcadores microsatélite empleado en las dos poblaciones de <i>M. salmoides</i> | 23 |
| 6.2 Análisis del equilibrio Hardy-Weinberg..... | 27 |
| 6.3 Coeficiente de endogamia F_{is} | 28 |
| 6.4 Análisis de estructura poblacional | 29 |
| 6.4.1 Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) | 29 |
| 6.5 Análisis factorial de correspondencia..... | 30 |
| 7. CONCLUSIONES | 32 |
| 8. IMPLICACIONES Y SUGERENCIAS | 33 |
| 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 34 |
| 10. ANEXOS | 40 |

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

| | |
|---|----------------|
| Figura 1. Ejemplar de <i>Micropterus salmoides</i> | pag. 2 |
| Figura 2. Rango distribucional nativo de <i>M. salmoides</i> según McLane, 1948..... | pag. 3 |
| Figura 3. Ubicación geográfica de las presas Las Blancas y Marte R. Gómez en el Edo. de Tamaulipas | pag.14 |
| Figura 4. Productos de PCR microsatélite TPW012 | pag. 22 |
| Tabla 1. Características de los marcadores microsatélite seleccionados del panel propuesto por Lutz-Carrillo et al, 2008 | pag.17 |
| Tabla 2. Informatividad del panel de 5 marcadores microsatélite empleado en las 2 poblaciones de <i>M. salmoides</i> | pag.26 |
| Tabla 3. Rango alélico reportado por Lutz-Carrillo et al, 2008 | pag.26 |
| Tabla 4. Resultados obtenidos en el análisis del equilibrio Hardy-Weinberg, Mediante todos los locus, para las poblaciones de Las Blancas y Marte R. Gómez | pag.27 |
| Tabla 5. Coeficiente de endogamia (FIS) estimado por locus en las poblaciones analizadas | pag.28 |
| Tabla 6. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) | pag.29 |
| Gráfica 1. Análisis de correspondencia | pag.31 |

RESÚMEN

Pese a la importancia sociocultural y económica que representa *Micropterus salmoides* para el Estado de Tamaulipas, se desconoce la diversidad genética de la especie en dicho Estado, por lo que se propone su estudio en dos embalses del norte de Tamaulipas (Presa Las Blancas y Presa Marte R. Gómez). Con el objetivo de determinar la diversidad y estructura genética existente en dichas poblaciones, se colectaron muestras de aleta dorsal de un total de 50 individuos, *M. salmoides*, por localidad. La extracción de ADN se realizó mediante el kit comercial PROMEGA (Wizard® Genomic DNA Purification Kit #TM050). La caracterización genética se realizó mediante un panel de cinco marcadores microsatélite, seleccionados de un panel propuesto por Lutz-Carrillo *et al*, 2008. La amplificación de segmentos microsatélites se llevó a cabo mediante la técnica de PCR, con un volumen final de 10µl, compuesto por una concentración de 50ng de ADN, 1X Buffer GoTaq, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTPs, 0.125U GoTaq DNA polimerasa y 0.2mM de *primers*. Ambas poblaciones mostraron mayor H_o que H_e en todos los *locus*, lo que indica déficit de heterocigotos. Los marcadores microsatélite presentaron desvío altamente significativo al equilibrio de Hardy-Weinberg, excepto el locus TPW062 en la población de Marte R. Gómez. El coeficiente de endogamia F_{IS} , reveló índices de endogamia alta para la población de Las Blancas y muy alta para la población de Marte R. Gómez. El Análisis de Varianza Molecular mostro escasa diferenciación genética entre poblaciones y mayor variación genética dentro de los individuos de cada población.

ABSTRACT

Despite the sociocultural and economic importance that *Micropterus salmoides* represents for the State of Tamaulipas, the genetic diversity of the species in this state remains unknown, hence a study in two reservoirs of North Tamaulipas is proposed (Las Blancas dam, and Marte R. Gómez dam). With the objective of determining the existing diversity and genetic structure on these populations, dorsal fin samples were collected from a total of 50 individuals, *M. salmoides*, on each locality. DNA extraction was realized by means of the commercial PROMEGA kit (Wizard Genomic DNA Purification Kit #TM050). The genetic characterization was realized by means of a five-marker microsatellite panel, chosen from a panel proposed by Lutz-Carrillo *et al*, 2008. The microsatellite segment amplification was performed by PCR technique, with a final volume of 10 μ l, composed by a 50ng DNA concentration, 1x Buffer GoTaq, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTPs, 0.125U GoTaq DNA polymerase, and 0.2mM *primers*. Both populations showed a larger concentration of Ho than He in all locus, which indicates an heterozygous deficit. Microsatellite markers presented a highly significant diversion to the Hardy-Weinberg equilibrium, except for the TPW062 locus on the Marte R. Gómez population. The inbreeding coefficient F_{IS} , revealed a high inbreeding rate for the Las Blancas population, and an extra high inbreeding rate for the Marte R. Gómez population. The Analysis of Molecular Variance showed a scarce genetic differentiation between populations and a higher genetic variation within the individuals of each population.

1. INTRODUCCIÓN

Micropterus salmoides, es posiblemente el pez deportivo recreativo más cotizado e importante en aguas continentales de USA y México, es un pez muy popular para la pesca deportiva y por este motivo ha sido ampliamente utilizado y difundido a diversas regiones del mundo. En Tamaulipas, es una de las especies tradicionalmente ligadas a la actividad de pesca deportiva. Dicha actividad es una fuente generadora de empleo e ingresos económicos, fuertemente ligada al sector turístico del país y en particular al del estado de Tamaulipas. En abril del 2013 la Secretaría de Desarrollo Económico y Turismo del Estado de Tamaulipas dio a conocer el número de visitantes generados por la pesca deportiva en el periodo de semana santa, dando un total de 2800 personas (SEDET, 2013). Aunque no se ha calculado correctamente, en México se estima que, la pesca deportiva genera un total de 60-100 millones de dólares por año, siendo el Estado de Tamaulipas el que ocupa el primer lugar en dicha actividad.

En la actualidad, muchas de las corrientes implicadas en la conservación biológica están enfocadas en la necesidad de proteger los recursos genéticos de las especies, por ejemplo mediante la identificación de la variación dentro y entre poblaciones bajo estudio, así como también en el grado de introgresión genética presente entre subespecies. El conocimiento de la variabilidad genética en poblaciones acuícolas es fundamental para fines de conservación y sobre todo para fines de mejoramiento genético, ya que es la base sobre la cual se puede promover el cambio positivo en características productivas o reproductivas, así como también las relacionadas con la adaptabilidad al medio ambiente (Falconer y McKay, 1996; Hedrick, 2005). A pesar de su implícita importancia para el estado de Tamaulipas, no existen programas oficiales que faciliten el monitoreo de la situación en la que se encuentran los stocks actuales de *Micropterus salmoides*.

Los métodos genómicos actuales mediante el empleo de marcadores genéticos como los microsatélites representan una herramienta imprescindible para el diagnóstico de la diversidad genética presente en una población, para sustentar estudios de identidad y como estrategia para establecer programas de recría tendientes a maximizar la variabilidad genética. El objetivo del presente fue la caracterización de la diversidad genética de dos poblaciones de *Micropterus salmoides*, presentes en el norte del estado de Tamaulipas.

1.1 Generalidades *Micropterus salmoides*

La especie *M. salmoides* se caracteriza por presentar cuerpo elevado y ligeramente comprimido, cabeza grande y ancha, cuenta con una gran boca que llega por atrás del margen del ojo, presenta lengua sin dientes. La aleta dorsal unida en la porción espinosa y blanda, las aletas dorsal y anal presentan espinas pero éstas no son muy fuertes. Las aletas pectorales, obtusamente puntiagudas, las ventrales muy juntas, se localizan debajo de las pectorales. Los peces y tallas varían según las características ambientales y aspectos geográficos (Ulloa *et al*, 2005). La edad máxima reportada es de 15 años en el norte de EU, mientras que en el sur la edad media es de 11 años, siendo las hembras más longevas que los machos (Davis y Lock, 1997).

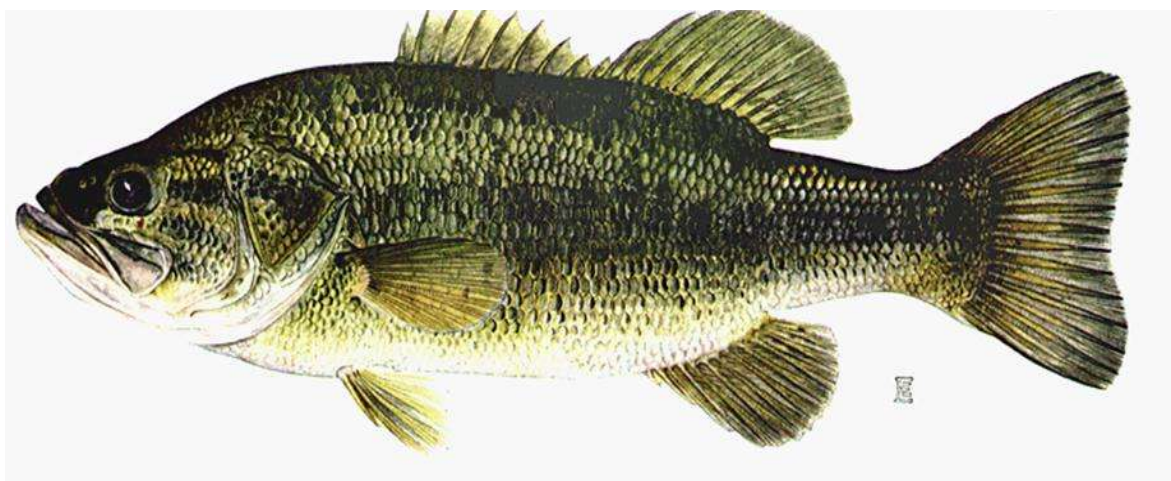


Figura 1. Ejemplar de *Micropterus salmoides*.

