

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

“DIVERSIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURA POBLACIONAL DEL
ROCOT MEXICANO *Sebastes macdonaldi* EN AMBAS COSTAS DE
LA PENÍNSULA DE BAJA CALIFORNIA, MÉXICO”

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
OCEANOLOGO
PRESENTA:
RAUL ADRIAN LEAL NAVARRO

ENSENADA, B. C., JUNIO DEL 2002

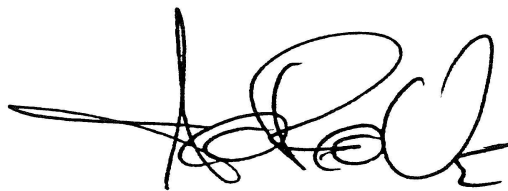
**“DIVERSIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURA POBLACIONAL DEL
ROCOT MEXICANO *Sebastes macdonaldi* EN AMBAS COSTAS DE
LA PENÍNSULA DE BAJA CALIFORNIA, MÉXICO”**

**T E S I S
QUE PRESENTA:
RAUL ADRIAN LEAL NAVARRO**

Aprobada por:



**DR. Axayácatl Rocha Olivares
Presidente del jurado**



**Dr. Jorge De la Rosa Vélez
Sinodal propietario**



**M. C. Roberto Escobar Fernández
Sinodal propietario**

RESUMEN

Con más de 70 especies en las costas del Pacífico oriental, los peces del género *Sebastes* son de gran interés evolutivo ya que su diversidad biológica y ecológica demanda el estudio de los mecanismos que han favorecido la especiación. En este trabajo se utilizan marcadores moleculares (microsatélites) para estudiar los procesos microevolutivos y estructura poblacional de una especie de *Sebastes* cuya distribución es aparentemente disjunta. Se determinaron los niveles de variabilidad y diferenciación genética de *Sebastes macdonaldi* de 4 localidades, 3 en el Pacífico y una en el Golfo de California, por medio de loci microsatelitales. Las hipótesis de trabajo planteadas fueron: 1) que las poblaciones estudiadas poseían altos niveles de variabilidad genética y 2) que estas poblaciones no estaban genéticamente diferenciadas. Para probar estas hipótesis se utilizaron 7 diferentes juegos de cebadores, encontrándose 6 loci polimórficos con un total de 78 clases de alelos, siendo los loci .2, .8 y .9 los que presentaron una mayor diversidad. Los valores de heterocigosidad para los loci .2, .3, .4, .8 y .9 fueron altas ($H_e > 0.5023$). Los organismos de Bahía de los Angeles dentro del Golfo de California se encontraron significativamente diferenciados ($\alpha \leq 0.05$) de los del Pacífico (Baja California y California, EEUU) en los análisis de diferenciación alélica y genotípica para los loci .3 y .9. Los valores del índice de fijación (F_{ST}) entre poblaciones fueron menores a 0.039, lo que nos indica una diferenciación genética muy incipiente entre las poblaciones estudiadas. Por lo anterior concluí que la diversidad genética entre las poblaciones fue alta y que la diferencia entre las poblaciones de Bahía de los Angeles y las del Pacífico está dada principalmente por el locus .3.

DEDICATORIA.

MIS ABUELAS que aunque ya no están físicamente, siempre están en mi corazón

MIS PADRES por las bases, la libertad y el aliento que siempre me dieron para seguir adelante.

MIS HERMANAS (Chivis, Pata y mi Piojora), por el apoyo y comprensión que siempre me brindaron.

A KAREL, porque has estado conmigo apoyándome y jalándome las orejas cuando ha sido necesario (TE AMO)

TIO PEPE lo logré!

A toda mi familia por las palabras de aliento

A Edgar y Angel por el apoyo al llegar y a aquellas largas platicas que tuvimos (a veces con chelas), siempre fueron motivantes.

A los Sharkologos (Daniel, Julio, Popoca, Quiquillo, Mazatleco, Giaco, Picos, etc.) mi generación y a los Orcas (Miguel, Stephen, Melisa, Lorena, Marina, Ivette, Grisel, Cristina, etc.) que me adoptaron en la suya por algunos semestres

A los P&B (Carlos, Chava, Gerardo, Camilo, Alfredo, Toño, Francisco, Tigre y los demas) por haber aguantado a este chilango

Y a todas las personas que me ayudaron a soñar con este momento.

AGRADECIMIENTOS.

Como las cosas no las podía hacer yo solo quiero darles las gracias a:

A mis padres y Hermanas por estar conmigo siempre.

A Karel por apoyarme

Al Dr. Rocha, por la dirección de este trabajo (a pesar de los jalones de orejas)

Al Dr. De la Rosa y al M. en C. Escobar, por sus atinadas observaciones para enriquecer este trabajo.

A Carol y Eric del NOAA Southwest Fisheries Science Center por las facilidades otorgadas al trabajar en su laboratorio

A la FCM por haberme dado la preparación para poder enfrentar los retos de la vida.

Al Dr. Stephano porque me enseñó a dedicarle tiempo a esto (A MORIR!!!!!!).

A la maldita Voca 6 por haberme dado las bases para trabajar en un laboratorio.

A los profesores que me ayudaron a crecer desde que empecé esta carrera

ÍNDICE.

	Página
RESUMEN	i
LISTA DE TABLAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS.....	9
OBJETIVOS	10
ÁREA DE ESTUDIO	11
METODOLOGÍA	13
Recolecta.....	13
Extracción de ADN	13
Amplificación de ADN	14
Determinación de Genotipos	15
Análisis de Datos	16
<i>Diversidad genética</i>	16
<i>Diferenciación poblacional</i>	17
RESULTADOS	18
<i>Diversidad genética</i>	18
<i>Diferenciación poblacional</i>	22
DISCUSIÓN	27
<i>Diversidad genética</i>	27
<i>Diferenciación poblacional</i>	28
<i>Integración</i>	31
CONCLUSIONES	33
REFERENCIAS	34
APÉNDICE I	38
APÉNDICE II	43
APÉNDICE III	47

LISTA DE TABLAS.

	Página
Tabla I. Tamaños de Muestra	13
Tabla II. Secuencias de cebadores	14
Tabla III. Diluciones realizadas	15
Tabla IV. Media y Varianza para cada loci	19
Tabla V. Heterocigocidad y Rho	23
Tabla VI. Diferenciación génica para cada loci	24
Tabla VII. Diferenciación génica para poblaciones apareadas	24
Tabla VIII. Diferenciación genotípica para cada loci	25
Tabla IX. Diferenciación genotípica para poblaciones apareadas .	25
Tabla X. Valores F_{st} y R_{st} para cada loci	26
Tabla XI. Valores F_{st} para poblaciones apareadas	26
Tabla XII. Valores R_{st} para poblaciones apareadas	27
Tabla XIII. Recetas de los cocteles.....	42

LISTA DE FIGURAS.

	Página
Fig. 1. Rocot mexicano (<i>Sebastes macdonaldi</i>)	2
Fig. 2. Distribución mundial del género <i>Sebastes</i>	4
Fig. 3. Distribución de <i>Sebastes macdonaldi</i>	7
Fig. 4. Localidades de muestreo	12
Fig. 5. Histograma de frecuencias de los alelos .2, .3 y .4	20
Fig. 6. Histograma de frecuencias de los alelos .6, .8 y .9	21

INTRODUCCIÓN.

La distribución geográfica contemporánea de las especies es producto de su historia evolutiva. De esta manera, la biogeografía es la ciencia que se encarga de describir y explicar las particularidades de la distribución geográfica de los seres vivos (plantas o animales). Al lugar de aparición de una especie se le conoce como su centro de origen, de este sitio una especie se puede propagar hasta que se detiene al encontrarse con una barrera física o biológica (Villem, 1988). En el caso de los peces y otros organismos marinos las principales barreras físicas que encuentran son masas de agua inadecuadas (definidas por sus condiciones de salinidad, temperatura, oxígeno, nutrientes, etc), tierra firme (p.ej. continentes), o bien grandes distancias de mar abierto para organismos con hábitats costeros. La mayoría de los peces poseen estadios larvarios planctónicos, los cuales deben de encontrarse en el lugar y tiempo adecuados para sobrevivir y poder asentarse al hábitat juvenil y adulto, y así reclutarse a la población. Entre las distribuciones biológicas, aquellas que resultan más interesantes son las que no abarcan un territorio continuo sino que están compuestas por parches o grupos de poblaciones separadas por áreas en donde la especie está ausente. Tal es el caso del rocot mexicano *Sebastes macdonaldi* (Fig. 1) cuya distribución va desde la parte central de California hasta Baja California (en el Pacífico) y algunas regiones del Golfo de California (Bahía de los Angeles, B. C. y Guaymas, Son) (Thomson *et al.*, 2000).



Fig. 1. Rocot mexicano (*Sebastes macdonaldi*, Eigenmann y Beeson, 1893)

El género *Sebastes* (Rocots) posee más de 100 especies alrededor del mundo y ocupa hábitats que van desde Kyushu, Japón hasta Baja California y el golfo de California en el Pacífico norte (Chen, 1971; Eschemeyer y Herald, 1983; Masuda *et al.*, 1984). Su distribución (Fig. 2) abarca la parte norte del Océano Atlántico llegando hasta aguas noruegas (Templeman, 1959) y, en el hemisferio sur, cubriendo las costas de Perú, Chile y Argentina, en el Pacífico (Chen, 1971; Kong Urbina, 1985), y las costas de Sudáfrica, en el Atlántico (Eschemyer y Hureau, 1971; Andrew *et al.*, 1995). Este género contribuye sustancialmente a la biodiversidad marina en el Pacífico alcanzando un alto grado de simpatria y ocupando una gran variedad de hábitats, (Eschemeyer y Herald, 1983). Con más de 70 especies en las costas del Pacífico oriental, los peces del género *Sebastes* son de gran interés evolutivo ya que su diversidad biológica y ecológica demanda el estudio de los mecanismos que han favorecido la especiación en este grupo. Los miembros del género *Sebastes* comparten las siguientes características biológicas: son de fecundación interna (Wourms, 1991), son vivíparos matrotróficos (Boehlert *et al.*, 1991), y además, tienen un estadio larvario planctónico seguido por un estadio juvenil pelágico, que se transforma en un juvenil bentónico antes de madurar en adulto (Love *et al.*, 1991; Moser y Boehlert, 1991). Como grupo exhiben una gran diversidad de formas, color y modo de existencia, algunos siendo fundamentalmente bentónicos y otros ocupando, en mayor o menor grado, la columna de agua

