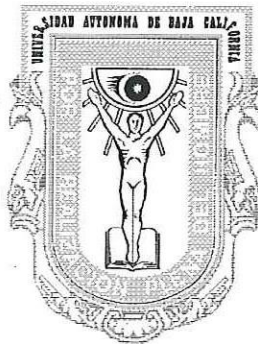


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
BAJA CALIFORNIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
POSGRADO EN OCEANOGRAFÍA COSTERA**



**“Aplicación de marcadores moleculares como
estimadores de variabilidad genética poblacional de
totoaba (*Totoaba macdonaldi*) en cautiverio
y medio natural”.**

**Que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias**

presenta

JUAN ANTONIO GALARZA PAVÍA

Ensenada, Baja California. Mayo de 2002.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

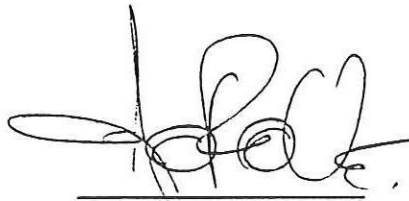
POSGRADO EN OCEANOGRAFIA COSTERA

“Aplicación de marcadores moleculares como estimadores de variabilidad genética poblacional de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) en cautiverio y medio natural.”

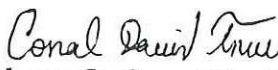
TESIS QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN CIENCIAS PRESENTA:

JUAN ANTONIO GALARZA PAVIA

Aprobada por:



Director de tesis
Dr. Jorge de la Rosa Vélez


M. en C. Conal David True


Dr. Eugenio Carpizo Ituarte

RESUMEN

En el presente trabajo se analizaron 40 secuencias de 254 pb de la región control mitocondrial de totoaba (*Totoaba macdonaldi*). Durante el periodo 2001-2002 se colectaron organismos del medio natural así como organismos criados en cautiverio. Mediante el análisis de estas secuencias, se evaluó la variabilidad genética de la población natural de totoaba. Del mismo modo se identificaron los linajes maternos presentes en el cultivo. Se identificaron 5 haplotipos en total, 4 en medio natural, 2 de los cuales están representados en los reproductores del cultivo y un haplotipo único dentro cultivo, al cual pertenece la totalidad de la generación filial. Se observaron altos valores de diversidad haplotípica aunque dentro de los rangos reportados para otras especies de peces marinos. Sin embargo, la diversidad nucleotídica observada resultó particularmente alta debido a la presencia del haplotipo HA2, el cual es substancialmente diferente al resto. Al respecto, se proponen varias probables causas para esta alta diferenciación entre haplotipos, sin embargo, quizá la causa mas factible sea la eliminación de haplotipos intermedios debida principalmente a la sobrepesca y la alteración del hábitat.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge de la Rosa Vélez. Gracias Doctor.

Al Dr. Eugenio Carpizo Ituarte por su pronta revisión y excelente disposición

Al M. en C. Conal David True por sus atinados comentarios, fundamentales para esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Maestría.

Al proyecto # 270 de la Universidad Autónoma de Baja California por el apoyo otorgado.

ÍNDICE

RESUMEN.....	i
AGRADECIMEINTOS.....	ii
ÍNDICE.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	v
INTRODUCCION.....	1
MATERIALES Y METODOS	12
RESULTADOS.....	22
1 Diversidad haplotípica total.....	22
2.0 Diversidad haplotípica por grupo (MN).....	24
2.1 Diversidad haplotípica por grupo (RR).....	26
2.2 Diversidad haplotípica por grupo (CU).....	27
2.3 Diversidad haplotípica por grupo (RD).....	28
DISCUSIÓN.....	30
CONSIDERACIONES FINALES.....	37
LITERARUTA CITADA.....	38
ANEXO1.....	43
ANEXO2.....	44
ANEXO3.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Zona de estudio.....	13
Figura 2. Electroforegrama en agarosa al 1% de DNA purificado de 38 organismos de <i>Totoaba macdonaldi</i> pertenecientes al medio natural, carril extremo izquierdo escalera molecular 250 pares de bases.....	22
Figura 3. Diferencias pareadas entre los haplotipos de la población medio natural. OBS = observado, SIM = simulado.....	25
Figura 4. Diferencias pareadas entre los haplotipos de la población de reproductores. OBS=Observado, SIM=Simulado.....	27
Figura 5. Arbol filogenético de la totalidad de las muestras de totoaba generado con el algoritmo UPGMA. Incluye Red Drum.....	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Condiciones programadas en el termociclador para la amplificación.....	16
Tabla II. Análisis de varianza molecular.....	20
Tabla III. Distribución haplotípica entre las poblaciones MN=Medio Natural, RR=Reproductores CU=Cultivo, HRD=Red Drum.....	23
Tabla IV. Frecuencia relativa de haplotipos entre las poblaciones MN=Medio Natural, RR=Reproductores, CU=Cultivo, HDR=Red Drum.....	24
Tabla V. Matriz de distancias inter-haplotípicas (MN).....	25
Tabla VI. Matriz de distancias inter-haplotípicas (RR).....	26
Tabla VII. Diferencias promediadas pareadas entre las poblaciones.....	29

INTRODUCCION:

La totoaba (*Totoaba macdonaldi*) es el pez mas grande de la familia Sciaenidae, con una longitud máxima reportada de casi 2 mts. y un peso aproximado de 100 kg. Esta especie endémica del Golfo de California, constituyó una importante pesquería industrial y deportiva basada principalmente en su migración anual a las aguas someras del delta del Río Colorado en el alto Golfo de California (Cisneros-Mata *et al.*, 1994).