La distribución natural de *M. salmoides* se extiende desde la parte oriental de Canadá hasta la cuenca del Río Bravo en el noreste de México. Sin embargo, debido a su importancia en la pesca deportiva, se encuentra distribuida a nivel mundial (Lutz-Carrillo *et al*, 2006; Beltrán *et al*, 2012). Habita en corrientes lentas y claras, lagos pequeños y con abundancia de hierbas, prefiere además bahías poco profundas. Carnívoro estricto, si hay deficiencia de alimento, se observa canibalismo (INP, 1976; Beamesderfer y North, 1995; Davis y Lock, 1997; Near y Koppelman, 2009). Se ha reportado que la temperatura óptima para su desarrollo es de 21°C aproximadamente. Gracias a su adaptabilidad se le puede encontrar en distintos tipos de ambientes (Lutz-Carrillo *et al*, 2006; Beltrán *et al*, 2012). Se reproduce una vez al año, presenta sexos separados y es de fertilización externa. El nido es construido por los machos.



Figura 2. Rango distribucional nativo de *Micropterus salmoides*, según McLane, 1948.

1.2 Ubicación Taxonómica

La especie *M. salmoides* presenta la siguiente posición taxonómica de acuerdo a Romer (1971):

Phylum: *Chordata*

Subphylum: *Vertebrata*

Infraphyllum: *Gnathostomata*

Superclase: *Pisces*

Clase: *Osteichthyes*

Subclase: *Actinopterygii*

Orden: *Perciformes*

Suborden: *Percoidei*

Familia: *Centrarchidae*

Género: *Micropterus*

Especie: *salmoides*

Anteriormente esta especie se encontraba constituida por dos subespecies, *Micropterus salmoides floridanus* y *Micropterus salmoides salmoides*, las cuales eran reconocidas por caracteres merísticos (Bailey y Hubbs, 1949) y por diferencias bioquímicas (Philipp *et al*, 1983). Basados en estudios morfológicos, del ADNm y marcadores bioquímicos Kassler *et al*. (2002), elevaron a las dos subespecies como especies independientes. Estas dos especies se encuentran presentes en el noreste de México siendo *Micropterus salmoides floridanus* introducida y *Micropterus salmoides salmoides* nativa (Rodríguez, 2004).

1.3 Biodiversidad y estructura genética

Actualmente hay una creciente preocupación por la necesidad de conservar la biodiversidad, en todo el mundo. Esto se debe a que los recursos taxonómicos están disminuyendo rápidamente, provocando un impacto negativo en el bienestar humano (FAO, 2013). El Convenio sobre la Diversidad Biológica define a la biodiversidad como “la variabilidad existente entre los organismos vivos de todos los recursos, incluyendo entre otros, a los sistemas terrestres, marinos acuáticos y a los complejos ecológicos de los que forman parte” (FAO, 2013). La variabilidad genética o diversidad genética, puede describirse brevemente como los cambios o diferencias en el material genético dentro y entre las poblaciones o subpoblaciones de una especie (Hedrick, 2005).

La variabilidad o diversidad genética se puede definir como la capacidad genética de un organismo para responder a variaciones en el ambiente o a la presión de selección natural o influenciada por el hombre (Rochambeau *et al*, 2000). La evolución conlleva un cambio acumulativo e irreversible de las frecuencias de las diferentes variantes de los genes en las poblaciones, es decir, los factores que cambian las frecuencias alélicas (o génicas) de las poblaciones, son la mutación, recombinación, deriva genética y la selección.

-Mutación: se da por un cambio directo en la secuencia de ADN de un individuo, formando nuevos alelos. Se considera mutación a un cambio estable y heredable en el material genético de un organismo.

-Recombinación: proceso genético que ocurre durante la meiosis, mediante el cual, se crean nuevas combinaciones de alelos, que pueden generar nuevos genotipos dentro de la población.

-Deriva genética: en cada generación de individuos se produce un sorteo de genes y alelos durante la transmisión de gametos de los padres a los hijos que se conoce como deriva genética, si en algún momento de este “sorteo” un tipo de alelo no llega a transmitirse a la siguiente generación, entonces este alelo se habrá perdido para siempre, trayendo consigo la pérdida de variabilidad genética.

-Selección natural: proceso direccional que establece que las condiciones del medio ambiente seleccionan la reproducción. Es responsable de cambios adaptativos.

-Flujo genético: se define como la incorporación de genes a una poza génica provenientes de una o más poblaciones diferentes dentro de una especie, es la migración de individuos hacia otra población, los cuales deben sobrevivir y reproducirse en la nueva población diseminando su material genético en la población a la cual emigraron (McDonald y Linde, 2002; citado por Arbeláez, 2010).

Además, los hábitos o condiciones reproductivas muestran influencia sobre la variabilidad genética de las poblaciones. Las variaciones en la relación hembras/macho en la población, pudiera afectar el tamaño efectivo de la población N_e (se refiere al número de adultos reproductores que aportan variabilidad genética a la población), pudiendo originar la pérdida de heterocigosidad e incremento de la consanguinidad.

Según el Teorema Fundamental de la Selección Natural (Fisher, 1930) la tasa de cambio evolutivo en una población es proporcional a la cantidad de diversidad genética disponible, por lo que es indispensable conservar la diversidad genética conforme a un estatus taxonómico.

En genética, tanto desde el punto de vista de mejora como de conservación, el principal objetivo que se persigue es estudiar, determinar y medir la variación existente entre y dentro de los individuos de una población (Aranguren *et al*, 2005). Actualmente se desarrollan programas y proyectos sobre el manejo y conservación de los recursos genéticos animales (FAO, 2013), estos recursos se han evaluado mediante el análisis de variación genética de tipo cualitativo esencialmente neutral, para lo cual la tecnología molecular ha sido propuesta y parcialmente aplicada como una herramienta para el monitoreo de variabilidad genética (Perales *et al*, 2007). Siendo los marcadores moleculares las herramientas básicas usadas en estudios de diversidad genética, cuyas

variaciones pueden ayudar a encontrar similitudes en el nivel taxonómico y entre poblaciones (Mancera *et al*, 2013).

A su vez el estudio de la variabilidad genética ayuda a entender los indicadores de diversidad genética que son directa o indirectamente interpretados mediante parámetros como la heterocigosidad, la variabilidad intrínseca o extrínseca a una población, el tamaño efectivo de la población y la consanguinidad o endogamia (Falconer y Mckay, 1996; Hedrick, 2005).

La reducción de la variabilidad genética puede promover mayor sensibilidad a las variaciones ambientales y eventualmente puede provocar la extinción de una especie (Guttman y Berg, 1998; Lopera-Barrero *et al*, 2008). Además, puede afectar el crecimiento y la reproducción (Moreira, 2007; Porta *et al*, 2006). La mantención de la variabilidad genética tiene gran importancia para la conservación de las especies (Brosso *et al*, 2005), y es necesaria para que los individuos enfrentes positivamente las variaciones ambientales y consigan su completo desarrollo (Ryman *et al*, 1995; Povh *et al*, 2008). La pérdida de variabilidad genética es el resultado del inadecuado manejo reproductivo o por deficiencias en el número efectivo de reproductores, e incluso por malos manejos en programas de repoblamiento causando problemas de endogamia, adaptabilidad y supervivencia de progenies, y en caso extremo, conducir la extinción de la especie (Lopera-Barrero *et al*, 2008; Piñero *et al*, 2008).

1.4 Marcadores moleculares para la determinación de la variabilidad genética

En genética, tanto desde el punto de vista de la mejora como de la conservación, el principal objetivo que se persigue es estudiar, determinar y medir la variación existente, entre y dentro de los individuos de una población (Aranguren, 2005), para lo cual han sido muy útiles los marcadores moleculares (Godoy, 2009).

Los marcadores moleculares son biomoléculas que se relacionan con un rasgo genético y cuya expresión puede detectarse, posee variaciones o polimorfismos suficientes para agrupar organismos y funcionan como un señalador de diferentes regiones del genoma (Picca *et al*, 2004). Los marcadores moleculares se definen como todo fenotipo proveniente de un gen expresado, como en el caso de las isoenzimas o las proteínas (marcadores bioquímicos), o de un segmento específico de ADN correspondiente a regiones de expresión o no del genoma (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Las técnicas de análisis molecular que permiten la detección de la variabilidad genética directamente a nivel de la molécula de ADN, se basan en diferentes tipos de marcadores moleculares.