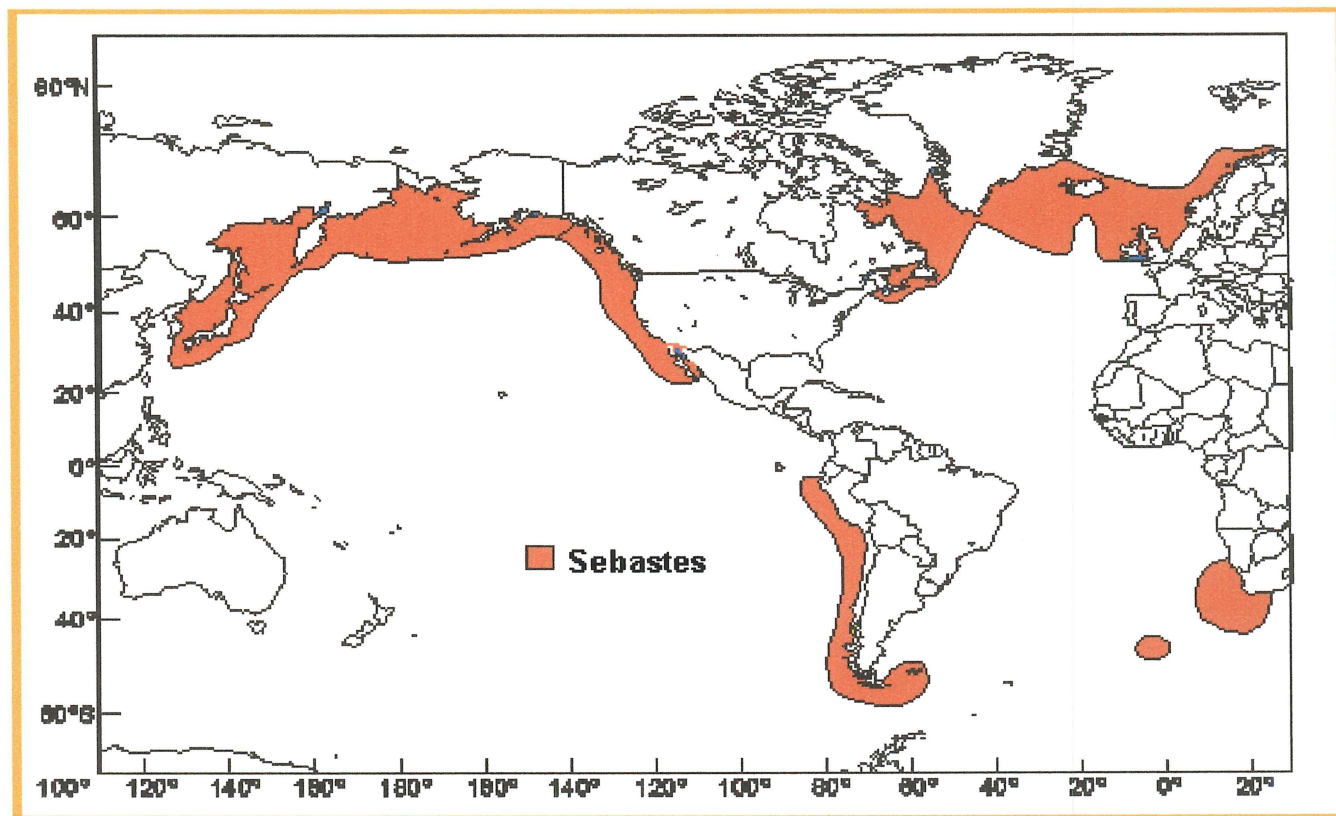


Fig. 2. Distribución mundial del género *Sebastes*.

(Moser, 1972). Los rocots son también de importancia ecológica; los adultos y estadios juveniles constituyen un importante eslabón en la transferencia de materia y energía entre las cadenas pelágicas y bentónicas (Ainley *et al.*, 1993). Muchas especies de *Sebastes* son parte importante de la pesca deportiva y comercial. De hecho, los stocks de algunas especies ya se han catalogado como sobre-explotados (Love *et al.*, 1998). La interpretación de los efectos a corto y largo plazo de un esfuerzo pesquero sobre stocks explotados, pueden darnos un mejor entendimiento de los mecanismos que tienen influencia sobre la estructura genética de sus poblaciones (Rocha-Olivares y Vetter, 1999).

En los noventas el desarrollo de técnicas de biología molecular, entre ellas las de amplificación de ADN mitocondrial (ADNmt) y el uso de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), ayudó al estudio de las estructuras taxonómicas y poblacionales de *Sebastes*. Sin embargo, estas técnicas no daban el poder de resolución deseado, por lo que se buscó el desarrollar otras metodologías más específicas, y así, en 1998, se aplicó la secuenciación de nucleótidos en el citocromo *b* y parte de la región control de la molécula de ADNmt, particularmente con miembros del subgénero *Sebastomus* (Kendall, 2000). Estos datos fueron utilizados para tratar de resolver preguntas taxonómicas y de sistemática. En el caso de las especies del género *Sebastomus* se encontró que hay bajos niveles de divergencia genética entre

ellas, lo que sugiere que este grupo de rocos se originaron durante el último millón de años (Rocha-Olivares *et al.*, 1999).

Otra técnica molecular que se usa actualmente son los llamados VNTR (número variable de repeticiones en tándem), que son secuencias de ADN repetitivas que pueden variar de tamaño debido a la inserción o supresión de motivos repetitivos durante la replicación del ADN. Los VNTR se pueden dividir en distintas categorías, dependiendo del tamaño de estas secuencias repetitivas. Por ejemplo, los de un tamaño de 1-10 pares de bases (pb), usualmente de 2 a 5 pb, son llamados microsatélites; las secuencias repetitivas con tamaños mayores son llamadas minisatélites (10-100 pb). Una particularidad de los microsatélites, que facilitan su utilización, es que las unidades de repetición son flanqueadas por frecuencias conservadas. Sin embargo, su característica más importante es que son marcadores altamente polimórficos, debido a sus altas tasas de mutación (Hillis *et al.*, 1996; Baker, 2000). Además también son lo suficientemente variables para permitir la identificación de los individuos presentes en una población, por lo que son de gran ayuda en el campo de la Ecología (Baker, 2000).

S. macdonaldi tiene la distribución más al sur que cualquier otra especie de *Sebastes* del Pacífico norte oriental (Moser, 1972); se extiende de Punta Sur (California central, E. U. A) hasta Baja California, en el Pacífico, y también en Bahía de los Angeles, B. C. y Guaymas, Sonora, en el alto Golfo de California (Fig. 3). Regularmente se encuentra a profundidades entre los 90 y 230 m

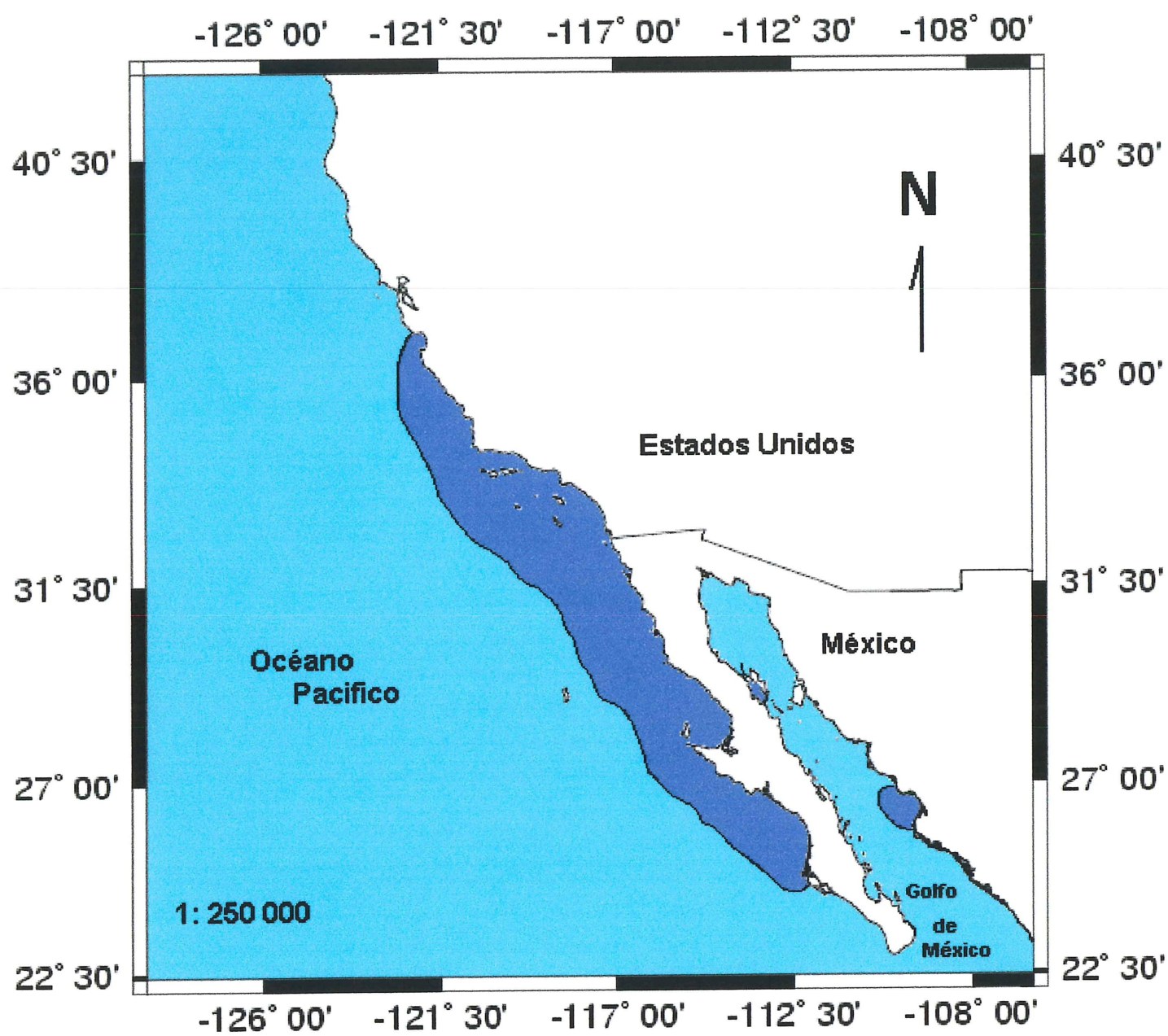


Fig. 3. Intervalo de distribución de *Sebastes macdonaldi*.

(Eschmeyer y Herald, 1983, Thomson *et al.*, 2000). Su distribución extrema sugiere que tiene adaptaciones fisiológicas particulares. Desafortunadamente no se conoce todo el ciclo de vida de *S. macdonaldi*; sólo se han descrito algunos aspectos de su estadio larvario tales como la diferenciación morfológica de larvas congénicas, así como la distribución geográfica y abundancia (Moser, 1972). En este estudio se determinaron los niveles de variabilidad y diferenciación genética de *S. macdonaldi* en localidades de ambas costas de la Península de Baja California.

HIPÓTESIS.

Diversidad genética.

Ho₁: Las poblaciones estudiadas poseen altos niveles de variabilidad genética.

Ha₁: Las poblaciones estudiadas no poseen altos niveles de variabilidad genética.

Ho₂: Los loci se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg en cada población.

Ha₂: Los loci no se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg en cada población.

Estructura poblacional.

Ho₃: Los genotipos de un locus son independientes de los genotipos de cualquier otro locus.

Ha₃: Los genotipos de un locus no son independientes de los genotipos de cualquier otro locus

Ho₄: Las poblaciones estudiadas no están genéticamente diferenciadas.

Ha₄: Las poblaciones estudiadas están genéticamente diferenciadas.

Ho₅: La distribución alélica es idéntica entre poblaciones.

Ha₅: La distribución alélica no es idéntica entre poblaciones.

H_{06} : La distribución genotípica es idéntica entre poblaciones.

H_{a6} : La distribución genotípica no es idéntica entre poblaciones.

OBJETIVOS.

Los objetivos principales del trabajo son:

1. Estimar los niveles de variabilidad genética del rocot Mexicano (*Sebastes macdonaldi*, Eigenmann y Beeson, 1893) por medio de microsatélites, a partir de organismos provenientes de cuatro localidades en su rango de distribución.
2. Cuantificar el grado de diferenciación genética y aislamiento reproductivo entre dichos organismos alopátricos.
3. Integrar estos resultados a una base de datos moleculares ya existente para estas muestras

Objetivos Particulares:

- ◆ Probar los cebadores diseñados para otras especies de *Sebastes*.
- ◆ Determinar genotipos individuales.
- ◆ Cuantificar la heterocigosidad de loci microsatelitales
- ◆ Cuantificar el grado de diferenciación genética entre las localidades.

DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO.

Comprende cuatro localidades de recolecta, tres en el Pacífico y una en el Golfo de California (Fig. 4). La primera localidad en el Océano Pacífico se localiza en la costa de California, Estados Unidos, aproximadamente a los 32° 40' de latitud norte y los 117° 30' de longitud oeste. Esta localidad recibe el nombre de Grossberg (GRS). En México, las muestras provienen de un pequeño archipiélago llamado Isla San Benito (ISB), que se localiza entre los 28° 59' de latitud norte y los 113° 26' de longitud oeste, a 32 Km al noroeste de Isla de Cedros. Esta fue la segunda localidad de muestreo. La tercera, es denominada, "Uncle Sam Bank" (USB) que se localiza entre los 25° 35.99' de latitud norte y los 113° 22.36' de longitud oeste. Estos tres lugares se encuentran afectados por la corriente fría de California durante primavera y verano, y, en el otoño e invierno, existe una contracorriente de aguas cálidas llamada Contracorriente de Davidson.

En el Golfo de California, la población de estudio habita en los alrededores de Bahía de los Angeles (BLA), en la costa oeste, entre los 28° 54' y 29° 03' de latitud norte y de 103° 30' a 113° 35' de longitud oeste. Esta bahía se encuentra parcialmente separada del Golfo de California por la isla Ángel de la Guarda. En esta región se genera una fuerte turbulencia debido al esfuerzo del viento, y la circulación está dominada por efecto de la marea, principalmente (Amador- Buenrostro *et al.*, 1991).

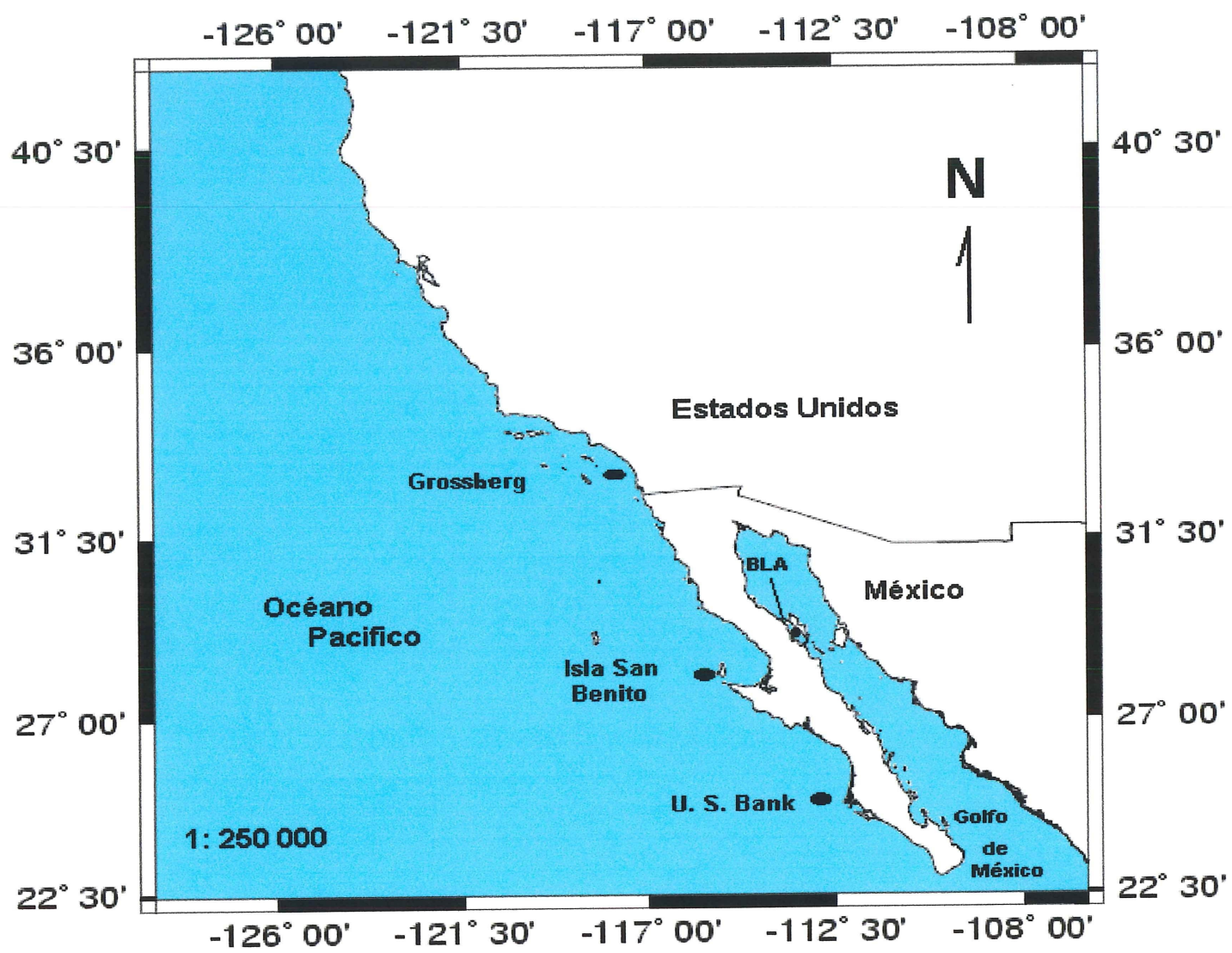


Fig. 4. Localidades de muestreo (GRS, ISB, USB y BLA).

METODOLOGÍA.

RECOLECTA

Los organismos se capturaron con línea y anzuelo a profundidades aproximadas de 200 m, durante el período comprendido entre marzo de 1995 y marzo del 2002. El número de muestras y la localidad de procedencia se muestran en la tabla I. Posterior a la captura, las muestras de tejido (músculo e hígado) se conservaron en etanol al 95% y se almacenaron a temperatura ambiente en el campo y a 4°C en el laboratorio.

Tabla I. Tamaño de muestra y localidad de procedencia.

Localidad	Período de recolecta	Tamaño de muestra
Grossberg	Marzo-2000/ Marzo-2002	14
Isla San Benito	Agosto-1996	8
Uncle Sam Bank	Agosto-1996	45
Bahía de los Angeles	Marzo-1995/ Agosto-1995	44

EXTRACCIÓN DE ADN.

Se extrajo y purificó ADN genómico total a partir de 25-100 mg de músculo o hígado utilizando DNAzol (Ver apéndice IA). El ADN genómico de algunas muestras se utilizó por completo durante el experimento por lo que fue necesario extraer ADN nuevamente, utilizando otros protocolos de extracción (Ver apéndices IB y IC).

AMPLIFICACIÓN DE ADN.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) se llevó a cabo con cebadores previamente diseñados (Vetter, comunicación personal), para *Sebastes rastrelliger* (Tabla II), y marcados fluorescentemente (Perkin Elmer; ABI).

Tabla II. Secuencias de los cebadores utilizados.

Locus	Forward	Reverse
.1	CTT GCT ACT GCA GAG TGA CTA G	CCT CAT AAT AGA GCT TGT AAT AAC G
.2	GAA CAT CCC TCC TTC CGA CGC	GTC AAA CAA CTG CAG AAT GTT CG
.3	GCA TGA AAG TGT ATG AAA GGC	CAT GTG ATT CTG TGT CTA ACT GAG
.4	GAC CTT TCC CTG AAC ACA CTC G	CAA GAG GCG GTG GTG CTG ATG G
.6	CTT GCA GGT AAC GGG AAG G	GGC TGA TGA CAT TGC AAC CTT G
.8g	CCA TCT GTG CTG AGC TGT CAC TG	GAG AAG AGG CCT ACA AGT ACC
.9	GGA GAT GTG CGT GGC TCG TCT GG	GGG TTT ACT CAT TGT AGA C

Se prepararon cinco cocteles de PCR usando reactivos que se encuentran en el kit BRL PCR Reagent System (Gibco BRL). Los cebadores .1/.2 y .3/.6 se procesaron simultáneamente en PCR multiplex, ya que sus características lo permiten; mientras que los cebadores .4, .8g y .9, se procesaron por separado. De esta forma se probaron siete diferentes pares de cebadores correspondientes a siete loci microsatelitales.

Las reacciones se sometieron a una desnaturalización inicial por 2:30 minutos a 90°C, seguida por 35 ciclos de 95°C por 45 segundos, 57°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto. La extensión final fue de 72°C por 5 minutos, y se

incubaron, finalmente, a 4 °C por tiempo indefinido. Se empleó un termociclador PTC-200 de Applied Biosystems

Se corroboró la presencia del producto amplificado, por medio de una electroforesis en minigeles de agarosa al 1.5%, a 80 V por 20-30 minutos, para cada uno de los cebadores utilizados, usando 3 µl del producto de PCR.

DETERMINACIÓN DE GENOTIPOS.

Una vez obtenidos los productos del PCR, se hicieron diluciones (Tabla III), a las cuales se les aplicó una electroforesis con geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 6%. El desplazamiento de las bandas resultantes fue detectado mediante un secuenciador automático (Gene Analyzer ABI 377). Los productos fueron medidos usando el programa GeneScan 3.3 con ayuda de una escalera fluorescente (Rox 500) cargada en cada carril experimental.

Tabla III. Diluciones realizadas para cada locus microsatelital.

Cebador	µl de producto de PCR	Dilución
.1/.2	1	1:10
.4	5	1:2
.9	1	1:10
.3/.6	1	1:10
.8g	5	1:2

ANÁLISIS DE DATOS.

En lo sucesivo, la localidad GRS se denominará localidad CAL, mientras que a las localidades ISB y USB se les denominará BAJA.

Diversidad genética.

Una vez obtenidos los cromatogramas¹, se estimaron los tamaños de los alelos, para después calcular el número de repeticiones que corresponde a cada uno de los loci probados. Con el número de repeticiones obtenido para cada locus y organismo, se realizaron los siguientes análisis estadísticos para probar las hipótesis nulas planteadas.

Se calculó la frecuencia de alelos para cada locus, en cada una de las localidades. Una vez determinada la distribución de alelos por locus, se realizó la prueba de Hardy-Weinberg para verificar si los loci de cada población se encontraban en equilibrio. El nivel de significancia se calculó mediante el método de cadena de Markov, usando los valores recomendados para el número de dememorización (1000), el número de grupo (100) y para el número de iteraciones por grupo (1000).

Otros índices calculados fueron la heterocigosidad (H_e) y la Rho. Estas estimaciones se obtuvieron de acuerdo a Weir y Cockerham (1984) y Robertson y Hill (1984).

¹ Que son una representación gráfica de las intensidades de fluorescencia registradas por el instrumento a lo largo de la electroforésis.

Diferenciación poblacional.

Para calcular el desequilibrio genotípico, se realizó una prueba para cada par de loci, en cada una de las localidades. Para estimar la diferenciación entre poblaciones, se usaron dos pruebas: una que involucró la distribución alélica de las muestras (diferenciación génica) y la otra que involucró la diferenciación genotípica en las poblaciones. La prueba de diferenciación génica nos da un estimado no sesgado del nivel de significancia de la prueba de probabilidad descrita en Raymond y Rousset (1995), mientras que para la diferenciación genotípica se basa en la prueba exacta G de Goudet *et al.* (1996). Se estimaron valores F_{st} mediante la aproximación a un análisis de varianza (Cockerham, 1973; Weir y Cockerham, 1984). La medida análoga de correlación en el tamaño ponderado del alelo (Rho_{st}) fue estimada de la misma forma (Michalakis y Excoffier, 1996), tomando en cuenta el tamaño o longitud de los alelos expresados como el número de repeticiones en tándem.