La especie se clasificó en un principio como *Cynoscion macdonaldi* Gilbert 1891; sin embargo, algunos rasgos morfológicos particulares (vejiga natatoria y cierre de mandíbula) sugirieron a los especialistas reclasificarla dentro del nuevo genero Totoaba. El nombre común es generalmente utilizado como "totúava" por autores de habla inglesa para facilitar la pronunciación de la palabra extranjera. A su vez, a lo largo de su historia, esta especie ha recibido varios otros nombres tales como "White Sea Bass" y "Mexican Bass". El nombre utilizado aquí "totoaba" es el comúnmente usado por autores y por los propios pescadores (Berdegue, 1955).

La pesca de totoaba tuvo sus inicios en Guaymas, un puerto del Golfo de California en el Océano Pacífico. La totoaba se tenía en gran estima por los

pescadores locales a principios del siglo XX. Sin embargo, algunos inmigrantes chinos del lugar descubrieron que la vejiga natatoria o "buche", presentaba características peculiares, similares a aquellas de algunos peces en el Oriente, donde propiamente deshidratada y preparada se vendía a precios exorbitantes.

De esta manera comenzó la explotación comercial de la totoaba, y hasta 1920 aproximadamente, estuvo enfocada exclusivamente a la exportación de buche deshidratado hacia el Oriente, para ser utilizado como ingrediente en la elaboración de sopas exóticas (Chute, 1928).

En un principio, únicamente el buche tenía valor comercial. La carne ocasionalmente se fileteaba o se salaba para consumo local, pero normalmente era abandonada en la playa hasta su descomposición. Eventualmente se abrió un mercado comercial en Calexico donde la noticia del gigante "Mexican Sea Bass" atrajo la atención de los consumidores, y de esta manera una ruta comercial surgió a través del desierto y de las planicies lodosas del alto Golfo de California (True *et al.*, 1996).

En estos tempranos años de desarrollo, la pesquería de totoaba fue directamente responsable del establecimiento de tres comunidades

pesqueras: Golfo de Santa Clara y Puerto Peñasco en el estado de Sonora, y San Felipe, en el estado de Baja California (Berdegúé, 1955).

A partir de 1929, (cuando se empezaron a generar las estadísticas oficiales mexicanas), la pesca de totoaba respondía a un creciente mercado estadounidense, el cual aumentaba sus capacidades de transportación y refrigeración. El alcance y efectividad de las artes de pesca pasaron de pequeñas canoas y arpones, a dinamita y poderosas redes agalleras de nylon. La captura anual comenzó a incrementarse rápidamente a partir de 1934, alcanzando un máximo de 2,261 toneladas métricas en 1942. Después de este año, y a pesar de la intensificación del esfuerzo pesquero, la captura anual disminuyó drásticamente hasta un mínimo histórico reportado de 58 toneladas métricas en 1975, debido principalmente a sobrepesca (Flanagan, 1976).

Otra probable causa de la declinación de la pesquería es la alteración del hábitat. A pesar de que el primer reporte de la ecología de la totoaba fue publicado en 1916, la mayor parte del conocimiento que se tiene de esta especie hasta la fecha está basado en comunicaciones personales y reportes técnicos, por lo que casi toda la información permanece a un nivel anecdótico.

Es generalmente aceptado que la totoaba pasa el invierno en las aguas profundas cerca del centro del Golfo de California alrededor de las grandes islas. A principios de la primavera migran hacia el extremo norte del Golfo de California, donde se reproducen durante el verano. Se asume que la razón de tal migración hacia los hábitats estuarinos del alto Golfo, es debida a que es una especie anádroma (True *et al.*, 1996).

A partir de 1935, la mayor parte del cauce del Río Colorado fue retenido por presas río arriba, ocasionando una gran reducción del aporte de agua continental al ambiente estuarino. A pesar de que los adultos continúan migrando y reproduciéndose en el alto Golfo, la reducción de este aporte pudo haber tenido un impacto tanto en la ruta migratoria, como en el desarrollo de larvas y juveniles, ya que esta región pudo haber fungido como una importante área de crianza de la especie.

En 1976, el gobierno mexicano declaró una veda indefinida para la pesca de esta especie, la cual, para ese entonces se consideraba como amenazada. A su vez, en 1991, un conjunto de instituciones de investigación y educativas, bajo la dirección de la Secretaría de Pesca y el gobierno del estado de Sonora, establecieron un comité para la preservación de esta especie. Otra importante acción por parte del gobierno mexicano, fue el establecimiento de la "Reserva de la Biósfera Alto Golfo y del Delta del Colorado", un parque

nacional establecido en 1993, el cual contempla las áreas de reproducción y crianza de la totoaba.