Marcadores bioquímicos: están representados por las isoenzimas, proteínas totales o de almacenamiento, constituyen la primera generación de marcadores (Solís y Torres, 2005). Son utilizados como marcadores hereditarios para cuantificar las frecuencias alélicas y genotípicas de una población, donde estas frecuencias son normalmente los estimadores básicos de la composición genética de una población (Market y Moller, 1959).

Marcadores de ADN: constituyen la última generación de marcadores moleculares. Este tipo de marcadores pueden clasificarse de la siguiente manera (Yáñez, 2002; Velasco, 2005):

Técnicas basadas en hibridación: Se agrupan las técnicas que emplean sondas para la detección de los marcadores. Las técnicas más usuales son los RFLPs (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción), VNTR (número variable de repeticiones en tándem) y ADNShips (Oligonucleotide arrays) (Cornide, 2000; Yáñez, 2002; Velasco, 2005).

Técnicas basadas en PCR con iniciadores arbitrarios: no requieren información de la secuencia del genoma que se está investigando. Incluye los RAPDs (amplificaciones polimórficas de DNA al azar); AFLPs (polimorfismo de longitud de fragmento amplificado), los ISSR (inter repeticiones de secuencia simple) (Yáñez, 2002).

Técnicas basadas en PCR de secuencia específica: es necesario conocer la secuencia de las zonas flanqueantes para la obtención de iniciadores. Como son los CAPS (claved amplified polymorphic sequence) y los microsatélites (Yáñez, 2002).

1.5 Los SSR (Secuencias Repetidas Cortas) o Microsatélites

Son regiones de secuencias repetidas en tándem (1-6pb) que se distribuyen a lo largo del genoma, generalmente se encuentran en regiones no codificantes del genoma donde la tasa de substitución de nucleótidos es más alta que en regiones codificantes, por lo que presentan un alto nivel de polimorfismo; se encuentran distribuidos uniformemente. Dichas secuencias pueden ser amplificadas por PCR usando cebadores específicos diseñados a partir de las secuencias de microsatélites aislados de una genoteca genómica. Debido a su alto nivel de polimorfismo y facilidad de rastreo, una vez aislados, exhiben herencia mendeliana, codominancia, tienen una confiabilidad del 100%, fáciles de medir y analizar, son repetitivos y automatizables, constituyen uno de los marcadores genéticos neutros más ampliamente utilizados en estudios evolutivos y ecológicos (Rocha, 2003; Aranguren, 2005; Arbeláez, 2010; Mancera, 2013). Su principal limitante son los errores de genotipificación: Concentraciones pequeñas del ADN molde, que conllevan a fallas de amplificación; Amplificación preferencial de alelos pequeños donde el alelo más grande falla al amplificar; Alelos nulos, alelos que no pueden ser amplificados debido a mutaciones en los sitios de alineamiento del primer; Homoplasia, no se puede discriminar si dos fragmentos de igual tamaño realmente corresponden a dos secuencias diferentes; Stutters o tartamudos, difieren del molde original por múltiplos de la longitud de repetición, se producen por deslizamiento de la ADN polimerasa durante la amplificación de PCR; Bandas sombra o Pico +A, se forma por deslizamiento de la Taq polimerasa durante PCR y por la habilidad de la polimerasa para adicionar una base extra al extremo de los fragmentos amplificados en una manera dependiente del molde;

Artefactos de electroforesis, se producen cuando se utilizan altas concentraciones de productos PCR en secuenciadores automatizados (Aranguren, 2005; Tapia, 2010; Mancera *et al*, 2013). Para disminuir estos errores es necesario prevenir contaminaciones, usar sistemáticamente muestras ciegas y automatización. Se recomienda elegir tetranucleótidos y trinucleótidos, en lugar de dinucleótidos, esto permitirá eliminar efectos que confunden los alelos falsos. Control de la concentración de ADN y número de ciclos de PCR. Diluciones de productos de PCR en corridas posteriores (Mancera *et al*, 2013). Los microsatélites se han usado para evaluar el grado de variación entre especies y poblaciones, para medir la variación genética total (Taylor *et al*, 1994). En investigaciones acuícolas han sido utilizados para estudios de mapas genómicos, de parentesco y estructura familiar; también en la evaluación de la variación genética y en estrategias de mejoramiento genético (Tapia, 2010). Debido a su gran variabilidad y relativa facilidad de análisis, los microsatélites proveen las bases para un mejor manejo de una población y por tanto de pesquerías sustentables.

Para seleccionar el marcador molecular correcto, se debe tomar en cuenta su distribución a lo largo del genoma, el grado de polimorfismo, así como la técnica para analizar el marcador, la cual debe ser rápida, práctica y de fácil acceso (Cheng y Crittenden, 1994; Aranguren, 2005). Los microsatélites se han usado para evaluar el grado de variación entre especies y poblaciones, para medir la variación genética total (Taylor *et al*, 1994). En investigaciones acuícolas han sido utilizados para estudios de mapas genómicos, de parentesco y estructura familiar; también en la evaluación de la variación genética y en estrategias de mejoramiento genético (Tapia, 2010). Debido a su gran variabilidad y relativa facilidad de análisis, los microsatélites proveen las bases para un mejor manejo de una población y por tanto de pesquerías sustentables. Mediante el empleo de los microsatélites, se puede conocer la variabilidad genética de las poblaciones, así como también la determinación de la existencia de flujo génico entre poblaciones.

1.6 Estudios genéticos realizados en *Micropterus salmoides*

Debido a la importancia económica y cultural que representa *M. salmoides*, así como la creciente preocupación por la conservación de especies, diferentes grupos de investigadores alrededor del mundo han realizado estudios basados en distintas técnicas moleculares. Al respecto, Johnson y Fulton (1999), midieron las frecuencias alélicas de tres *loci aloenzimas* discriminantes entre *M.s.floridanus* y *M.s.salmoides* en una población del norte de Arkansas, encontrando dominancia de alelos *M.s.floridanus* (62.3%). Por otra parte, en México, Rodríguez y García de León (2004), relacionaron aspectos morfológicos y genéticos en *M.salmoides* utilizando marcadores bioquímicos, corroborando la presencia de tres poblaciones naturales en el Noreste del país y observaron fuerte introgresión genética de *M.s.floridanus* en el genoma de *M.s.salmoides* en las poblaciones de los ríos Purificación y Corona. Destacan también la presencia de tres poblaciones puras de *M.s.salmoides*, una en el río Corona, ubicado en Tamaulipas y dos más en Cuatro Ciénegas, Coahuila. En otro estudio, Lutz-Carrillo et al 2006, proponen el uso de microsatélites para determinar la proporción de híbridos y el ancestro común entre *M.s.floridanus* y *M.s.salmoides*, en dicho estudio encontraron mayor proporción genética de *M.s.floridanus* respecto a *M. s. salmoides*. Posteriormente, estos mismos autores (2008) aislaron y caracterizaron 52 marcadores de microsatélites para *M.s.floridanus* para uso en conservación, manejo y estudios genéticos de población (Lutz-Carrillo et al, 2008). Así mismo, Fries (2010), estudió la diversidad genética de *M.salmoides* mediante *loci* bioquímicos, microsatélites de ADN nuclear y RFLP en cuatro poblaciones naturales, en las que ninguna presenta introgresión. Finalmente en 2012 Sheng-Jie Li *et al*, realizan la secuenciación del genoma mitocondrial de *M.s.salmoides* y *M.s.floridanus*, dando a conocer sus diferencias genéticas.

2. JUSTIFICACIÓN

A pesar de la implícita importancia sociocultural y económica que presenta *Micropterus salmoides* para el estado de Tamaulipas, a la fecha, se desconoce el estado de la diversidad genética de la especie, por lo tanto se propone su estudio en dos embalses del norte de Tamaulipas.

3. HIPÓTESIS

Las poblaciones de *Micropterus salmoides* en las presas Marte R. Gómez y Las Blancas, presentan alta variabilidad genética.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la diversidad y estructura genética existente en dos poblaciones de *Micropterus salmoides* del norte del estado de Tamaulipas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Estimar la diversidad genética de poblaciones de *Micropterus salmoides* utilizando un panel de marcadores microsatélites.

Estimar parámetros poblacionales y evaluar la estructura genética de poblaciones de *Micropterus salmoides*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Descripción del área de estudio

El estudio se llevó a cabo en dos embalses (Presa Las Blancas y Presa Marte R. Gómez) del interior del Estado de Tamaulipas, localizados al norte del Estado.



FIGURA 3. Ubicación geográfica de las presas Las Blancas y Marte R. Gómez, en el estado de Tamaulipas.

5.1.1 Presa Derivadora Las Blancas

Fue construida en 1999 con el propósito de control de avenidas y para resolver el problema de riego en la región. Localizada a 5km. de Ciudad Mier, construida en el cauce del Río Álamo (afluente del Río Bravo), con una capacidad útil de 138.65mm³, sus aguas son canalizadas hacia la presa de almacenamiento Marte R. Gómez. Las aguas en conjunto son utilizadas para el riego agrícola de 75000 hectáreas en el Distrito de Riego No. 026, bajo Río San Juan. No tiene descargas de aguas residuales en su cuenca y es agua de origen pluvial (Comisión Estatal del Agua de Tamaulipas, 2004). La actividad pesquera de la presa se encuentra regulada por la NOM-060.