RESULTADOS.

Se probaron siete diferentes juegos de cebadores ya diseñados para otra especie del género *Sebastes*, por lo que se realizaron pruebas preliminares con cada uno de los juegos para verificar si trabajaban correctamente. Se encontraron problemas con algunos de estos cebadores (.1, .4 y .9), por lo que fue necesario modificar las concentraciones iniciales de cada uno de estos (de 1X a 1.5X), con lo que se obtuvieron mejores resultados.

Diversidad genética.

De los siete loci analizados, .1, .2, .3 y .4 son dinucleótidos, .6 fue trinucleótido y .8 y .9 fueron tetranucleótidos. En el apéndice II se muestra el número de repeticiones calculado para cada uno de los loci. Del número de repeticiones para cada uno de éstos, observamos que el locus .1 resultó ser monomórfico, mientras que el resto presentó polimorfismos.

En la distribución del tamaño de alelos para cada locus (Figuras 5 y 6), observamos que los tamaños de los alelos del locus .2 tienen un intervalo de distribución entre 148 y 200 pb y se observaron dos modas (160 y 172 pb), siendo la media de 167pb. Para el locus .3 observamos también dos modas (188 y 198 pb) con un intervalo de distribución de sólo 12 pb y una media de 192 pb. El locus .4 presenta una distribución bimodal (160 y 184 pb), en donde estos tamaños de los alelos contienen el 85% de las frecuencias. En el locus .6 encontramos solamente dos tamaños de alelos (269 y 272 pb), por lo que después del locus .1 éste es el que presenta la menor cantidad de

polimorfismos. El locus .8 presenta una distribución en tamaños uniforme parecida a una distribución normal (entre 212 y 248 pb) con una mayor frecuencia en los tamaños 228, 232 y 236 pb. El locus .9 presenta una distribución bimodal (314 y 326 pb) con un intervalo de tamaños entre 310 y 362 pb. Los valores de varianza presentan características muy peculiares (Tabla IV); en el caso del locus .2 la varianza es ligeramente menor que la media, debida al amplio rango de distribución en el tamaño de los alelos; mientras que para el locus .6 observamos la menor varianza, ya que éste presenta sólo dos tamaños de alelos.

Tabla IV. Media y Varianza calculada para cada uno de los loci analizados.

Locus	Media	Varianza
.2	167.4515	114.6560
.3	191.8752	25.3141
.4	173.4824	54.7751
.6	269.5983	2.0098
.8	236.6900	20.7092
.9	326.3592	201.0423

Al realizar la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg para cada uno de los loci en las tres localidades analizadas, no se obtuvieron valores significativos ($\alpha=0.05$); por lo que no se rechaza la hipótesis nula de que las poblaciones de cada una de las localidades se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg para los loci estudiados.

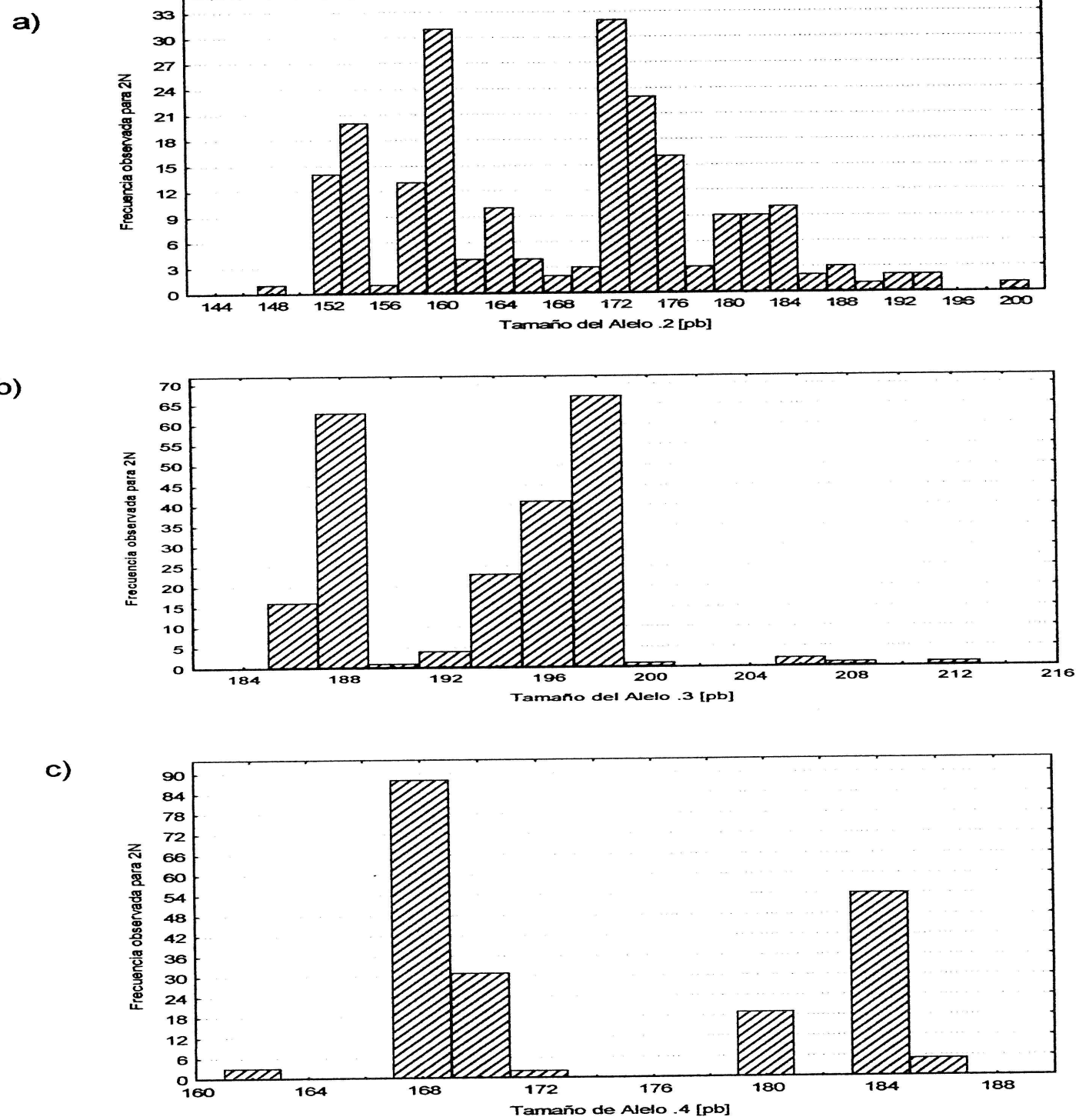


Fig. 5 Histograma de frecuencias del tamaño de alelo, a).2, b).3 y c).4

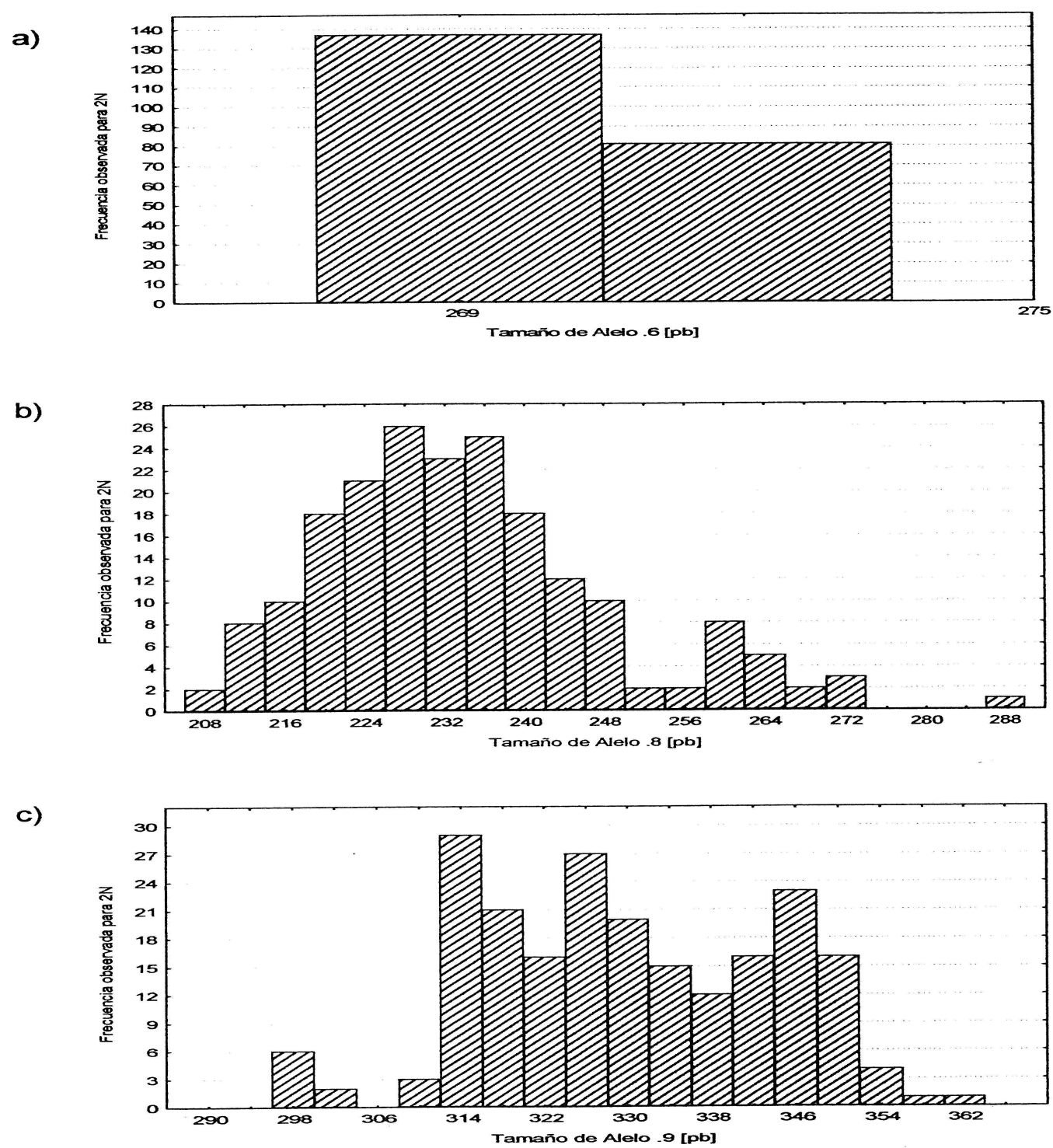


Fig. 6. Histograma de frecuencias del tamaño de alelo, a).6, b).8 y c).9

La H_e se calculó para cada uno de los alelos en cada una de las poblaciones, encontrándose $H_e > 0.9$ para los loci .2, .8 y .9 (Tabla V). El locus con menores valores de H_e fue .6 ($H_e < 0.51$) en las tres localidades analizadas. El valor rho, presentado en la tabla V, se calculó como el promedio cuadrado de la diferencia en el tamaño de cada uno de los loci, siendo mayor en los loci .2, .4, 8 y .9 ($Rho > 16.8$).