A finales de 1993, la Facultad de Ciencias Marinas (FCM) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), inició un programa de captura y manutención de reproductores de totoaba cuyo objetivo principal es desarrollar la tecnología y conocimiento para el cultivo de esta especie en el cual basar cautiverio, un programa de repoblamiento.

Los programas de repoblamiento han sido identificados como un importante herramienta para incrementar poblaciones naturales de especies anádromas, como el salmón. Las poblaciones objetivo deben ser aquellas que: 1) de otra manera se extingan dentro de unas pocas generaciones (e.g. Fleming, 1994), o 2) que se encuentren substancialmente por debajo de su capacidad de carga (Waples, 1991).

A lo largo del siglo pasado, los repoblamientos artificiales han sido utilizados principalmente para mitigar el declinamiento o la extirpación, debidas principalmente a degradación del hábitat, sobrepesca y/o bloqueo de rutas migratorias. Recientemente, ha habido un creciente interés en la utilización de peces cultivados para la recuperación de la abundancia de poblaciones naturales. Esta aproximación, generalmente involucra la colecta de una

fracción de la población natural para ser utilizada como pie de cría, cultivar su progenia y liberarla en el medio natural para repoblar a la población natural (Waples, 1994).

Los esfuerzos han sido enfocados primordialmente a incubar los huevos en las instalaciones del cultivo hasta una fase juvenil y liberarlos posteriormente. Debido a que la mortalidad huevo-juvenil es típicamente alta en el medio natural, un cultivo exitoso ofrece una ventaja substancial de supervivencia en los estadios tempranos, lo que teóricamente se traduce en un incremento significativo de adultos.

Claramente, la propagación artificial puede jugar un papel importante en la conservación de una especie. Las altas tasas de sobrevivencia, que generalmente se consiguen, pueden temporalmente ayudar a sostener especies en peligro de extinción hasta que las condiciones ambientales o sociales sean favorables, y la población pueda persistir por sí misma. Sin embargo, se deben de reconocer también los aspectos negativos del repoblamiento artificial. Mientras que el repoblamiento puede temporalmente ayudar a resolver problemas demográficos, puede causar también cambios genéticos directos o indirectos, los cuales pueden incrementar el peligro de extinción una vez que se suspenda el programa de repoblamiento (Reisenbichler *et al.*, 1999).

Del mismo modo, se pueden presentar otro tipo problemas. Por ejemplo, el repoblamiento puede traer consigo efectos ecológicos negativos como la introducción de enfermedades o competencia con la población natural. Entre los impactos genéticos desfavorables se considera la introducción de rasgos no adaptativos. Recientemente, Ryman and Laikre (1991) señalaron otro posible efecto genético deletereo del repoblamiento, el cual consiste principalmente en que si el programa de repoblamiento es exitoso y lo suficientemente intenso en magnitud y tiempo de duración, una gran fracción de los individuos en la población pos-repoblada, derivará directamente de un número relativamente pequeño de reproductores de la población inicial. El resultado, en efecto, puede dar origen a un cuello de botella artificial, incrementando los niveles de endogamia y erosionar la diversidad genética, duplicando así los efectos que la sobrepesca y la degradación del hábitat pudieron haber tenido sobre la población natural.

Debido a lo anterior, se presenta la necesidad de obtener un punto de vista evolutivo, basado en estudios genéticos, que refleje la situación actual de la especie, así como establecer una caracterización genética mediante la implementación de marcadores moleculares que refleje la interacción Medio Natural-Reproductores-Progenia en el evento de repoblamiento.

El estudio de la evolución e historia natural visto desde un punto de vista molecular es prácticamente nuevo. Comienza con una serie de publicaciones en 1966, donde Harris, Hubby y Lewontin utilizaron frecuencias alozimicas para cuantificar la variación genética en drosofilas y humanos. Las alozimas son variantes protéicas de un determinado locus que tienen un comportamiento mendeliano. De esta manera pueden ser interpretadas como simples productos alélicos de un gen (Avice, 1994). En la actualidad, unos 35 años después, se cuenta con una basta literatura en la cual los datos de alozimas han sido utilizados para responder preguntas que tratan con patrones de apareamiento local, variación entre intervalos de especies y estructura poblacional a fina escala, entre muchos otros. Hoy en día la electroforesis de proteínas sigue siendo un método muy popular para la implementación de marcadores moleculares.

Sin embargo, la mayoría de los estudios alozimáticos multilocus, son probablemente robustos en lo que respecta a estudios que involucran la microevolución y/o la selección, y se tiene evidencia substancial que la mayoría de la variación observada en enzimas no es neutral. Por ello, queda claro que el marcador genético ideal para estudios donde interesa conocer la variabilidad genetica y aplicar esta para establecer patrones filogenético o familiares es aquel DNA no-codificante, en vez de un producto de un gene que este expuesto a procesos selectivos (Kimura 1983).