5.1.2 Presa Marte R. Gómez

Se construyó con el propósito de aprovechar para riego las aguas del río San Juan y como control de avenidas. Se ubica en el municipio de Camargo, sobre el cauce del Río San Juan. El embalse de la presa cubre prácticamente el 50% de la superficie del municipio. La presa Marte R. Gómez es alimentada por el Río San Juan, adicionalmente se transfieren volúmenes de la presa derivadora Las Blancas, a través del canal de interconexión para aprovechar los escurrimientos del Río Álamo (Comisión Estatal del Agua de Tamaulipas, 2004). La actividad pesquera de la presa se encuentra regulada por la NOM-043.

5.2 Material Biológico

Se colectaron muestras de aleta dorsal de un total de 50 individuos, *M. salmoides*, por localidad, las cuales fueron transportadas en viales criogénicos (tipo corning) de rosca interna con capacidad de 1.8ml, utilizando etanol al 96% para su preservación. Fueron almacenadas a 4°C en el Laboratorio de Biotecnología Animal del Centro de Biotecnología Genómica perteneciente al Instituto Politécnico Nacional, ubicado en Reynosa, Tamaulipas, hasta la extracción del ADN.

5.3 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó mediante el kit comercial PROMEGA (Wizard® Genomic DNA Purification Kit #TM050) basándose en la técnica para extracción de ADN de cola de ratón, con ciertas modificaciones (ANEXO 1).

5.4 Cuantificación de ADN

Mediante el equipo Nanodrop (NANODROP 2000/2000c Spectrophotometer, Thermo Scientific) se realizó la cuantificación de la concentración de ADN con la aplicación para ácidos nucleicos del software NANODROP 2000/2000c v.1.0. Para esta lectura se deposita una solución de referencia (blanco) de la cual el equipo crea un espectro y lo almacena en la memoria como una matriz de intensidades de luz por longitud de onda. Lo mismo hace con la muestra de ADN, que es depositada directamente en la superficie de medición. La intensidad de luz de la muestra y del blanco son requeridas para calcular la absorbancia de una longitud de onda determinada (Thermo Scientific; v1.0 User Manual, NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer, 2009).

5.5 Banco de Diluciones

Se formó un banco de trabajo de ADN diluido a una concentración de 50ng/μl de cada muestra.

5.6 Marcadores Microsatélite

La caracterización genética de los individuos se realizó mediante un panel de cinco marcadores microsatélite, seleccionados del panel propuesto por Lutz-Carrillo *et al*, 2008, tomando como criterio de selección Heterocigosidad observada y número de alelos (Tabla 1).

Tabla 1. Características de los marcadores microsatélite seleccionados del panel propuesto por Lutz-Carrillo *et al.* (2008).

| MiSa | Nucleótidos | Primers | No. Alelos | Ho | He | Rango alélico | No. Gene Bank |
|--------|--|--|------------|------|------|---------------|---------------|
| TPW011 | (AGAT) ₁₃ | F:CAACATGGACGCTACTAT R:CAACCATCACATGCTTCT | 6 | 0.60 | 0.66 | 170-194 | EF590066 |
| TPW012 | (AGAT) ₂₁ | F:CGGTTGCAAATTAGTCATGGCT R:CAGGGTGCTCGCTGTCT | 9 | 0.32 | 0.41 | 290-361 | EF590067 |
| TPW060 | (AGAT) ₁₆₊₁₀₊₃₊ 2+4+9+10 | F:TATAGTTTGGTCCAGCAGGTGGCGT R:TGTGGAATGACATTTAGCCGAGGCC | 20 | 0.97 | 0.94 | 294-561 | EF590079 |
| TPW062 | (AGAT) ₁₄ | F:ATGCTTTCTGCTGAAGTGC R:TCCCTTTTGGAAAGTAGAAGT | 6 | 0.53 | 0.70 | 190-222 | EF590080 |
| TPW090 | (ACAT) ₆ | F:TGCCAGAGATCCTGAGCTAC R:CCACTTACCTGAATGAATAACCAGAGACA | 8 | 0.83 | 0.75 | 164-233 | EF590087 |

5.6.1 Amplificación de ADN

La amplificación de segmentos microsatélites se llevó a cabo mediante la técnica de PCR en un termociclador DNA Engine TETRAD2 (MJ Research), con un volumen final de 10µl, compuesto por una concentración de 50ng de ADN, 1X Buffer GoTaq, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTPs, 0.125U GoTaq DNA polimerasa y 0.2mM de *primers*, las condiciones de amplificación fueron las contenidas en los subprogramas TD55 para los locus TPW012, TPW060, TPW062 y TPW090; y subprograma TD60 para locus TPW011 (las características de los subprogramas se exponen en ANEXO 2) del programa TOUCHDOWN para la amplificación de microsatélites. La amplificación de los productos de PCR fueron verificados mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2.5%, utilizando como buffer de corrida TBE (Tris, Ácido Bórico, EDTA) al 0.5X. Los patrones electroforéticos de cada uno de los microsatélites fueron visualizados mediante el equipo Foto documentador (Gel Logical 112 Kodak) y determinados mediante el programa kodak molecular image, utilizando como referencia para la lectura el

marcador de tamaño molecular Hyperlader V y SybrGreen como medio de fluorescencia, posteriormente fueron comparados con el rango de amplificación reportado por Lutz-Carrillo *et al*, 2008.

5.6.2 Separación de fragmentos

Los fragmentos amplificados fueron separados en el Analizador Genético 3130 de Applied Biosystems mediante carrera de secuenciación estándar, con capilares de 50cm y polímero POP-7.

5.6.3 Asignación de genotipos

Los resultados arrojados por el Analizador Genético 3130, fueron analizados en el software GeneMapper Versión 4.0 de Applied Biosystems. Para determinar el tamaño de los alelos se utilizó como referencia el marcador de peso molecular GeneScanTM- 500 ROXTM de Applied Biosystems. Para asignar el genotipo, el programa realiza la identificación de los fragmentos de DNA de interés y el cálculo de su tamaño en nucleótidos, cuantificando el área y la altura de los picos de fluorescencia emitidos en las reacciones de PCR. Aun cuando el programa arroja estos resultados, se revaloran los mismos con el propósito de disminuir errores provocados por stutters o picos "A", que pueden provocar errores en la asignación de homocigotos y heterocigotos.

5.7 Análisis genéticos de las poblaciones de *Micropterus salmoides*

5.7.1 Variabilidad genética

Se consideraron parámetros como la estimación de frecuencias alélicas de cada locus por población, considerando, Heterocigosidad observada (H_o), que es la proporción de individuos que presenta un par de alelos diferentes, mediante un conteo directo, para cada locus en una población; Heterocigosidad esperada (H_e), esta variable estima la proporción de individuos que se esperan sean

heterocigotos para un locus en una población; y Contenido de Información Polimórfica (PIC), el cual, refleja el polimorfismo detectado por el marcador molecular, tomando en cuenta el número de alelos y sus frecuencias relativas en cada población. Además la comparación entre H_o y H_e permite evaluar la estructura genética de las poblaciones (Aranguren *et al*, 2005) Los análisis de frecuencias alélicas se calcularon mediante el programa computacional CERVUS V.3.0 (Kallinowski *et al*, 2007).

5.7.2 Análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg

En una población infinita donde los cruzamientos se producen de manera aleatoria en ausencia de mutación, migración y selección, las frecuencias alélicas y genotípicas no varían de generación en generación. Las poblaciones que se encuentran en esa situación se dice que están en equilibrio de Hardy-Weinberg (Hardy, 1908). Por lo tanto, se evaluó el equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW), teniendo como objetivo la detección de desviaciones en la distribución de los genotipos de acuerdo a la frecuencia alélica de cada locus. La expresión matemática de esta ley es: $(p+q)^2=p^2+2pq+q^2=1$

Donde p y q son las frecuencias de dos alelos en un mismo locus (Aranguren *et al.*, 2005). El estadístico F_{IS} mide el parecido entre los dos alelos de un gen de un individuo, traducándose, como una medida del grado de endogamia en una población al interpretarse como la probabilidad de que los dos alelos de un mismo gen sean idénticos. Su valor explicaría el grado de panmixia ($F_{IS}=0$) o el grado de consanguinidad ($F_{IS}=1$), como también los excesos o déficit de heterocigotos en la población de acuerdo al signo que presenta su valor: si el valor es negativo (-) significa un exceso de heterocigotos y si es positivo (+) significa déficit de heterocigotos.

El F_{IS} mide el grado de desviación de las frecuencias genotípicas de los *loci* heterocigotos observados dentro de la subpoblación (H_o), con respecto a las esperadas (H_e). El valor de este índice varía de -1 a 1, cuando es igual a cero,

indica que la subpoblación se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg, si es negativo, existe un exceso de heterocigotos, mientras que si es positivo, existe un déficit de heterocigotos y por consiguiente un aumento de la homocigosis implicando un aumento de consanguinidad en la subpoblación. Este análisis se realizó mediante el programa computacional GENEPOP v.4.2. Hartl (1997), propuso una clasificación para las diferentes magnitudes absolutas del F_{IS} , siendo bajo si el valor está entre 0 y 0.05, medio si se encuentra entre 0.06 y 0.15, alto si se encuentra entre 0.16 y 0.25 y muy alto si es mayor a 0.25.