Diferenciación poblacional

Como resultado de la prueba de desequilibrio de ligamiento no se obtuvieron valores significativos en ningún caso ($P > 0.05$), por lo que la hipótesis nula de que los genotipos de un locus son independientes de los genotipos de otro locus y que los loci no se encuentran en desequilibrio de ligamiento, no pudo ser rechazada.

En el caso de la diferenciación génica entre poblaciones se realizaron dos análisis, el primero que consideró tres localidades (BLA, BAJA y CAL), mientras que el segundo consideró únicamente dos (BLA y BAJA+CAL). Los resultados obtenidos para cada uno de estos casos se presentan en la tabla VI (para todas las poblaciones en conjunto) y en la tabla VII (para cada comparación pareada).

En la tabla VI sólo se observan valores significativos ($\alpha = 0.05$) para los loci .3, .4 y .9 considerando dos localidades. De la tabla VII observamos que la comparación pareada de tres localidades, arroja valores significativos para el locus .3, .4 y .9 en el caso BLA-BAJA, y lo mismo ocurre al fusionar CAL+

Tabla V. Valores de heterocigosidad (*He*) y Rho, calculados para cada locus en cada una de las localidades
Locus

Localidades	<i>He</i>						Rho					
	.2	.3	.4	.6	.8	.9	.2	.3	.4	.6	.8	.9
CAL	0.9039	0.6511	0.5907	0.5055	0.9295	0.9203	74.4890	9.5220	29.7143	0.5055	24.7244	16.8132
BAJA	0.9137	0.7480	0.5023	0.4687	0.9099	0.9037	57.8669	13.3494	23.3773	0.4687	22.7836	22.6431
BLA	0.9120	0.7817	0.6536	0.4727	0.9160	0.9140	63.9210	13.1225	33.8693	0.4727	33.0782	28.4549

BAJA, tomando dos localidades. En estos casos rechazamos la hipótesis nula, por lo que la distribución alélica de estos loci es significativamente diferente entre las localidades.

Tabla VI. Significancia de las pruebas de diferenciación génica para cada uno de los loci.

Locus	3 localidades (BLA, BAJA, CAL)		2 localidades (BLA, BAJA+CAL)	
	P-value	S. E.	P-value	S. E.
.2	0.6292	0.0190	0.5769	0.0154
.3	0.0591	0.0078	0.0011	0.0005
.4	0.2125	0.0124	0.0460	0.0052
.6	0.8246	0.0045	1.0000	0.0000
.8	0.2652	0.0140	0.1326	0.0093
.9	0.2060	0.0123	0.0299	0.0043

S.E.= Error Estándar

Tabla VII. Significancia de los análisis de diferenciación génica para poblaciones pareadas.

No. Localidades.	Comparaciones	Locus					
		.2	.3	.4	.6	.8	.9
3	BLA-BAJA	0.5123	0.0109	0.0444	1.0000	0.1239	0.0229
3	BAJA-CAL	0.5856	0.9682	0.5722	0.6631	0.5747	0.8675
3	BLA-CAL	0.6098	0.0741	0.8907	0.6560	0.6625	0.5498
2	(CAL+BAJA)-BLA	0.6021	0.0009	0.0478	1.0000	0.1184	0.0413

En el análisis genotípico se tomaron en cuenta las mismas consideraciones que para el análisis génico; se trabajó con tres localidades y después se volvieron a calcular estos valores con 2 localidades. En la tabla VIII podemos observar valores significativos ($\alpha=0.05$) para los loci .3, .9 y para todos los loci simultáneamente considerando dos localidades. La tabla IX nos muestra los resultados del análisis genotípico por poblaciones pareadas, resaltando los casos .3 (BLA-BAJA y CAL-BLA), .9 (BLA-BAJA), y el caso BLA-

BAJA tomando todos los loci. Para este mismo análisis considerando dos localidades se observan valores significativos para los loci .3, .8, .9 y el de todos los loci simultáneamente.

Tabla VIII. Significancia de las pruebas de diferenciación genotípica obtenida para cada uno de los loci

Locus	3 localidades (BLA, BAJA, CAL)		2 localidades (BLA, BAJA+ CAL)	
	P-value	S. E.	P-value	S. E.
.2	0.4550	0.0183	0.5895	0.0127
.3	0.0666	0.0067	0.0032	0.0009
.4	0.1580	0.0087	0.0761	0.0040
.6	0.8716	0.0026	0.8945	0.0018
.8	0.2794	0.0176	0.1377	0.0080
.9	0.3080	0.0185	0.0386	0.0042
Todos	0.1975		0.0049	

S. E.= Error Estándar

Tabla IX. Significancia de los análisis de diferenciación genotípica para poblaciones pareadas.

No. Localidades	Comparaciones	Locus						Todos
		.2	.3	.4	.6	.8	.9	
3	BLA-BAJA	0.4046	0.0179	0.0580	1.0000	0.0943	0.0412	0.0087
3	BAJA-CAL	0.2934	0.9047	0.5864	0.6705	0.5741	0.9093	0.9249
3	BLA-CAL	0.5835	0.0434	0.5610	0.6783	0.7343	0.5234	0.5121
2	CAL+BAJA-BLA	0.6062	0.0033	0.0681	0.8929	0.1499	0.0426	0.0053

Los índices de fijación basados en las frecuencias alélicas (F_{st}), se presentan en la tabla X y nos muestran valores de diferenciación bajos para todos los loci considerando tres poblaciones. De la misma forma la prueba de correlación intraclase usando el tamaño de alelos arrojó los resultados presentados en esta misma tabla (R_{st}), en donde podemos observar valores de diferenciación menores al 9% para todos los loci en ambas consideraciones.

Tabla X. Valores F_{st} y R_{st} obtenidos para cada uno de los loci utilizados.

No. Localidades	Estadístico	Locus						Todos
		.2	.3	.4	.6	.8	.9	
3	F(st)	-0.0038	0.0283	0.0230	-0.0145	0.0014	0.0041	0.0066
2	F(st)	0.0005	0.0394	0.0204	-0.0108	0.0053	0.0089	0.0113
3	Rho (st)	0.0114	0.0626	0.0307	-0.0145	-0.0084	-0.0116	0.0128
2	Rho (st)	0.0217	0.0845	0.0207	-0.0108	-0.0054	-0.0057	0.0189

Los valores de F_{st} y R_{st} fueron calculados también para poblaciones pareadas (considerando 3 y 2 localidades) y los resultados se presentan en las tablas XI y XII, respectivamente. De la tabla XI podemos observar valores $F_{st} < 0.040$ en todas las consideraciones para 3 y 2 localidades. Al estimar el valor R_{st} como la media ponderada del análisis de varianza observamos también valores menores a 0.0738, al considerar ambos valores F_{st} y R_{st} encontramos niveles bajos de diferenciación.

Tabla XI. Valores F_{st} obtenidos para las poblaciones pareadas

No. Localidades	Comparaciones	Locus						Todos loci
		.2	.3	.4	.6	.8	.9	
3	BAJA-BLA	-0.0005	0.029	0.036	-0.0126	0.0049	0.0104	0.0113
3	BAJA-CAL	-0.0122	-0.0094	0.024	-0.0156	-0.008	-0.0086	-0.0062
3	BLA-CAL	-0.0058	-0.068	-0.0175	-0.0204	0.0012	-0.0038	0.0058
2	(BAJA+CAL)- BLA	0.0005	0.0394	0.0204	-0.0108	0.0053	0.0089	0.0113

Tabla XII. Valores de R_{st} obtenidos para poblaciones apareadas.
Locus

No. localidades	Comparaciones	.2	.3	.4	.6	.8	.9	Todos
3	BAJA-BLA	0.0269	0.0738	0.0427	-0.0126	-0.0032	-0.0056	0.0242
3	BAJA-CAL	-0.0159	-0.0225	0.0477	-0.0156	-0.0096	-0.0178	-0.0044
3	BLA-CAL	-0.0115	0.1103	-0.0195	-0.0204	-0.0248	-0.0265	-0.0074
2	(BAJA+CAL)-BLA	0.0217	0.0845	0.0207	-0.0108	-0.0054	-0.0057	0.0189

DISCUSIÓN.

Diversidad genética.

La mayoría de los loci probados presentan polimorfismos, siendo el locus .1 el único que resultó monomórfico, por lo que perdió interés para éste estudio, ya que el análisis realizado fue sobre los polimorfismos presentes en cada uno de los loci.

En las figuras 5 y 6 observamos un total de 78 alelos, lo que da una media de 13 alelos para cada uno de los loci probados, sin embargo, vemos que los loci .2, .8 y .9, presentan una mayor diversidad, por lo que se esperaba encontrar en estos loci la información necesaria para diferenciar las poblaciones.

Primeramente verificamos las condiciones de los loci en cada una de las poblaciones; encontrando que están en equilibrio de Hardy-Weinberg, esto es que en ésta generación y en las sucesivas las frecuencias genotípicas de estos loci serán las mismas, en ausencia de cualquier factor evolutivo.

Los valores de heterocigosidad (Tabla V) encontrados dentro de cada una de las poblaciones fueron altas ($He > 0.5023$) para los loci .2, .3, .4, .8 y .9, siendo el locus .6 el que presentó la menor proporción de organismos heterocigotos. ($He < 0.50$). Estos altos valores de heterocigosidad nos indican una gran variabilidad genética dentro de cada una de las poblaciones, que se termina de reflejar al encontrar valores de Rho mucho mayores ($Rho > 9.5220$) en los locus .2, .3, .4 .8 y .9, mientras que el locus .6 presentó valores de Rho menores a 0.5055. Los bajos valores de Rho del locus .6, se explican debido a la existencia de sólo dos alelos cuyos tamaños difieren en 3 pb (sólo se presentaron dos tamaños contiguos), ya que este índice se calcula como el promedio cuadrado de la diferencia en el tamaño de cada uno de los alelos.

Diferenciación poblacional.

La prueba de desequilibrio de ligamiento (Apéndice III) nos muestra valores que no son significativos ($\alpha = 0.05$) por lo que aceptamos la hipótesis de que los genotipos de un locus son independientes de los genotipos de cualquier otro locus. Al determinar esta independencia entre los loci, comprobamos que cualquiera de sus alelos se segrega independientemente de los alelos de los otros loci.

En la prueba de diferenciación génica para todas las poblaciones no se observan valores significativos al considerar tres poblaciones ($P > 0.059$), por lo que se acepta la hipótesis de que la distribución alélica es idéntica entre poblaciones; sin embargo, al considerar sólo dos poblaciones, tomando una

población como BLA y la segunda como BAJA+CAL, se tienen valores significativos para los loci .3, .4 y .9. Por lo anterior, la hipótesis sobre la distribución idéntica de alelos entre poblaciones es rechazada. Una explicación de esta diferencia puede provenir del análisis de los resultados para poblaciones pareadas, ya que encontramos diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$) en los loci .3, .4 y .9 para la comparación BLA-BAJA, considerando tres poblaciones, así como, para la comparación (CAL+BAJA)-BLA. De esta forma, vemos que la población BAJA es la que determina, en el lado Pacífico, la diferencia con la población BLA dentro del Golfo. De la misma forma vemos que la población BAJA no es diferente a la población CAL ya que su comparación no muestra valores significativos. Esta puede deberse al bajo número de organismos analizados para CAL (solo 14), en comparación con los 53 organismos analizados para BAJA.

Sin embargo, cabe mencionar que todos los resultados de los análisis que involucran a CAL deben ser tomados con extrema cautela debido al número limitado de organismos analizados ($n=14$), lo que se refleja en un muy bajo poder estadístico.