Con el desarrollo de las nuevas técnicas moleculares, ahora se tiene la opción de examinar secuencias de ácidos nucleicos, y actualmente varios métodos son capaces de detectar mutaciones individuales de nucleótidos. Las regiones altamente variables del DNA pueden algunas veces proveer una "huella digital" única de cada individuo y esa accesibilidad a tan fina escala de variación genética, es una de las razones más persuasivas para trabajar con marcadores de DNA (Avice, 1984).

El aspecto físico del DNA también ofrece numerosas ventajas sobre las alozimas. El DNA se encuentra en casi todas las células de todos los organismos y puede ser recuperado tanto de tejido viviente como de tejido muerto. Aún más, el tejido puede ser almacenado fácilmente en condiciones de campo y en muchos de los casos sólo se necesita de miligramos de tejido para el análisis (cuando se amplifica con PCR [Reacción en Cadena de la Polimerasa]). La molécula es tan estable que secuencias reconocibles pueden permanecer intactas por cientos de millones años (Avice *et al.*, 1979).

El polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP's), fue de los primeros marcadores de DNA utilizados por los biólogos poblacionales. Un RFLP resulta cuando la variación en los sitios de restricción es detectada por hibridación "Southern Blot". La variación de un RFLP puede algunas veces ser detectada mediante la tinción con bromuro de etidio, en una electroforesis de

DNA digerido, en gel de agarosa. Esto puede ser implementado para moléculas pequeñas como DNA mitocondrial (mtDNA), lo cual produce un cierto número de fragmentos a partir del tratamiento del DNA con varias enzimas de restricción (Parker, 1998).

Particularmente, durante los años setenta y ochenta, los estudios que utilizaron mtDNA como marcador molecular recibieron gran interés. Este marcador en particular, resulta muy conveniente debido a razones conceptuales y técnicas. Por ejemplo, las mutaciones se acumulan de manera mas rápida en este tipo de DNA que en el nuclear, lo que nos permite una amplia visión del acervo genético de la población. El alto número de polimorfismos en las dos porciones hipervariables de la región control, permiten discriminación entre individuos. La posibilidad de recuperar mtDNA a partir de peces pequeños o degradados es mayor que utilizando DNA nuclear, ya que las moléculas de mtDNA están presentes en cientos a miles de copias por célula. Por ello, músculo, hueso o piel, aun degradados por condiciones ambientales o por manejo de muestra, pueden ser utilizados para la extracción del genoma mitocondrial. Asimismo, el mtDNA se hereda por via materna solamente, así que en situaciones en donde hay varias madres putativas, o donde un individuo no este disponible para hacer una comparación directa, cualquier individuo relacionado maternalmente, nos

podrá ofrecer una muestra de referencia de los linajes maternos en la interacción Medio Natural-Reproductores-Progenia.

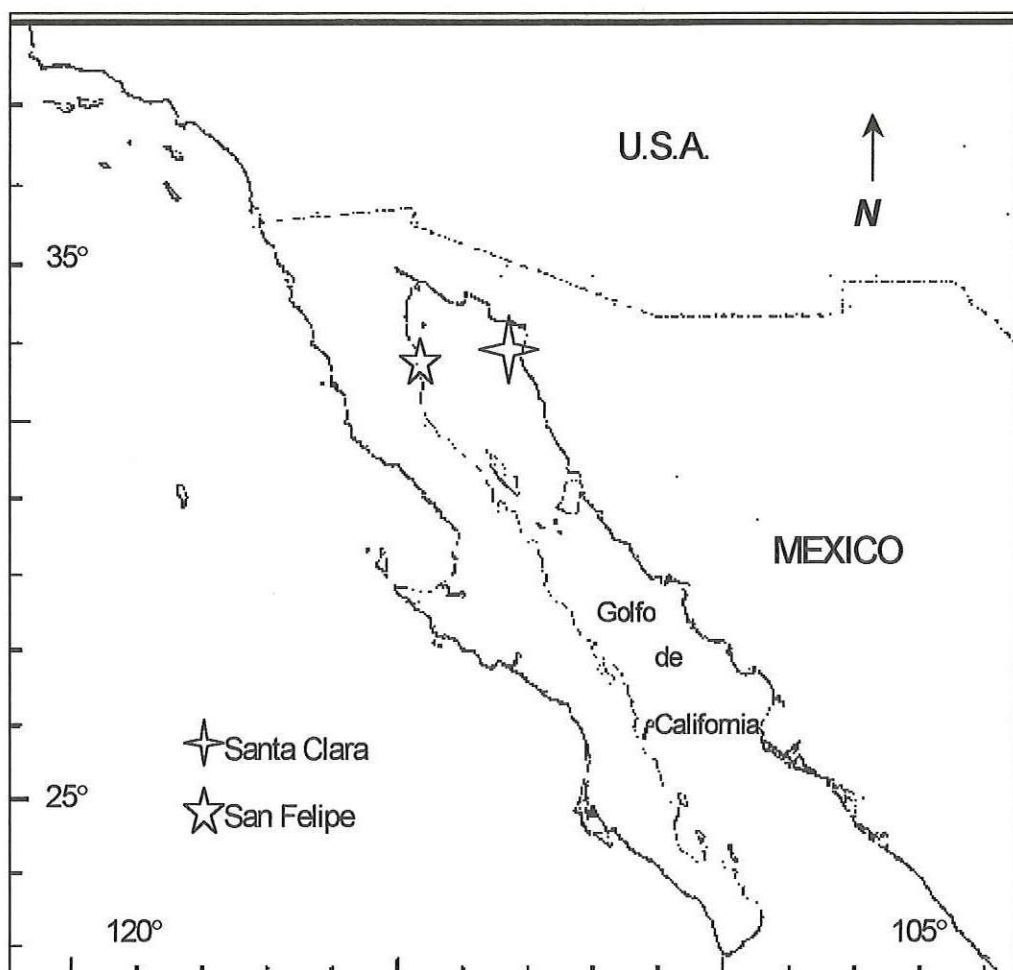
De igual manera, este tipo de DNA haploide, es más sensible a reducciones severas en el tamaño de población. Debido a esto y con base en las frecuencias de los distintos haplotipos se puede obtener una idea general cuantitativa del efecto de un cuello de botella sobre la variabilidad genética en poblaciones naturales.