5.7.3 Análisis de estructura poblacional

5.7.3.1 Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)

El AMOVA se realizó mediante el programa Arlequín (Excoffier et al, 1992). Un análisis jerárquico de varianza parte la varianza en diferentes componentes debidos a las diferencias entre grupos, entre poblaciones dentro de un mismo grupo y dentro de poblaciones, haciendo necesaria la definición de la estructura de la población en grupos y poblaciones, los componentes de varianza son utilizados para el cálculo de los índices de fijación, análogos a los estadísticos F definidos por Wright (1965), llamados estadísticos (ϕ o F), que reflejan la correlación de la diversidad a diferentes niveles jerárquicos de división en términos de coeficientes de endogamia o en términos de tiempos de coalescencia.

Donde la varianza molecular total, es la suma de los componentes de varianza debido a diferencias entre haplotipos dentro de una población. El componente de varianza debido a diferencias entre haplotipos diferentes poblaciones dentro de un grupo, y el componente de varianza debido a diferencias entre los haplotipos de los diferentes grupos.

5.7.4 Determinación de distancias genéticas

Se estableció un AFC (análisis factorial de correspondencias) mediante el programa GENETIX 4.05, con las frecuencias alélicas de 5 *loci* microsatélite para las dos poblaciones. Este análisis describe la asociación de variables cualitativas, en la que cada individuo está representado una vez por el valor de cada modalidad (locus) y variable (alelos para cada locus). Los resultados son mostrados como gráficas bidimensionales o tridimensionales; cada punto que se observa en la gráfica representa un individuo en el hiperespacio y la relación que guarda con respecto a los demás individuos está en función de la distancia que exista entre ellos (Belkhir, 2004). El análisis factorial de correspondencia nos permite explicar la variabilidad total en función de distintos factores y cuantificar de qué manera cada factor contribuye a dicha variabilidad. Equiparando los factores a eje de coordenadas es posible representar gráficamente las Unidades Taxonómicas Operativas (OTUS, por sus siglas en inglés), en este caso poblaciones, comparando su posición respecto al resto.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se colectaron 50 muestras de aleta dorsal de individuos, *Micropterus salmoides*, provenientes de dos poblaciones del norte de Tamaulipas (Presa Las Blancas y Presa Marte R. Gómez, 50 muestras de cada población). El ADN obtenido de cada una de las muestras procesadas fue considerado de buena calidad para el estudio.

Se logró la amplificación de cada uno de los productos de PCR de los cinco microsatélites utilizados para la genotipificación de *M.salmoides* en los 50 individuos de cada población.

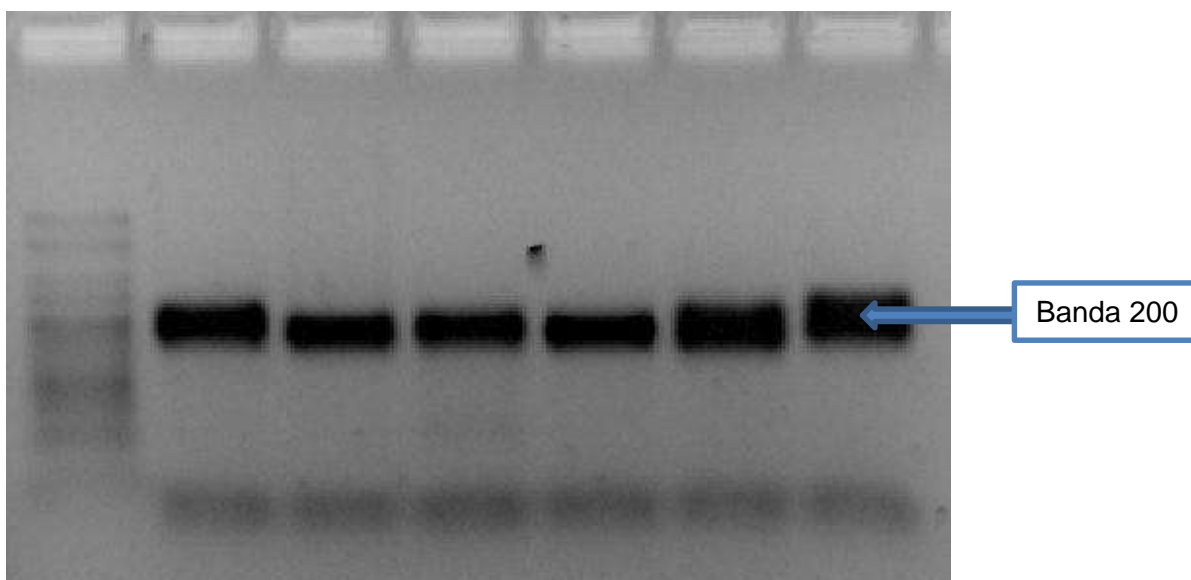


Figura 4. Productos de PCR del microsatélite TPW012 amplificados en individuos *M.salmoides*, en el pozo 1 se aprecia el marcador de peso molecular HyperLadder V 1500pb, en los pozos 2-7 se muestran los individuos 43,44,45,46,47 y 51 de la población Las Blancas.

6.1 Informatividad del panel de cinco marcadores microsatélite empleado en las dos poblaciones de *M. salmoides*

Como se mencionó con anterioridad, la H_o es la frecuencia relativa de los individuos heterocigotos en un locus. En dicho análisis se encontró niveles medios de H_o en la población de Las Blancas y niveles de H_o bajos para la población de Marte R. Gómez. A su vez, en términos de probabilidad, la heterocigosidad esperada (H_e), se interpreta como la probabilidad de que dos alelos de un mismo locus escogido al azar dentro de una población sean diferentes, para la H_e se encontraron niveles medios a altos para ambas poblaciones, lo que sugiere una moderada diversidad genética de las poblaciones.

Por su parte el Contenido de Información Polimórfica (PIC) es un indicador de calidad de un marcador en estudios de cartografía genética, se relaciona directamente con la heterocigosidad esperada, dicho valor conforme se aproxima a uno, indica mayor probabilidad para detectar la variabilidad de la población, su valor depende del número de alelos y de la distribución de frecuencias. Valores superiores a 0.5 se consideran muy informativos, valores entre 0.25 y 0.5 medianamente informativos y valores inferiores a 0.25 poco informativos (Botstein et al, 1980).

Como se puede observar en la tabla 2, el locus MisaTPW060 fue el que mostro mayor informatividad con un PIC de 0.941 y 0.810 para las poblaciones ubicadas en las presas Las Blancas y Marte R. Gómez, por su parte el locus TPW090 fue el de menor informatividad para la población de Las Blancas, mientras que TPW011 lo fue para Marte R. Gómez. De acuerdo a lo reportado por Botstein et al, (1980), todos los marcadores microsatélite empleados para dicho estudio, se clasificarían como marcadores altamente informativos y por ende, se puede afirmar que los marcadores empleados proporcionaron información suficiente para poder determinar el grado de variabilidad genética de *Micropterus salmoides*.

La población de Las Blancas el mayor número de alelos por locus fue presentado por el marcador TPW060 con un total de 23 alelos, mientras que para la población de Marte R. Gómez el marcador con mayor número de alelos por locus fue TPW062 con 14 alelos por locus. Comparado con lo reportado por Lutz-Carrillo *et al.* (2008) (Tabla 3), se obtuvo un rango alélico más amplio en el presente estudio para los marcadores TPW062, TPW011 y TPW012, mientras que los marcadores TPW060 y TPW090 presentaron un menor rango alélico. El número de alelos reportado por Lutz-Carrillo *et al.* (2008) en la especie *M. salmoides*, fue menor que los encontrados en el presente estudio, excepto el locus TPW090; las diferencias en el rango alélico pudieran deberse a mutaciones que presentan los mismos marcadores microsatélite o debido a la ubicación geográfica, aunado a esto se desconoce a cuál de las dos especies (*M. salmoides salmoides* o *M. salmoides floridanus*) pudieran pertenecer los individuos genotipificados en el estudio, además existe la posibilidad de que entre los individuos muestreados se encuentren híbridos generados mediante el apareamiento de ambas especies, trayendo consigo recombinación en el material genético de las crías de dichos apareamientos generando o disminuyendo el número de alelos en la población.

Ambas poblaciones mostraron mayor H_o que H_e en todos los locus, lo que indica déficit de heterocigotos, lo cual puede deberse a consanguinidad o deriva génica. La población de Las Blancas presenta valores más altos de H_o que la población Marte R. Gómez, con valores >0.56 y >0.46 respectivamente, esto nos indica que la población de Las Blancas tiene mayor diversidad genética que la población Marte R. Gómez (Tabla 2). Lutz-Carrillo *et al.* (2008) en poblaciones de los estados de Florida, Oklahoma, Texas, Arkansas y Tennessee, encontraron menor H_o que H_e en los locus TPW062, TPW011 y TPW012, no así en los locus TPW060 y TPW090 que presentaron mayor H_o que H_e , los valores reportados por Lutz-Carrillo (2008) no varían mucho con los estimados en el presente estudio, ya que en ambos se observa déficit de heterocigotos (Tabla 3).