Aplicando la corrección para pruebas múltiples en cualquier locus (corrección de Bonferroni) (Zar, 1984), a la prueba de diferenciación génica podemos observar valores que no fueron significativos a un $\alpha = 0.05/18 = 0.003$ global (el α inicial entre el número de pruebas) para las pruebas realizadas en comparaciones pareadas de tres localidades, mientras que para dos localidades

para un $\alpha=0.05/6=0.008$ observamos un solo valor significativo en el locus .3 ($P=0.0009$).

De esta forma los alelos presentes en el locus .3 nos puede ayudar a establecer la diferencia entre las poblaciones al considerar que su distribución alélica no es idéntica entre las poblaciones, y después de la corrección de Bonferroni el alelo .3 es sobre el que recae la diferenciación entre las poblaciones CAL+BAJA y BLA.

Al analizar los resultados de la diferenciación genotípica para cada una de las poblaciones no se observaron valores significativos al considerar las tres poblaciones, ya que los niveles de significancia fueron mayores a 0.06. Una vez más aparecieron valores significativos al considerar sólo dos poblaciones ((CAL+BAJA)-BLA), para los loci .3, .9 y al considerar todos los loci. Al buscar una explicación para esto observamos en la tabla IX, valores significativos para BLA-BAJA en los loci .3, .9 y todos, y para BLA-CAL en el locus .3, al considerar 3 poblaciones. Sin embargo, al considerar dos poblaciones se observa un valor significativo en los loci .3, .9 y todos los loci. Esta diferencia se debe a los genotipos de la población BLA para los loci .3 y .9. En este caso también deben de interpretarse cautelosamente los resultados que involucran a la muestra CAL, por las razones antes expuestas.

Aplicando nuevamente la corrección de Bonferroni en el análisis de diferenciación genotípica para poblaciones pareadas tenemos que para un $\alpha=0.003$ global no se observan valores significativos al considerar 3 localidades,

mientras que para 2 localidades tenemos un valor muy cercano al significativo en el locus .3 ($P=0.0033$) por lo que este locus también determina diferencias genotípicas entre las poblaciones BLA y BAJA+CAL,

Los valores de F_{st} obtenidos fueron menores a 0.04 en todos los loci en ambas consideraciones (3 y 2 localidades), esto es que menos del 4% de la varianza total esta explicada por la estructura genética. Buonaccorsi (comunicación personal), encontró valores promedio de $F_{st} = 0.0013$ en un estudio realizado con *S. rastrelliger* en las costas de California y Oregon, E. U., así que el índice de fijación obtenido en este estudio fue mayor. Al considerar el valor R_{st} como ponderado por el número de repeticiones, observamos componentes de varianzas ligeramente mayores a F_{st} ($0.08 > R_{st} \geq 0$), lo que nos indica la baja variabilidad entre poblaciones. Al considerar poblaciones pareadas observamos valores de $F_{st} < 0.036$ para tres poblaciones y $F_{st} < 0.039$ para dos poblaciones, siendo la mayoría de los valores cero, lo que nos indica una muy baja diferenciación. En el análisis de poblaciones pareadas los loci .6, .8 y .9 fueron los que presentaron una diferenciación nula en ambos casos ($R_{st} < 0$), tomando en cuenta el valor ponderado en la diferencia en el tamaño de alelos (R_{st}), mientras que el locus .3 presentó la mayor en la comparación BLA-CAL ($R_{st} > 0.1$). Estos resultados sugieren una diferenciación genética muy incipiente entre las poblaciones estudiadas.

Integración.

Al integrar los resultados de todos los análisis realizados tenemos que el rango de distribución del tamaños de cada uno de los alelos es mayor para los loci .2, .3, .8 y .9. Esto refleja una mayor diversidad genética molecular. De todos los loci analizados se esperaba encontrar un mayor número de diferencias significativas que pudieran establecer claramente la diferenciación entre las poblaciones estudiadas. Se estableció el equilibrio de Hardy-Weinberg. La prueba de desequilibrio de ligamiento indicó la independencia de alelos. Al calcular la He se encontraron valores mayores a 0.5023, para los loci .2, .3, .4, .8 y .9 y valores de $Rho > 9.5220$ en estos mismos loci. Los valores de He para los loci .2, .8 y .9 son similares a los encontrados por Buonaccorsi *et al.* (2001) en marlin azul ($0.91 < He < 0.95$), mientras que los loci .3, .4 y .6 están dentro de los valores encontrados para *S. rastrelliger* ($0.30 < He < 0.96$) (Buonaccorsi, comunicación personal).

Debido al bajo número de organismos analizados en la localidad CAL y a que no se encontraron diferencias significativas en ningún locus, se juntaron ésta y BAJA, para realizar los análisis de diferenciación poblacional, además se realizaron los análisis para 3 localidades. Si bien el juntar estas dos poblaciones nos permitió aumentar el poder estadístico de las comparaciones, los resultados de los análisis que involucran a CAL no mostraron valores significativos en ningún caso. El resultado de las pruebas de diferenciación génica y genotípica resultó significativo para el locus .3 en ambos casos, por lo que a diferencia de

los estudios que han involucrado otros marcadores tales como secuencias de ADN mitocondrial, y nuclear (ITS), al menos uno de los loci microsatelitales mostró un nivel de diferenciación genética significativa entre organismos del Golfo y del Pacífico.

CONCLUSIONES.

1) Las poblaciones estudiadas por estos microsátélites poseen una alta diversidad genética en los loci .2, .3, .8 y .9.

2) Las poblaciones del Golfo y del Pacífico están genéticamente diferenciadas por el locus .3.

Por lo anterior se cumplieron los objetivos planteados.

REFERENCIAS.

- Amador- Buenrostro, A., Serrano-Guzmán, S., y Argote- Espinoza, M. (1991). Modelo de la circulación inducida por el viento en Bahía de Los Angeles, B. C., México. *Ciencias Marinas* **17**(3): 39-57
- Ainley, D. G., Sydeman, W. J., Parrish, R. H., and Lenarz, W. H. (1993). Oceanic factors influencing distribution of young rockfish (*Sebastes*) in central California—a predators perspective. *Calif. Coop. Oceanic Fish. Invest. Rep.* **34**: 133-139
- Andrew, T. G., Hecht, T., Heemstra, P. C., and Lutjeharms, J. R. E. (1995). Fishes of the Tristan Da Cunha Group and Gough Island, South Atlantic Ocean. *Ichthyol. Bull. J. L. B. Smith Inst. Ichthyol.* **63**: 1-43
- Baker, A. J. (2000). *Molecular methods in Ecology*. Blackwell Science, United Kingdom. 337 p.
- Boehlert, G. W., Kusakari, M., and Yamada, J. (1991). Oxygen consumption of gestating female *Sebastes schlegeli* - Estimating the reproductive costs of livebearing. *Environmental Biology of Fishes* **30**: 81-90.
- Buonaccorsi, V. P., Mc. Dowell, J. R., and Graves, J. E. (2001). Reconciling patterns of inter-ocean molecular variance from four classes of molecular markers in blue marlin (*Makaira nigricans*). *Molecular Ecology* **10**: 1179-1196

- Chen, L. (1971). Systematics, variation, distribution, and biology of rockfishes of the subgenus *Sebastomus* (Pisces, Scorpaenidae, *Sebastes*). Bull. Scripps Inst. Oceanogr., Univ. Calif. 18, 107 p.
- Cockerham, C. C. (1973). Analyses of gene frequencies. Genetics **74**: 679-700
- Eschmeyer, W. N., and Herald, E. S. (1983). A field guide to Pacific coast fishes of North America. Houghton Mifflin Company, Boston, Mass
- Eschmeyer, W. N., and Hureau, J. C. (1971). *Sebastes mouchezi*, a senior synonym of *Helicolenus tristanensis*, with comments on *Sebastes capensis* and zoo-geographical considerations. Copeia **1971**: 576-579
- Hillis, D. M., Muritz, C., and Mable, B. K. (1996). Molecular Systematics. 2nd. Edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Mass, U. S. A.
- Kendall, A. W. J. (2000). An historical review of *Sebastes* taxonomy and systematics. Marine Fisheries Review **62** (2): 1-19
- Kong Urbina, I. (1985). Revisión de las especies chilenas de *Sebastes* (Osteichthyes, Scorpaeniformes, Scorpaenidae). Estud. Oceanol. **4** : 21-75
- Love, M. S., Carr, M. H. and Haldorson, L. J. (1991). The ecology of substrate-associated juveniles of the genus *Sebastes*. Environmental Biology of Fishes. **30** : 225-243
- Love, M. S., Caselle, J. E., and Van Buskirk, W. (1998). A severe decline in the commercial passenger fishing vessel rockfish (*Sebastes* spp.) catch in

the Southern California Bight, 1980-1996. California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports **39**: 180-195.

Masuda, H., Amaoka, K., Araga, C., Uyeno, T., and Yoshino, T. (Eds.). (1984). The Fishes of the Japanese Archipelago. Vol. I. Tokai Univ. Press, Tokyo.

Michalakis , Y., and Excoffier, L. (1996). A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special interest to microsatellite loci. *Genetics* **142** : 1061-1064.

Moser, H. G. (1972). Development and geographic distribution of the rockfish, *Sebastes macdonaldi* (Eigenmann and Beeson, 1893), Family Scorpaenidae, off southern California and Baja California. *Fishery Bulletin* **70**: 941-958.

Moser, H. G., and Boehlert, G. W. (1991). Ecology of pelagic larvae and juveniles of the genus *Sebastes*. *Environmental Biology of Fishes*. **30** : 203-224

Raymond, M., and Rousset, F. (1995). GENEPOP (version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**: 248-249

Robertson, A., and Hill, W. G. (1984). Deviations from Hardy-Weinberg proportions: sampling variances and use in estimation of inbreeding coefficients. *Genetics* **107**: 713-718

- Rocha-Olivares, A., and Vetter, R. D. (1999). Effects of oceanographic circulation on the gene flow, genetic structure, and phylogeography of the rosethorn rockfish (*Sebastes helvomaculatus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **56**: 803-813
- Rocha-Olivares, A., Rosenblatt, R. H., and Vetter, R. D. (1999). Molecular evolution, systematics, and zoogeography of the rockfish subgenus *Sebastomus* (*Sebastes*, Scorpaenidae) based on mitochondrial cytochrome *b* and control region sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **11**: 441-458.
- Templeman, W. (1959). Redfish distribution in the North Atlantic. *Bull. Fish. Res. Board Can.* **120** : 1-173
- Thomson, D. A., Findley, L. T., and Kerstitch, A. N. (2000). Reef fishes of the Sea of Cortez. The University of Texas press.
- Villee, C. A. (1988). *Biología*. 7ma. Edición. Mc. Graw Hill, México
- Weir, B. S., and Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**: 1358-1370.
- Wourms, J. P. (1991). Reproduction and development of *Sebastes* in the context of the evolution of piscine viviparity. *Environmental Biology of Fishes.* **30** : 111-126.
- Zar, J. H. (1984) *Biostatistical Analysis*. 2^a Edición. Prentice Hall. U.S.A.

APÉNDICE I

A) PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN UTILIZANDO DNAzol.