En este estudio se analiza la variabilidad genética de una muestra restringida de la población natural de totoaba, el grupo de reproductores y una generación filial de la población en cultivo. Se pretende evaluar la representatividad de la variación genética de la población natural en los reproductores y el número de hembras participantes en el evento reproductivo. Lo anterior con base en el análisis de secuencias de un fragmento polimórfico de la región control del mtDNA.

MATERIALES Y METODOS:

Un total de 40 muestras fueron obtenidas de organismos de la población natural (20), así como también de organismos de cultivo (20) durante el periodo 2001-2002. Los reproductores se encuentran separados en dos estanques, el estanque No.1 Contiene 5 organismos (HGL, HDR, MN, MN2, HN). Las muestras tomadas de la población en cautiverio (H1, H2, H10, H11, H13, H15, H17, H19, H23, H25) corresponden a la generación F1 de un evento reproductivo de este estanque. El estanque No. 2 contiene los 5 organismos restantes (HCU, MCC HG, HGS,RCH), la "H" y "M" en cada clave indican hembra y macho respectivamente.

La mayoría de los organismos de la población natural (N1, N2, N12, N14, N15, N16, N17, N18, N19, N20, N21, N22, N23), fueron colectados de forma incidental, mediante arrastres de redes camaroneras realizados por barcos de investigación del Centro Regional de Investigación Pesquera (CRIP) entre los puertos de San Felipe y Santa Clara. El resto de las muestras (N24, N25, N26, N27, N28, N29, y N30), fueron obtenidas directamente de pescadores en el puerto de San Felipe. (Fig. 1).



(Fig. 1) Zona de estudio.

Las extracciones individuales de DNA se realizaron a partir de tejido de la membrana interespinal de la aleta dorsal, utilizando la técnica estándar de fenol cloroformo (Sambrook *et al.*, 1989). Todas las muestras se mantuvieron a -80°C antes de ser procesadas. Aproximadamente 40-170 mg. de tejido fueron digeridos en 520 microlitros de amortiguador de lisis (400 μl .1M Tris,

pH 8.0, 0.05 M etilenodiaminetetracetido (EDTA), 40 μ l 1% w:v de dodecil sulfato de sodio (SDS), y 80 μ l (10 μ g/ μ l) de proteinasa K) en constante movimiento por 24 hrs. a temperatura ambiente.

Para la separación de proteínas y la extracción de ácidos nucleicos el producto de la digestión enzimática se centrifugó por 5 minutos a 10,000 x g. Se transfirieron 200 μ l de cada sobrenadante a tubos estériles. El sobrenadante restante se congeló a -80°C. Se agregaron 200 μ l de fenol equilibrado y se agitó hasta formar una emulsión, posteriormente se centrifugó a 12,000 x g durante 1 minuto. Se separó la fase acuosa en un tubo que contenía 100 μ l de fenol equilibrado, 100 μ l de cloroformo alcohol isoamílico (24:1), se agitó hasta formar una emulsión y se centrifugó a 12,000 x g durante 1 minuto. Se separó la fase acuosa en un tubo que contenía 200 μ l de cloroformo alcohol isoamílico y se agitó. Posteriormente se centrifugó a 12,000 x g durante 1 minuto. Finalmente se repitió el paso anterior depositando la fase acuosa en un tubo estéril.

La precipitación de DNA fue realizada a partir de etanol/acetato de sodio, agregando 0.1 vol. (20 μ l) de acetato de sodio 3 M y 2 vol. (400 μ l) de etanol absoluto frío. Se dejó precipitar a -80°C por 3 horas y se centrifugó por 15 minutos a 14,000 x g. El precipitado obtenido fue lavado con 200 μ l de etanol

al 70% y se centrifugó de acuerdo a las condiciones anteriores. Se desechó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado durante 15 minutos a 55°C.