Johnson y Fulton (1999) midieron las frecuencias alélicas de tres *loci aloenzimas* discriminantes entre *M.s.floridanus* y *M.s.salmoides* en una población del norte de Arkansas, en este estudio reportan déficit de heterocigotos con una heterocigosidad que oscila de 0.29-0.38, valores que se encuentran muy por debajo a los encontrados en el presente estudio. Por el contrario, en 2006 Lutz-Carrillo *et al.* reportaron heterocigosidad de 0-0.96 en poblaciones del Estado de Florida, Oklahoma y Texas, sin presentar déficit de heterocigotos. Rodríguez Martínez y García de León (2004), realizaron un estudio genético de poblaciones en los Estados de Coahuila y Tamaulipas, en el que obtuvieron déficit de heterocigotos en las poblaciones híbridas, esto concuerda con los valores reportados en el presente estudio, ya que Rodríguez Martínez y García de León asignaron las poblaciones del Estado de Tamaulipas como híbridas. Este déficit de heterocigotos indica consanguinidad, la cual puede deberse al confinamiento de las especies por las mismas barreras creadas por los embalses para intercambio de material genético con otras poblaciones, así como por la sobreexplotación que se esté presentando en las presas Las Blancas y Marte R. Gómez, ya que en las localidades circundantes se practica la pesca de subsistencia y la realizada por cooperativas pesqueras de las localidades, dichas actividades pudieran estar impactando de forma negativa el tamaño de la población, disminuyendo el número de individuos en edades reproductivas.

Tabla 2. Informatividad del panel de cinco marcadores microsatélite empleado en las dos poblaciones de *M. salmoides*.

| Presa Las Blancas | | | | | | Presa Marte R. Gómez | | | | |
|-------------------|----------------|--------------------|-------|-------|-------|----------------------|--------------------|-------|-------|-------|
| Locus | N _A | Rango alélico (pb) | Ho | He | PIC | N _A | Rango alélico (pb) | Ho | He | PIC |
| TPW062 | 17 | 156-252 | 0.720 | 0.919 | 0.903 | 14 | 168-244 | 0.700 | 0.826 | 0.798 |
| TPW011 | 13 | 148-230 | 0.760 | 0.856 | 0.833 | 11 | 156-206 | 0.420 | 0.744 | 0.714 |
| TPW012 | 15 | 260-340 | 0.700 | 0.895 | 0.876 | 10 | 260-360 | 0.480 | 0.802 | 0.775 |
| TPW060 | 23 | 272-496 | 0.660 | 0.954 | 0.941 | 11 | 352-444 | 0.560 | 0.838 | 0.810 |
| TPW090 | 6 | 136-156 | 0.560 | 0.795 | 0.755 | 7 | 136-176 | 0.460 | 0.772 | 0.729 |
| Media de PIC | 0.8615 | | | | | 0.7652 | | | | |

Número de alelos total (N_A), pares de bases (pb), Heterocigosidad observada (Ho), Heterocigosidad esperada (He), Índice de Contenido Polimórfico (PIC).

Tabla 3. Rango alélico reportado por Lutz-Carrillo *et al.*, 2008.

| Locus | N _A | Rango alélico (pb) | Ho | He |
|--------|----------------|--------------------|------|------|
| TPW062 | 6 | 190-222 | 0.53 | 0.70 |
| TPW011 | 6 | 170-194 | 0.60 | 0.66 |
| TPW012 | 9 | 290-361 | 0.32 | 0.41 |
| TPW060 | 20 | 294-561 | 0.97 | 0.94 |
| TPW090 | 8 | 164-233 | 0.83 | 0.75 |

Número de alelos total (N_A), pares de bases (pb), Heterocigosidad observada (Ho), Heterocigosidad esperada (He), Índice de Contenido Polimórfico (PIC).

6.2 Análisis del equilibrio Hardy-Weinberg

Todos los locus en ambas poblaciones presentan desvío altamente significativo al equilibrio de Hardy-Weinberg (valor $P < 0.05$) excepto el locus TPW062 en la población de Marte R. Gómez ($P > 0.05$) ver tabla 4. Los resultados obtenidos muestran que la distribución de genotipos no se presenta de manera equilibrada, infiriendo apareamientos entre individuos con un parentesco común, es decir, deficiencia de apareamientos al azar, o bien que ambas poblaciones están sometidas a fuerzas de cambio en sus frecuencias, debidas a migración y quizá a la selección influenciada por el medio ambiente. Cabe mencionar que ambas poblaciones se encuentran comunicadas mediante un canal de interconexión entre ambas presas, generando de esta forma migración continua entre dichas poblaciones.

Tabla 4. Resultados obtenidos con el análisis del Equilibrio Hardy-Weinberg, mediante todos los locus, para la población de Las Blancas y Marte R. Gómez

| | Las Blancas | Marte R. Gómez |
|---------------|--------------------|-----------------------|
| Locus | H-W (p-value±SE) | H-W (p-value±SE) |
| TPW062 | 0.0000±0.0000 | 0.0641±0.0165 |
| TPW011 | 0.0000±0.0000 | 0.0000±0.0000 |
| TPW012 | 0.0000±0.0000 | 0.0000±0.0000 |
| TPW060 | 0.0000±0.0000 | 0.0000±0.0000 |
| TPW090 | 0.0000±0.0000 | 0.0000±0.0000 |

Hardy-Weinberg (H-W), valor $p \pm$ Desviación Estándar

6.3 Coeficiente de endogamia F_{IS}

El índice de estimación de endogamia F_{IS} ; permite describir la distribución de los genotipos dentro de una población, cuyos valores explican las variaciones de heterocigosidad por apareamientos no aleatorios y a posibles efectos selectivos. El estadístico F_{IS} mide el parecido entre los dos alelos de un gen de un individuo, traduciéndose, como una medida del grado de endogamia en una población al interpretarse como la probabilidad de que los dos alelos de un mismo gen sean idénticos. Su valor explicaría el grado de panmixia ($F_{IS}=0$) o el grado de consanguinidad ($F_{IS}=1$), como también los excesos o déficit de heterocigotos en la población de acuerdo al signo que presenta su valor: si el valor es negativo (-) significa un exceso de heterocigotos y si es positivo (+) significa déficit de heterocigotos. Hartl (1997), propuso una clasificación para las diferentes magnitudes absolutas del F_{IS} , siendo bajo sí el valor está entre 0 y 0.05, medio si se encuentra entre 0.06 y 0.15, alto si se encuentra entre 0.16 y 0.25, muy alto si es mayor a 0.25. Basados en dicha clasificación las poblaciones analizadas mostraron índices de endogamia alta, para la población de Las Blancas y muy alta para la población de Marte R. Gómez. Ambas poblaciones mostraron valores positivos de F_{IS} , indicando déficit de heterocigotos (ver tabla 5).

Tabla 5. Coeficiente de endogamia (F_{IS}), estimada por locus en las poblaciones analizadas.

| | Las Blancas | Marte R. Gómez |
|------------------------------------|--------------------------------------|----------------|
| Locus | F_{IS} por locus | |
| TPW062 | 0.2179 | 0.1543 |
| TPW011 | 0.1127 | 0.4383 |
| TPW012 | 0.2199 | 0.4038 |
| TPW060 | 0.3102 | 0.3343 |
| TPW090 | 0.2979 | 0.4067 |
| F_{IS} General | 0.11586 | 0.17374 |

En la población de Las Blancas el locus TPW060 presenta el valor más alto de F_{IS} (0.31) y el valor más bajo TPW011 (0.11), mientras que en la población de Marte R. Gómez el valor más alto lo presenta el locus TPW011 (0.43) y el más bajo el locus TPW062 (0.15), en general la población Marte R. Gómez presenta un valor de F_{IS} más elevado.

6.4 Análisis de estructura poblacional

6.4.1 Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)

El análisis de varianza molecular permite detectar qué porcentaje de la variación molecular total se debe a diferencias entre y dentro de las poblaciones. Los resultados del AMOVA (Tabla 6) muestran que existe escasa diferenciación genética entre las poblaciones (F_{ST} 0.04379), así mismo se observa mayor variación genética dentro de los individuos de las poblaciones evaluadas (95.62%). En comparación, Rodríguez Martínez y García de León (2004), encontraron mayor varianza genética dentro de poblaciones (71.66%) que entre poblaciones dentro de las especies (23.89%), esto muestra que en general las poblaciones tienden a compartir alelos de forma intrapoblacional.