1. Etiquetar tubos eppendorf con un marcador indeleble.
2. Adicionar 500 μ l de DNAzol en cada uno de los tubos.
3. Tomar un pequeño trozo de tejido (25-100 mg) con unas pinzas estériles (utilizar navajas estériles de ser necesario) y enjuagar el exceso de fluido preservativo (Etanol, SED) con agua destilada.
4. Remover el exceso de agua con un kimwipe nuevo.
5. Introducir el tejido dentro de un tubo con DNAzol y homogeneizar con la ayuda de un pestillo, suavemente y dando el menor número de vueltas.
6. Adicionar 50-60 μ g de proteinasa K (3 μ l si tiene una concentración de 20 mg/ml o 6 μ l si esta a 10 mg/ml).
7. Tapar los tubos, mezclar e incubar a temperatura ambiente de 4-24 h (la actividad de la proteinasa K es mayor a temperatura ambiente que a 55°C)
8. Mezclar los tubos de extracción por lo menos una vez durante la incubación.
9. Al final de la incubación centrifugar el homogeneizado a 10 000g por 10 minutos a una temperatura entre 4 y 25 °C
10. Transferir el sobrenadante viscoso a otro tubo eppendorf (este paso remueve los fragmentos tisulares insolubles, el ARN parcialmente hidrolizado y exceso de polisacáridos)
11. Precipitar el sobrenadante con la adición de 250 μ l de etanol al 100% (la mitad del volumen de DNAzol). Tapar y mezclar el contenido de los tubos invirtiendo suavemente varias veces y dejar reposar a temperatura ambiente por 1-3 minutos. Asegurarse que el etanol se mezcle bien con el homogeneizado.
12. Si hay una gran cantidad de ADN, recuperarlo con una punta de micropipeta para enrollarlo y transferirlo a un tubo eppendorf nuevo para su limpieza. Si no hay precipitado visible de ADN centrifugar a 5 000g por 5

minutos a 4-25°C, decantar y tirar el exceso de DNAzol guardando el pellet en el fondo del tubo.

13. Enjuagar el pellet (ADN precipitado) con 0.8-1.0 ml de etanol al 75%. En cada enjuague suspender el ADN invirtiendo el tubo de 3 a 6 veces. Dejar el tubo en posición vertical el tiempo necesario para que el ADN se precipite al fondo del tubo y remover el etanol con una pipeta o decantando.
14. Remover el máximo de etanol posible con la ayuda de una pipeta y disolver el pellet de ADN en 50 µl de TE (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0) o más dependiendo de la cantidad de ADN obtenido.
15. Correr un gel para estimar la cantidad y calidad del ADN (5 µl ADN stock + 1 µl de loading dye).

B) PROTOCOLO ALTERNATIVO DE EXTRACCION DE ADN DE ALTO PESO MOLECULAR.

1. Tomar una pequeña pieza de tejido preservada en etanol o congelada (no mas de 2 ml²) y ponerla en un tubo eppendorf. Adicionar 500 µl de Buffer (60 µl de SDS al 10%, 10 µl de RNAsa a 10 mg/ml, y 12.5 µl de proteinasa K a 20 mg/ml). Incubar los tubos a 37°C toda la noche. Preparar un control negativo conteniendo solamente el cóctel de digestión.
2. Adicionar un volumen igual (≈ 595 µl)de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) a cada tubo. Invertir los tubos hasta observar la aparición de dos fases. Centrifugar los tubos a máxima velocidad (14, 000 rpm) durante 4 minutos.
3. Transferir el sobrenadante acuoso (capa superior) a un tubo eppendorf nuevo y etiquetado y extraer con un volumen igual de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) como en el paso 2.
4. Repetir la extracción, esta vez usando cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.

5. Precipitar el ADN adicionando 0.01 volúmenes de NaCl y 1X volúmenes de isopropanol. Invertir los tubos cuidadosamente un par de veces. Colocar los tubos a 20°C por 2 horas para precipitar el ADN
6. Centrifugar los tubos a 14, 000 rpm por 20 minutos para formar el pellet de ADN. Desechar el sobrenadante teniendo cuidado de no perder el pellet. Adicionar 200 µl de etanol al 70% para diluir las sales. Centrifugar los tubos por 5 minutos a 14, 000 rpm. Una vez terminada la centrifugación pipetear el etanol cuidadosamente.
7. Evaporar el remanente de etanol, dejando los tubos abiertos sobre papel absorbente.
8. Resuspender el ADN en 50 µl de TE (pH 8.0) estéril. Almacenar el ADN extraído a -20°C, o -80°C.
9. Correr un minigel de agarosa 1.0% por 20-40 minutos a 85V para corroborar la presencia de ADN.

C) PROTOCOLO DE EXTRACCION DE ADN USANDO CLORURO DE LITIO.

1. Cortar el tejido (≈ 100 mg) lo mas finamente posible.
2. En un tubo eppendorf de 1.5 ml adicionar el tejido y 300 µl de buffer de extracción (100mM NaCl, 50mM Tris-HCl, SDS al 1%, 50mM EDTA, pH 8.0)
3. Adicionar 5 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y dar vortex brevemente.
4. Colocar los tubos en un incubador a 55°C toda la noche (o bien hasta que la digestión se halla efectuado)
5. Adicionar 300 µl de LiCl 5M y colocarlo en un incubador con agitación a temperatura ambiente por un minuto.
6. Adicionar 600 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y dar vortex brevemente.
7. Ponerlo en agitación por 30 minutos a temperatura ambiente.
8. Centrifugar a 13,000g por 15 minutos.

9. Pipetear 500 μ l de la capa acuosa (superior) a un tubo eppendorf nuevo. En este paso hay que tener cuidado de no tocar la interfase. En caso de hacerlo volver a centrifugar a 13,000g por 5 minutos.
10. Adicionar 50 μ l de acetato de sodio 3M y pH 5.2, y 1 ml de etanol absoluto frío.
11. Invertir varias veces los tubos y ponerlos a -20°C por lo menos una hora (o 30 minutos a -80°C)
12. Centrifugar a maxima velocidad (14,000g) por 20 minutos. Para una mejor calidad de DNA centrifugar a 4°C .
13. Remover el líquido de los tubos teniendo cuidado de no perder el pellet formado.
14. Adicionar 750 μ l de etanol al 70% y ponerlo en agitación a temperatura ambiente por 15 minutos.
15. Volver a centrifugar a máxima velocidad por 5 minutos.
16. Remover cuidadosamente el etanol.
17. Secar el exceso de etanol
18. Resuspender el pellet en 50-100 μ l de TE pH 8.0
19. Correr un minigel de agarosa 1.0% por 20-40 minutos a 85V para corroborar la presencia de ADN.

D) PROTOCOLO PARA AMPLIFICACION

1. Etiquetar tubos eppendorf en línea de 0.2 ml.
2. Sacar el buffer para PCR, los dNTP's, el agua y los primers a usar del congelador. Una vez descongelados conservarlos en hielo.
3. Limpiar la superficie de trabajo (Flujo laminar) con una solución de cloro al 10%. Etiquetar un tubo eppendorf de 1.5 ml, para preparar el cóctel para PCR. Adicionar el buffer (10x) para PCR, los dNTP's (0.2 Mm), el agua (estéril y pasada por UV) y los primers según la tabla XIII, y regresarlos al congelador. Tomar la Taq del congelador y adicionársela al cóctel (7.5 μ l), regresándola rápidamente al congelador.

Tabla XIII. Cantidades usadas de cada uno de los componentes del cóctel para cada PCR (para 100 reacciones).

Primer	H ₂ O	Buffer	dNTP	Primer 1 forward	Primer 1 reverse	Primer 2 forward	Primer 2 reverse
.1/.2	817.5µl	150 µl	150 µl	10 µl	100 µl	15 µl	150 µl
.3/.6	817.5 µl	150 µl	150 µl	15 µl	150 µl	10 µl	100 µl
.4	927.5 µl	150 µl	150 µl	15 µl	150 µl	0	0
.8g	927.5 µl	150 µl	150 µl	15 µl	150 µl	0	0
.9	927.5 µl	150 µl	150 µl	15 µl	150 µl	0	0

4. Mezclar el cóctel brevemente. Usando una micropipeta se reparte el cóctel adicionando 14 µl a cada uno de los tubos para PCR. Terminado este paso adicionamos 1 µl de ADN de cada una de las muestras. Centrifugamos los tubos brevemente.
5. Una vez centrifugados se colocan en el termociclador PTC-200 de Applied Biosystems (Fig. 7), se selecciona el programa y se corre. Una vez terminado el PCR los tubos se colocan a 4°C.

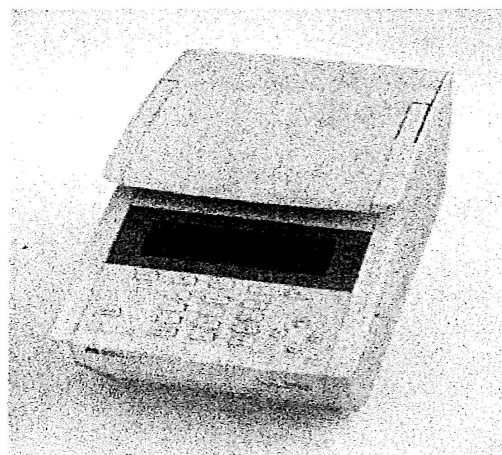


Fig. 7 Termociclador PCT 200 de Applied Biosystems usado en la amplificación de ADN

6. Se corren minigeles de agarosa al 1.5% por 20-30 minutos a 80V, usando 3 µl del producto de PCR y una escalera de 100pb.

Organismo	Locus													
	.1		.2		.3		.4		.6		.8		.9	
	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
8-93	05	05	16	32	13	18	11	11	03	03	23	28	21	21
8-94	05	05	16	33	14	14	11	11	02	03	24	27	15	19
8-95	05	05	20	22	18	19	11	19	02	02	25	33	10	19
8-96	05	05	21	36	14	19	11	19	02	02	20	24	12	21
8-97	05	05	23	29	18	24	11	17	02	02	23	25	14	14
8-98	05	05	27	29	19	19	11	19	02	02	27	34	15	19
8-99	05	05	26	31	17	19	12	19	02	03	22	27	12	16
8-100	05	05	27	32	17	17	00	00	02	03	23	29	15	20
9-20	05	05	23	27	14	18	00	00	02	03	24	27	15	17
9-21	05	05	16	22	19	19	00	00	02	03	00	00	11	11
9-22	05	05	20	20	18	19	19	19	02	02	25	28	11	12
9-23	00	00	20	20	19	19	11	17	02	02	27	27	11	11
9-24	05	05	26	27	14	21	11	19	03	03	22	28	11	15
9-25	05	05	27	32	19	19	11	11	02	03	20	36	15	17
9-26	05	05	20	26	14	19	11	11	02	02	20	36	15	18
9-27	05	05	00	00	19	19	00	00	00	00	27	31	11	17
9-28	05	05	19	20	19	19	11	11	02	02	00	00	12	18
9-29	05	05	26	32	14	18	11	11	02	02	23	30	08	14
9-30	05	05	20	26	14	17	00	00	02	03	00	00	13	16
9-31	05	05	28	30	14	14	00	00	02	03	31	32	11	11
9-32	05	05	25	34	14	19	00	00	03	03	26	28	14	18
9-33	05	05	26	27	17	19	11	11	02	02	24	34	00	00
9-34	05	05	20	26	13	14	11	11	02	02	23	26	15	20
9-35	05	05	16	30	18	19	13	17	02	03	23	27	07	16
9-36	05	05	20	29	14	19	11	19	02	02	24	28	12	14
9-37	05	05	20	27	19	25	00	00	02	02	22	23	13	14
9-38	05	05	16	31	14	19	11	11	02	03	25	28	11	12
9-39	05	05	20	20	14	18	11	11	02	03	30	33	12	20

APÉNDICE II

Genotipos individuales microsatelitales para los 7 loci estudiados representados como el número de repeticiones de cada alelo.