Después de resuspender el precipitado en 25 µl de TE ph 8, se evaluó la calidad y cantidad del DNA extraído mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% durante 30 minutos a 100 Volts.

Los cebadores utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron diseñados a partir de una secuencia publicada (Genbank, No. de acceso AF054805) de la región control mitocondrial de Red Drum (*Sciaenops ocellatus*). Los cebadores se diseñaron utilizando el programa DNASTAR^{inc} Primer Select (Windows 3.0a), contemplando los siguientes parámetros:

- A.-) El tamaño de los cebadores deberá de ser entre 18 y 25 nucleótidos.
- B.-) Deberá tener un alto contenido de G y C (> del 50%) distribuido regularmente a lo largo del cebador, evitando en lo posible tripletes de A y T.
- C.-) La temperatura de fusión (tm) debe ser proporcional en ambos cebadores y encontrarse en un rango de 45-65°C.
- D.-) No se debe obtener estructuras secundarias (hairpins).
- E.-) Se deben presentar la menor cantidad posible de dímeros (sin homologías) en los cebadores.
- F.-) Se debe evitar la formación de productos alternos (Sharrocks, 1994).

Finalmente, se obtuvieron cebadores de 20 y 21 secuencias nucleicas y fueron designados como TOTF (5'-CCACCACTAATTCCCAAAC-3') y TOTR (5'-TGTCCCTCACCTTCAATAACC-3') respectivamente.

La amplificación de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 27.3 μ l conteniendo 23.5 μ l de Gibco^{BRL} PCR Supermix, 0.8 μ l de *Taq* DNA Polimerasa, 1 pmol de cebador TOTF, 1 pmol de cebador TOTR y 1 μ l de DNA molde. La amplificación se realizó en un termociclador Perkin Elmer 480 según las condiciones descritas en la tabla I.

Tabla (I) Condiciones programadas en el termociclador para la amplificación

No. de Ciclos	Tiempo (Minutos)	Temperatura °C.	Ciclo
1	7	95	Desnaturalización Inicial
8	1	94	Desnaturalización
	1	48	Reincorporación
	1:30	70	Síntesis
35	1	94	Desnaturalización
	1	51	Reincorporación
	1:30	70	Síntesis
1	7	70	Extensión

La limpieza del producto de PCR se realizó mediante la utilización del kit CONCERT Rapid Purification System Gibco^{BRL}. Se aplicó una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% para determinar la concentración final del DNA. La secuenciación del DNA purificado se llevó a cabo en un secuenciador automático ABI Prism 3100 de electroforesis capilar, y las secuencias resultantes fueron revisadas para su edición en el programa SEQUENCHER ver. 4.1 para Macintosh.

Una vez obtenidas las secuencias de aproximadamente 320 pares de bases (pb) en promedio, se localizó la secuencia correspondiente a los cebadores y se eliminó la parte subsiguiente hacia los extremos 5' y 3' incluyendo los cebadores. Hecho esto, se cargó al programa con la secuencia 5'-3' y 3'-5' de cada organismo, se alinearon automáticamente con un 85% de similitud como parámetro de entrada y se obtuvo una secuencia consenso para cada organismo.

Posteriormente, se editó de manera individual la secuencia consenso perteneciente a cada organismo. Para tal efecto, se revisaron manualmente las secuencias 5'-3', y 3'-5' así como su respectivo cromatograma y, de manera simultánea, basándonos en la lectura del cromatograma que presentara mayor nitidez, se editaron las posiciones en las cuales se presentó discrepancia entre las secuencias. Del mismo modo, se eliminaron del análisis

los primeros 40 pb (aprox.) de los extremos 5' y 3' de la secuencia consenso, ya que estos presentaban un alto grado de inconsistencias y ambigüedades mostradas por los cromatogramas, obteniendo secuencias finales de 254 pb en total.

Las secuencias consenso resultantes (Anexo 1) de la edición fueron alimentadas al programa Megalin (opción Clustal) para ser alineadas y construir un árbol filogenético preliminar. Cabe señalar que en este punto, se incluyó una secuencia tipo de Red Drum (*Sciaenops ocellatus*) con el objeto de enraizar el árbol filogenético. Las secuencias fueron alineadas automáticamente por el método Clustal, del mismo modo se obtuvo la matriz de distancias euclidianas y con base en ésta se construyó el árbol filogenético con el algoritmo UPGMA.

A partir de las secuencias alineadas, se determinaron manualmente los diferentes haplotipos presentes y posteriormente se comprobaron éstos utilizando un programa particular realizado en Matlab 5.3 (ANEXO 2). Con el base en estos haplotipos, se utilizó el programa Arlequín ver.2 para determinar índice de diversidad genética, el índice de diversidad nucleotídica, las diferencias pareadas entre los haplotipos, la distribución observada del número de diferencias pareadas entre los haplotipos (Mismatch distribution), a

la frecuencia haplotípica, así como también se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA).