Tabla 6. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)

| Fuente de variación | de GL | Suma de cuadrados | de Componentes de varianza | Porcentaje de variación |
|-----------------------|------------|-------------------|----------------------------|-------------------------|
| Entre poblaciones | 1 | 11.720 | 0.09620 | 4.38 |
| Dentro de poblaciones | 198 | 415.880 | 2.10040 | 95.62 |
| Total | 199 | 427.600 | 2.19660 | |

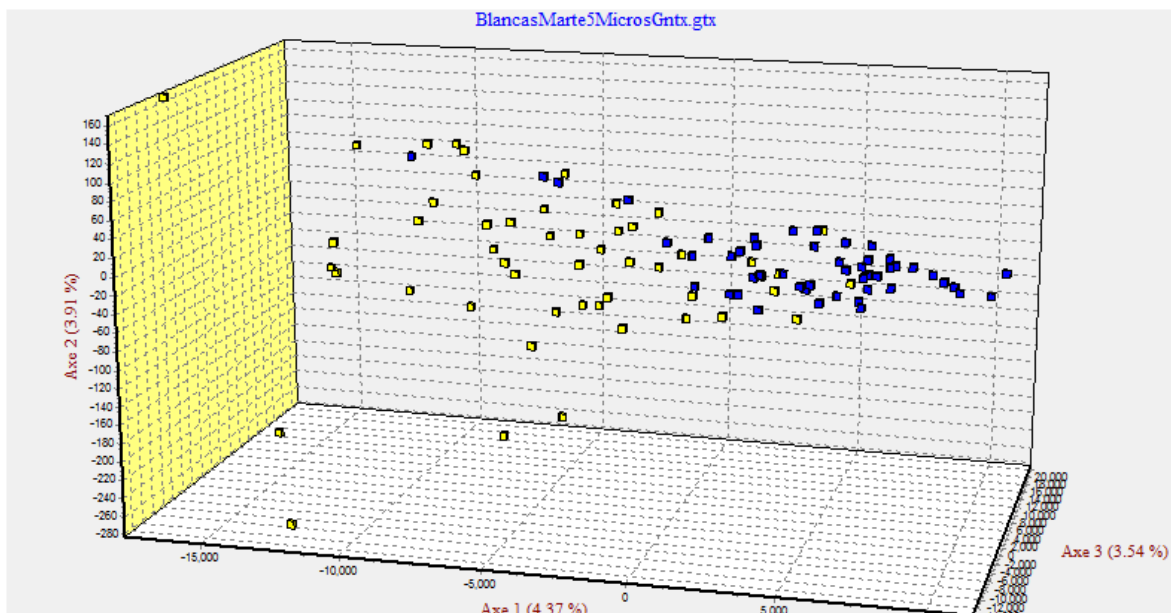
GL=grados de libertad.

6.5 Análisis factorial de correspondencia

Para la visualización de las diferencias entre poblaciones estudiadas, se realizó un análisis factorial de correspondencias, el cual permite explicar la variabilidad total de las poblaciones en función de distintos factores y cuantificar de qué manera cada factor contribuye a dicha variabilidad, equiparando de esta forma los factores a ejes de coordenadas, es posible representar gráficamente las Unidades Taxonómicas Operativas (OTUS) que para este estudio corresponden a las poblaciones de Las Blancas y Marte R. Gómez, comparando su posición respecto al resto.

Los resultados encontrados revelan un flujo genético constante entre ambas poblaciones, ya que las presas Las Blancas y Marte R. Gómez se encuentran unidas por un canal de interconexión empleado para el trasvaso de aguas entre dichas presas, adicionalmente se desconoce la existencia de programas de repoblamiento en las presas así como su periodicidad.

En la gráfica 1 podemos apreciar la tendencia hacia la formación de dos OTUS, la primera de ellas formada por la población de Las Blancas (puntos amarillos), y la segunda por la población de Marte R. Gómez (puntos azules). Los individuos de Las Blancas se encuentran más dispersos que los de la población de Marte R. Gómez, sugiriendo mayor diferenciación entre individuos dentro de la población a diferencia con respecto a la población de Marte R. Gómez, así mismo se observa incorporamiento de algunos individuos de ambas poblaciones a las OTUS contrarias, principalmente individuos de Marte R. Gómez sobre el espacio de Las Blancas, lo que posiblemente indica intercambio de material genético entre poblaciones. Esto puede ser porque ambas poblaciones compartan ancestros en común o por la conexión que existe entre ambas presas, ya que las presas Las Blancas y Marte R. Gómez se encuentran unidas por un canal de interconexión empleado para el trasvaso de aguas entre dichas presas, adicionalmente se desconoce la existencia de programas de repoblamiento en las presas así como su periodicidad y el índice de endogamia entre estas.



Gráfica 1. Análisis de Correspondencia. Los puntos amarillos corresponden a los individuos de la población Las Blancas; los puntos azules corresponden a los individuos de la población Marte R. Gómez.

7. CONCLUSIONES

Se colectaron 50 muestras de aleta dorsal de individuos *Micropterus salmoides*, provenientes de dos poblaciones del norte de Tamaulipas, se logró la genotipificación de los individuos muestreados con el panel de cinco microsatélites seleccionados. Los marcadores microsatélite empleados proporcionaron información suficiente para poder determinar el grado de variabilidad genética de *Micropterus salmoides*.

Ambas poblaciones mostraron mayor H_o que H_e en todos los locus, lo que indica déficit de heterocigotos. Los marcadores microsatélite presentaron desvío altamente significativo al equilibrio de H-W, excepto el locus TPW062 en la población de Marte R. Gómez.

El coeficiente de endogamia F_{IS} , reveló índices de endogamia alta para la población de Las Blancas y muy alta para la población de Marte R. Gómez.

A su vez el Análisis de Varianza Molecular mostro escasa diferenciación genética entre poblaciones, a su vez se determinó mayor variación genética dentro de los individuos de las poblaciones evaluadas.

8. IMPLICACIONES Y SUGERENCIAS

Dentro de una población, la diversidad genética se puede ver afectada por procesos evolutivos, ecológicos o reproductivos. Los valores elevados de endogamia pueden deberse a que el número de muestras analizadas no fue representativo o a un mal manejo de los embalses, como no respetar la época de veda, introducción de animales sin previo estudio del embalse, falta de registros, entre otros. Para la elaboración del presente estudio, no se contó con registros sobre la introducción de alevines o reproductores, se desconoce la existencia de programas que faciliten el monitoreo del flujo genético en las dos presas.

Se recomienda llevar un control de individuos introducidos a las presas, mediante registros, así como tener un mayor control en la época de veda. Para promover una alta diferenciación genética se recomienda intercambio de alevines y/o reproductores provenientes de otros cuerpos de agua; así mismo, se recomienda la realización de nuevos estudios dirigidos a la diferenciación de subespecies, de forma que se pueda realizar una selección genética más detallada para obtener las características de producción deseadas.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aranguren MJA, Román BR, Isea W, Villasmil Y, Jordana J. 2005. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. ALPA. 13 (1):1-6.

Arbeláez LM. 2010. Análisis de la diversidad intraespecie de *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans et al. por medio de marcadores morfológicos y genéticos. Tesis para Maestría en Biotecnología. Universidad nacional de Colombia sede Medellín.

Bailey RM. and CL, Hubbs. 1949. The black basses (*Micropterus*) of Florida, with description of a new species. University of Michigan Museum of Zoology Occasional Papers 516:1–40.

Beamesderfer and North JA. 1995. Growth, natural mortality, and predicted response to fishing for largemouth bass and smallmouth bass populations in North America. North American journal of fisheries management. 15: 688-704.

Beltrán AR, Sánchez PJ, Farías SA, Ramírez LJP. 2012. Aspectos reproductivos de la lobina negra (*Micropterus salmoides*) en la presa José López-Portillo, El Comedero, Sinaloa, México. Ciencia pesquera. 20: 65-75.

Botstein D, White RL, Skolnick M y Davis RW. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am J Hum Genet 32:314–331.

Cornide MT. 2000. Diversidad genética y marcadores moleculares. CNIC, La Habana.

Cheng HH, Crittenden LB. 1994. Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken. Poultry science. 73:539-546.

Davis JT, Lock JT. 1997. Largemouth bass biology and life history. Southern regional aquaculture center. No.200.

Falconer DS, Mackay TFC. 1996. Introducción a la genética cuantitativa. 4th ed. Longman Group Essex, Inglaterra.

Ferreira, M.y D. Gratapaglia. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. 1 ed. Brasilia: Embrapa-Cenargen. Pág. 220

Fisher RA. 1932. The genetical theory of natural selection. Oxford University Press, Londres.

Food and agricultura organization of the United Nations. 2013. Fish identification tools for biodiversity and fisheries assessments. FAO technical paper No. 585.

Fries MA.2010. Introgression, health, and condition of Florida, northern, and Fx hybrid largemouth bass in Louisiana water bodies. Thesis of Master of science.

Godoy JA. 2009. La genética, los marcadores moleculares y la conservación de las especies. Ecosistemas. 18 (1): 23-33.

Guttman SI y Berg D. 1998. Changes in the genetic diversity of aquatic organisms in the great lakes: causes and consequences. Setac News. p. 23-24.

Hartl DL y Clark AG. 1997. Principles of Population Genetics. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Massachusetts, USA.

Hedrick PW. 2005. Genetics of populations. Third edition. Jones and Bartlett publishers.

Johnson RL, Fulton T. 1999. Persistence of Florida largemouth bass alleles in a northern Arkansas population of largemouth bass, *Micropterus salmoides* Lacèpède. Ecology of Freshwater Fish. 8: 35-42.