Continuación

Organismo	Locus													
	.1		.2		.3		.4		.6		.8		.9	
	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
9-40	05	05	25	28	13	13	11	11	02	03	25	29	17	20
9-41	05	05	20	22	19	19	11	11	02	03	25	30	16	19
9-42	05	05	16	26	14	19	11	11	02	02	24	26	07	14
9-43	05	05	28	31	13	19	11	11	02	03	25	27	14	16
9-44	05	05	20	33	18	19	10	11	02	02	24	25	14	14
9-45	05	05	27	28	19	19	19	19	03	03	23	25	00	00
9-46	05	05	16	16	14	17	11	11	02	02	24	25	11	18
9-47	05	05	16	26	18	19	11	11	02	02	26	26	18	22
9-48	05	05	28	28	18	18	11	11	02	03	25	27	11	15
9-49	05	05	27	36	13	14	11	11	03	03	00	00	16	19
9-50	05	05	19	26	19	19	17	19	02	02	23	25	14	14
9-51	05	05	26	28	14	17	11	11	02	03	20	27	11	16
9-52	05	05	16	26	14	18	11	19	03	03	27	28	11	16
9-53	05	05	14	28	18	19	11	17	02	02	23	27	11	14
9-54	05	05	22	26	19	19	11	17	02	02	20	26	13	19
9-55	05	05	19	26	19	19	11	19	02	03	25	26	14	20
9-56	05	05	16	19	14	16	11	17	02	03	24	25	14	15
9-57	05	05	27	30	19	19	11	20	02	02	28	30	18	19
9-58	05	05	21	26	14	19	11	19	03	03	27	30	12	19
9-59	05	05	16	32	14	18	11	11	02	03	25	29	11	14
9-60	05	05	26	31	14	19	11	19	02	03	27	30	15	16
9-61	05	05	20	30	14	18	11	11	02	03	24	28	12	20
9-62	05	05	28	31	13	17	11	19	02	03	21	26	08	15
9-63	05	05	26	31	18	24	11	17	02	02	24	26	11	17
9-64	05	05	30	32	18	19	11	19	03	03	29	30	14	15
9-70	05	05	20	26	14	19	19	20	02	02	23	33	11	13
9-71	05	05	16	32	14	14	10	11	02	02	23	27	13	19
9-72	05	05	21	26	14	18	11	11	02	02	26	34	10	14
9-73	05	05	22	26	14	16	11	19	02	02	24	28	18	19
9-74	05	05	19	20	14	19	11	20	02	03	22	29	07	18

Continuación

Organismo	Locus													
	.1		.2		.3		.4		.6		.8		.9	
	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
9-75	05	05	22	28	14	18	11	11	03	03	26	28	18	19
9-76	00	00	16	20	13	19	11	20	02	03	19	26	12	20
9-77	05	05	32	34	14	14	11	11	02	03	32	36	12	14
9-78	05	05	16	27	14	19	11	19	02	02	22	25	17	20
9-79	00	00	00	00	14	19	00	00	02	02	23	30	00	00
9-80	05	05	16	27	14	19	11	11	02	03	22	34	16	18
9-81	05	05	26	35	18	19	19	19	02	03	26	28	19	20
9-82	05	05	19	23	16	19	11	19	02	02	28	40	07	14
9-83	05	05	27	34	14	19	11	17	02	02	28	34	18	19
9-84	05	05	26	32	14	14	11	19	02	03	24	29	18	19
9-85	05	05	20	26	14	19	11	19	02	03	24	27	16	17
9-86	05	05	16	16	13	19	11	11	02	02	21	24	13	13
9-87	05	05	16	22	14	17	11	11	03	03	24	33	17	19
9-88	05	05	16	32	14	14	11	19	02	02	00	00	13	15
9-89	05	05	16	28	14	18	11	11	02	02	22	27	07	11
10-42	05	05	19	19	14	19	11	19	02	02	22	25	11	11
10-43	05	05	23	28	14	17	11	19	02	03	25	26	19	19
10-44	05	05	21	27	13	27	11	11	02	02	25	26	18	19
10-45	05	05	20	27	19	19	11	11	02	02	24	26	12	13
10-46	05	05	19	27	15	19	11	11	02	03	00	00	10	14
10-47	05	05	16	20	14	14	19	19	02	03	25	35	13	13
10-48	05	05	22	26	17	18	11	20	03	03	00	00	11	20
10-49	05	05	16	25	13	18	17	19	02	03	00	00	15	16
10-50	05	05	20	20	14	17	19	19	02	02	00	00	17	20
10-51	05	05	31	31	14	14	11	19	02	03	26	27	00	00
10-52	05	05	20	31	14	19	11	17	02	03	25	28	12	12
10-53	05	05	16	27	13	14	07	19	02	02	22	27	11	15
10-54	05	05	16	20	16	18	11	19	02	02	19	33	15	20
10-55	05	05	19	19	17	20	19	19	02	02	26	29	11	19
10-56	05	05	16	26	17	19	11	17	02	03	25	26	12	23

Continuación

Organismo	Locus													
	.1		.2		.3		.4		.6		.8		.9	
	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
10-57	05	05	16	22	14	17	17	17	03	03	00	00	11	12
10-58	05	05	30	37	13	18	11	19	02	02	25	27	19	20
10-59	05	05	27	28	17	17	17	19	02	03	23	26	11	18
10-60	05	05	24	27	13	17	11	19	03	03	24	30	11	13
10-61	05	05	17	27	14	19	07	19	03	03	23	26	07	20
10-62	05	05	17	30	17	17	11	17	03	03	26	28	17	19
10-63	05	05	16	19	14	19	11	19	03	03	29	33	12	17
10-64	05	05	26	28	13	19	07	19	02	02	00	00	14	16
36-91	05	05	16	20	18	19	11	19	02	03	27	29	12	16
128-21	05	05	16	26	18	19	11	19	02	02	27	33	13	15
128-22	05	05	20	27	14	19	11	17	02	03	24	27	14	14
128-23	05	05	27	28	17	19	11	11	02	02	00	00	14	19
128-24	05	05	26	26	18	19	11	17	03	03	27	29	13	20
128-63	05	05	16	37	14	19	19	19	02	03	25	29	12	13
176-2	05	05	20	27	14	19	11	19	02	03	24	29	11	13
176-36	05	05	18	26	19	19	11	11	03	03	21	35	14	17
176-37	05	05	20	24	18	19	11	11	02	03	25	28	12	20
176-38	05	05	19	30	18	19	11	19	02	03	23	23	14	18
176-39	05	05	20	30	19	19	11	19	02	03	22	23	15	16
176-40	05	05	16	26	13	19	11	19	02	03	24	30	12	19
176-41	05	05	22	26	14	14	11	19	02	02	28	33	15	18
176-42	05	05	28	41	14	19	17	19	02	02	25	26	11	21

APÉNDICE III

Resultados de la prueba estadística de desequilibrio genotípico.

Genepop (Version 3.3), Genotypic disequilibrium

Number of populations detected: 3

Number of loci detected: 7

Markov chain parameters

Dememorization: 1000

Batches: 100

Iterations per batch: 1000

Pop	Locus#1	Locus#2	P-value	S.E.
out9-64	mc1	mc2	Not possible	
out9-64	mc1	mc3	Not possible	
out9-64	mc2	mc3	0.84048	0.03452
out9-64	mc1	mc4	Not possible	
out9-64	mc2	mc4	0.80955	0.03225
out9-64	mc3	mc4	0.76318	0.02546
out9-64	mc1	mc6	Not possible	
out9-64	mc2	mc6	0.65408	0.01581
out9-64	mc3	mc6	0.43595	0.01565
out9-64	mc4	mc6	0.21002	0.00959
out9-64	mc1	mc8	Not possible	
out9-64	mc2	mc8	1.00000	0.00000
out9-64	mc3	mc8	0.26198	0.04074
out9-64	mc4	mc8	0.47030	0.03899
out9-64	mc6	mc8	0.45227	0.01996
out9-64	mc1	mc9	Not possible	
out9-64	mc2	mc9	1.00000	0.00000
out9-64	mc3	mc9	0.40814	0.04605
out9-64	mc4	mc9	0.88529	0.02716
out9-64	mc6	mc9	0.61310	0.02135
out9-64	mc8	mc9	0.35710	0.04794
in10-64	mc1	mc2	Not possible	
in10-64	mc1	mc3	Not possible	
in10-64	mc2	mc3	0.00000	0.00000
in10-64	mc1	mc4	Not possible	
in10-64	mc2	mc4	1.00000	0.00000
in10-64	mc3	mc4	0.46398	0.03758
in10-64	mc1	mc6	Not possible	
in10-64	mc2	mc6	0.27357	0.01655
in10-64	mc3	mc6	0.75080	0.01219
in10-64	mc4	mc6	0.62494	0.01023
in10-64	mc1	mc8	Not possible	
in10-64	mc2	mc8	1.00000	0.00000
in10-64	mc3	mc8	0.84216	0.03436
in10-64	mc4	mc8	0.91379	0.02286
in10-64	mc6	mc8	0.30183	0.01576
in10-64	mc1	mc9	Not possible	
in10-64	mc2	mc9	1.00000	0.00000
in10-64	mc3	mc9	1.00000	0.00000
in10-64	mc4	mc9	0.41347	0.04006
in10-64	mc6	mc9	0.72204	0.01461
in10-64	mc8	mc9	1.00000	0.00000
ca176-42	mc1	mc2	Not possible	
ca176-42	mc1	mc3	Not possible	
ca176-42	mc2	mc3	0.32243	0.02539
ca176-42	mc1	mc4	Not possible	
ca176-42	mc2	mc4	0.45917	0.02442
ca176-42	mc3	mc4	0.92269	0.00633
ca176-42	mc1	mc6	Not possible	

Pop	Locus#1	Locus#2	P-value	S.E.
ca176-42	mc2	mc6	0.63322	0.01223
ca176-42	mc3	mc6	0.65397	0.00791
ca176-42	mc4	mc6	0.42998	0.00816
ca176-42	mc1	mc8	Not possible	
ca176-42	mc2	mc8	1.00000	0.00000
ca176-42	mc3	mc8	0.22593	0.01921
ca176-42	mc4	mc8	1.00000	0.00000
ca176-42	mc6	mc8	1.00000	0.00000
ca176-42	mc1	mc9	Not possible	
ca176-42	mc2	mc9	No information	
ca176-42	mc3	mc9	No information	
ca176-42	mc4	mc9	No information	
ca176-42	mc6	mc9	No information	
ca176-42	mc8	mc9	No information	

P-value for each locus pair across all populations
(Fisher's method)

Locus pair	Chi2	df	P-value
mc1 & mc2			Not possible
mc1 & mc3			Not possible
mc2 & mc3	Infinity	6	Highly sign.
mc1 & mc4			Not possible
mc2 & mc4	1.979	6	0.92160
mc3 & mc4	2.237	6	0.89663
mc1 & mc6			Not possible
mc2 & mc6	4.355	6	0.62871
mc3 & mc6	3.083	6	0.79835
mc4 & mc6	5.749	6	0.45185
mc1 & mc8			Not possible
mc2 & mc8	0.000	6	1.00000
mc3 & mc8	5.998	6	0.42346
mc4 & mc8	1.689	6	0.94596
mc6 & mc8	3.983	6	0.67901
mc1 & mc9			Not possible
mc2 & mc9	0.000	4	1.00000
mc3 & mc9	1.792	4	0.77389
mc4 & mc9	2.010	4	0.73392
mc6 & mc9	1.630	4	0.80343
mc8 & mc9	2.059	4	0.72482

Normal ending