Los algoritmos utilizados para las diferentes estimaciones son los siguientes:

Índice de Diversidad Genética

$$\hat{H} = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)$$

$$V(\hat{H}) = \frac{2}{n(n-1)} \left\{ 2(n-2) \left[\sum_{i=1}^k p_i^3 - \left(\sum_{i=1}^k p_i^2 \right)^2 \right] + \sum_{i=1}^k p_i^2 - \left(\sum_{i=1}^k p_i^2 \right)^2 \right\}$$

(1.0)

Donde n es el número de copias de genes en la muestra, k es el número de haplotipos, y, p_i es la frecuencia en la muestra del i -avo haplotipo.

Índice de diversidad nucleotídica.

$$\hat{\pi}_n = \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j < i} p_i p_j \hat{d}_{ij}}{L}$$

$$V(\hat{\pi}_n) = \frac{n+1}{3(n-1)L} \hat{\pi}_n + \frac{2(n^2 + n + 3)}{9n(n-1)} \hat{\pi}_n^2$$

(1.1)

Donde $\hat{d}_{ij}$ es un estimado de las mutaciones que han ocurrido desde la divergencia de los haplotipos i y j . k es el número de haplotipos, L es el número de loci, p_i es la frecuencia del haplotipo i .

Distribución observada del número de diferencias pareadas entre los haplotipos (Mismatch distribution)

$$FS(\tau, \theta_0, \theta_1) = FS(\theta_1) + \exp\left(-\tau \frac{\theta_1 + 1}{\theta_1}\right) \sum_{j=0}^S \frac{\tau^j}{j!} [FS - j(\theta_0) - FS - j(\theta_1)] \quad (1.2)$$

Donde $F_s(\theta) = \frac{\theta^s}{(\theta+1)^{s+1}}$ es la probabilidad de observar 2 haplotipos con s diferencias de manera aleatoria. τ es el tiempo en generaciones transcurrido de un tamaño de población N_0 a N_1 . u es la tasa de mutación. Por lo tanto: $\theta_0 = 2uN_0$, $\theta_1 = 2uN_1$, $\tau = 2ut$

Análisis de varianza molecular (TabII)

(Tabla II) AMOVA

Donde: G=Número de grupos, P=Número de poblaciones, N=Número total de individuos, SSD(EG)=Suma cuadrada de desviaciones entre grupos, SSD(EP/DG)=Suma cuadrada de desviaciones entre poblaciones/dentro de los grupos, SSD(DP)=Suma cuadrada de desviaciones dentro de las poblaciones, SSD(T)=Suma cuadrada de desviaciones total.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados SSD	Esperado media cuadrados
Entre grupos	G-1	SSD(EG)	$n''\sigma_a^2 + n'\sigma_b^2 + \sigma_c^2$
Entre poblaciones/dentro de los grupos	P-G	SSD(EP/DG)	$n\sigma_b^2 + \sigma_c^2$
Dentro de las poblaciones	N-P	SSD(DP)	σ_c^2
Total	N-1	SSD(T)	σ_τ^2

$$S_G = \sum_{g \in G} \sum_{p \in g} \frac{N_p^2}{N_g}, \quad n = \frac{N - S_G}{P - G},$$

$$n' = \frac{S_G - \sum_{p \in P} \frac{N_p^2}{N}}{G - 1}, \quad n'' = \frac{\sum_{g \in G} \frac{N_g^2}{N}}{G - 1}$$

(1.3)

Estadísticos F:

$$F_{CT} = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_T^2}, F_{SC} = \frac{\sigma_b^2}{\sigma_b^2 + \sigma_c^2} F_{ST} = \frac{\sigma_a^2 + \sigma_b^2}{\sigma_T^2} \quad (1.4)$$

Las secuencias consenso particulares de cada organismo se transformaron a sistema numérico mediante un programa particular realizado en Matlab ver. 5.3 (ANEXO 3) y a partir de estas se construyeron árboles filogenéticos en el programa STATISTICA ver. 6.0 utilizando los algoritmos UPGMA, Single Linkage, y Complete Linkage.

RESULTADOS

De la extracción realizada a partir de tejido la membrana inter-espinal de la aleta dorsal de cada organismo, se obtuvo DNA de alto peso molecular y de calidad adecuada. Posteriormente, se amplificó utilizando los cebadores diseñados y se purificó el producto, obteniéndose una concentración final de DNA de alrededor de 150 ng/ μ l para ser secuenciado (Fig. 2).