Kassler TW et al. 2002. Molecular and morphological analyses of the black basses: Implications for taxonomy and conservation. American Fisheries Society Symposium 31:291-322.

Lopera BNM. 2008. Caracterización genética de lotes de peces usados en programas de repoblamiento y su importancia en la conservación genética en la piscicultura. *Zootecnia Tropical*, 26(4), pp. 515-522.

Lutz-Carrillo DJ, Nice CC, Bonner TH, Forstner MRJ, Fries LT. 2006. Admixture analysis of Florida largemouth bass and northern largemouth bass using microsatellite loci. *American fisheries society*. 135: 779-791.

Lutz-Carrillo DJ, Hagen C, Dueck LA, Glenn TC. 2008. Isolation and characterization of microsatellite loci for Florida largemouth bass, *Micropterus salmoides floridanus*, and other micropterids. *Molecular ecology resources*. 8: 178-184.

Mancera RNJ, Márquez EJ, Hurtado AJC. 2013. Biología molecular aplicada a la producción animal y la conservación de especies silvestres. 6:237-312.

Market CLF, Moller. 1959. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenic and species-specific patterns.

McLane WM. 1948. The seasonal food of the largemouth black bass, *Micropterus salmoides floridanus* (Lacepede), in the St. Johns River, Welaka, Florida. *Quart. J. Fla. Acad. Sci.* 10(4):102-138.

Moreira AA, Hilsdorf AWS, Silva JV, Souza DA. 2007. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microsatélites. *Pesqui Agropecu Brás.* 42(4):521-526.

Near TJ, Koppelman JB. 2009. Centrarchid Fishes: diversity, biology, and conservation. Chapter 1. Species diversity, phylogeny and phylogeography of centrarchidae. 1-38.

Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura FAO.2013. Fish identification tools for biodiversity and fisheries assessments.

Perales FLE, Sifuentes RAM, García de León FJ. 2007. Microsatellite variability analysis in farmed catfish (*Ictalurus punctatus*) from Tamaulipas, México. *Genetics and molecular biology*. 30 (3): 570-574.

Phillip DP, W F Childers, and G. S. Whitt. 1983. A biochemical genetic evaluation of the northern and Florida subspecies of largemouth bass. *Transactions of the American Fisheries Society* 112:1-20.

Picca A, Helguera M, Solomón N, Carrera A. 2004. Marcadores moleculares. *Biotecnología y mejoramiento vegetal*. 61-68.

Piñero D. 2008. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México. *Capital natural de México*. Vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. México: CONABIO, pp. 415-435

Porta JM, Martinez RG, Alvarez MC. 2006. Development of a microsatellite multiplex PCR for Senegalese sole (*Solea senegalensis*) and its application to broodstock management. *Aquaculture* 256: 159–166.

Povh JA, Lopera BNM, Ribeiro RP, Lupchinski E, Gómes PC y Lopes TS. 2008. Monitoreo genético en programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. *Ciencia e investigación agraria*. 35(I):5-15.

Ryman N., Utter F. y Laikre L. 1995. Protection of intraspecific biodiversity of exploited fishes. *Rev. Fish Biol.* 5, 417–446.

Rocha SPJ. 2003. Marcadores moleculares, una herramienta útil para la selección genética de palma de aceite. *PALMAS*. Vol. 24 No.2. 11-25.

Rochambeau H, Fournet HF, Vu Tien Khang J. 2000. Measuring and managing genetic variability in small populations. *Ann Zootech.* 49: 77-93.

Rodríguez MRI, García de León. 2004. Estudio genético y morfológico de las poblaciones de lobina negra (*Micropterus salmoides*) en Cuatrociénegas, Coahuila. Instituto Tecnológico de Cd. Victoria.

Romer AS. 1971. Vertebrate Paleontology. The university of Chicago. Tercera edición. 468.

ShengJie L, JunJie B, Lei C, DongMei M, F Du. 2012. The complete mitochondrial genomes of largemouth bass of the northern subspecies (*Micropterus salmoides salmoides*) and Florida subspecies (*Micropterus salmoides floridanus*) and their applications in the identification of largemouth bass species. Main Library: Informa Healthcare. 23: 92-99.

Secretaría de pesca. 1994. Cultivo de lobina. Colección nacional de manuales de capacitación.

Solís RLY y Torres AA. 2005. ¿Qué son los marcadores moleculares? La ciencia y el hombre. XVIII (1): 41-46.

Tapia GAL. 2010. Determinación de paternidad y relaciones genéticas en camarón blanco del Pacífico (*Penaeus (Litopenaeus) vannamei*) usando microsatélites. Tesis de maestría en ciencias.

Taylor AC, Sherwin WB, Wayne RK. 1994. Genetic variation of microsatellites loci in a bottlenecked species: the northern hairy-nosed wombat *Lasiorhinus krefftii*. Molecular ecology. 3: 277-290.

Tristan Marshall. 1998-2007. Cervus versión 3.0.3. Field Genetics Ltd.

Ulloa IJT, Benítez VA, Rodríguez ChG. 2005. Modelos de crecimiento en la lobina negra *Micropterus salmoides* (Lacèpède, 1802). Escuela nacional de ingeniería pesquera. Universidad Autónoma de Nayarit. 25-35.

Velasco MR. 2005. Marcadores moleculares y la extracción de ADN. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Vol.3 No.1. 14-18.

Yáñez AVO. 2002. Aislamiento y caracterización de marcadores moleculares microsatélites a partir de la construcción de librerías genómicas enriquecidas de camote (*Ipomoea batatas (L.)Lam.*). Tesis Profesional. Lima-Perú.

10. ANEXOS

ANEXO 1.- Protocolo de extracción de ADN con el kit comercial PROMEGA (adaptado para aleta a partir del protocolo de extracción de cola de ratón)

Por cada muestra procesada adicionar 120µl de EDTA 0.5M (pH 8) y 500µl de solución de Lisis, colocar la mezcla en hielo. La solución debe tornarse turbia (lechosa).

Cortar de 1 a 1.5cm de la aleta conservada en etanol y colocarla en un tubo de 1.5ml

Adicionar 600µl de la mezcla (EDTA 0.5M pH 8 y 500µl de solución de Lisis) a cada tubo conteniendo la muestra.

Adicionar 17.5µl de 20mg/ml de Proteinasa K

Incubar toda la noche a 55 °C con agitación leve o bien incubar por 3 horas con agitación (800 a 850rpm) y poner al vórtex la muestra cada hora hasta asegurarse que la muestra este completamente digerida.

Opcionalmente se puede agregar 3µl de RNAasa a la muestra lisada y mezclar la muestra por inversión de 2 a 5 veces. incubar la muestra de 15 a 30 minutos a 37 °C dejar reposar a temperatura ambiente 5 minutos antes de continuar.

Una vez que la muestra está a temperatura ambiente adicionar 200µl de solución de precipitación de proteína y poner al vórtex a alta velocidad por 20 segundos. Colocar en hielo por 5 minutos.

Centrifugar por 4 minutos a 14000 rpm. Las proteínas precipitadas formaran una pastilla blanca.

Remover cuidadosamente el sobrenadante conteniendo el ADN y transferirlo en un tubo nuevo de 1.5ml y agregar 600µl de isopropanol a temperatura ambiente

Mezclar suavemente la solución por inversión.

Centrifugar por 1 minuto a 14000rpm, el ADN será visible como una pastilla blanca. decantar el sobrenadante cuidadosamente.

Adicionar 600µl de etanol al 70% mezclar por inversión cuidadosamente. Centrifugar por 1 minuto a 14000rpm

Eliminar el etanol por inversión y secar la pastilla de ADN.

Adicionar 100µl de solución de rehidratación y rehidratar el ADN incubándolo a 65°C por 1 hora, incubándolo ya sea a temperatura ambiente o a 4 °C toda la noche.

Conservar el ADN de 2 a 8°C.

ANEXO 2.- Características de los subprogramas TD55 y TD60 del equipo Termociclador para la realización de PCR

TD55

1.-Incubar a 95°C por 5 min. 2.-Incubar a 95°C por 45 seg. 3.-Incubar a 62°C por 45 seg. Disminuir 2°C cada ciclo. 4.- Incubar a 72°C por 45 seg. 5.-Repetir desde el paso 2 por 5 veces. 6.-Incubar a 95°C por 45 seg. 7.-Incubar a 55°C por 45seg. 8.-Incubar a 72°C por 45 seg. 9.-Repetir desde el paso 6 30 veces. 10.-Incubar a 72°C por 10 min

TD60

1.-Incubar a 95°C por 5 min. 2.-Incubar a 95 °C por 45 seg. 3.-Incubar a 65°C por 45 seg. Disminuir 2°C cada ciclo. 4.-Incubar a 72°C por 45 seg. 5.-Repetir desde el paso 2 por 5 veces. 6.-Incubar a 95°C por 45 seg. 7.-Incubar a 60°C por 45seg. 8.-Incubar a 72°C por 45 seg. 9.-Repetir desde el paso 6 30 veces. 10.-Incubar a 72°C por 10 min.