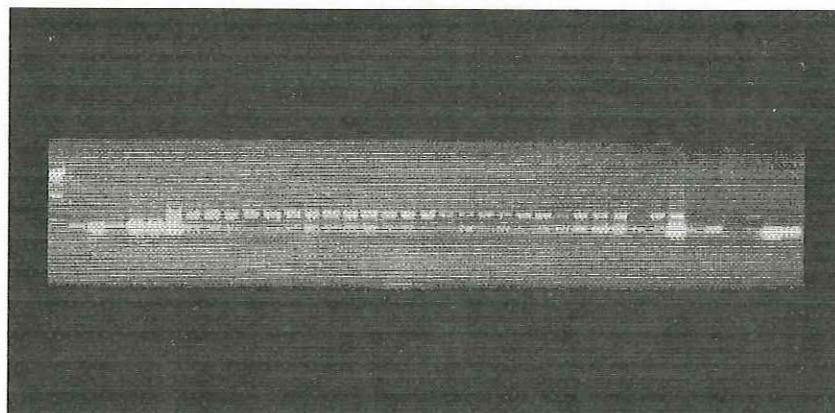


Fig. (2) Electroforegrama en agarosa al 1% de DNA purificado de 38 organismos de *Totoaba macdonaldi* pertenecientes al medio natural, carril extremo izquierdo escalera molecular 250 pares de bases.

1.- Diversidad haplotípica total.

Se analizaron los datos de secuencias de una porción de 254-pb de la región control mitocondrial de 40 organismos pertenecientes a la población natural y medio de cultivo, de las cuales se encontró un total de 5 Haplotipos: HA1,

HA2, HA3, HA4, HA5 y se incluyó como grupo externo el "Red Drum" HRD (Anexo 3).

Los haplotipos compartidos entre MN y RR fueron HA2 y HA5, el compartido por RR y CU fue HA1. La distribución haplotípica no se presentó homogénea entre de las poblaciones siendo el medio natural la que contiene mayor número de haplotipos (Tabla III).

Tabla(III) Distribución haplotípica entre las poblaciones MN=Medio Natural, RR=Reproductores CU=Cultivo, HRD=Red Drum.

Haplotipo	MN	RR	CU	RD
No.Organismos	20	10	10	1
HA1	0	1	10	0
HA2	7	5	0	0
HA3	4	0	0	0
HA4	3	0	0	0
HA5	6	4	0	0
HRD	0	0	0	1

Asimismo, el haplotipo que presentó mayor frecuencia relativa fue el HA2, con una frecuencia acumulada de 0.85 (Tabla IV).

Tabla(IV) Frecuencia relativa de haplotipos entre las poblaciones MN=Medio Natural, RR=Reproductores, CU=Cultivo, HDR=Red Drum.

Haplotipo	MN	RR	CU	HDR
No.Organismos	20	10	10	1
HA1	0	0.1	1	0
HA2	0.35	0.5	0	0
HA3	0.2	0	0	0
HA4	0.15	0	0	0
HA5	0.3	0.4	0	0
HDR	0	0	0	1

2.0 DIVERSIDAD HAPLOTÍPICA POR GRUPO (MN):

La población del medio natural consistió en 20 muestras en las cuales se presentaron 4 haplotipos HA2, HA3, HA4 y HA5, con 100 sitios polimórficos y una diversidad genética de 0.7632 ± 0.0460 . Se observaron 61 transversiones y 40 transiciones. La razón transiciones:transversiones fue de 0.65:1. La frecuencias relativa de los cuatro nucleótidos difirió, adenina fue la más prevalente (37.40%), seguida de timina (25.00%), citosina (26.34%) y guanina 11.26% presentando una diversidad nucleotídica de 0.252338 ± 0.126953 .

A su vez, las distancias inter-haplotípicas fueron mayores entre los haplotipos HA2-HA5, seguida de HA2-HA3 y HA2-HA4 (Tabla V)

Tabla(V) Matriz de Distancias Inter-haplotípicas de la población MN. SD en la diagonal superior.

	HA5	HA4	HA2	HA3
HA5		0.0123	0.0599	0.0131
HA4	0.0365		0.0591	0.0090
HA2	0.5104	0.5025		0.0592
HA3	0.0409	0.0200	0.5027	

La distribución observada del número de diferencias pareadas entre los genotipos (mismatch distribution) tuvo una distribución bimodal presentándose en un mayor porcentaje 10 diferencias entre pares de haplotipos (Fig.3).

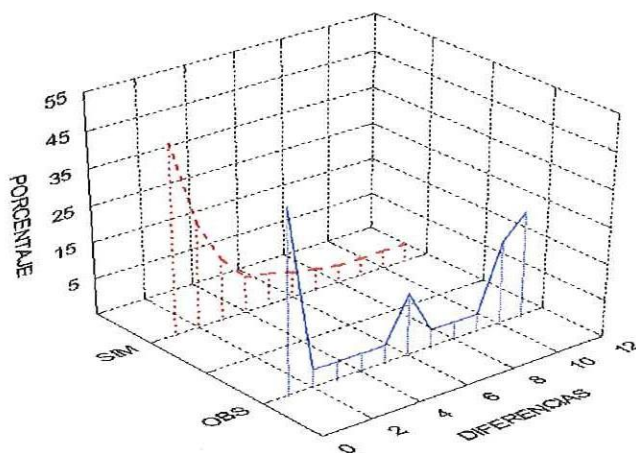


Fig.(3) Diferencias pareadas entre los Haplotipos de la población Medio Natural. OBS =observado, SIM = simulado.

Por lo que respecta a los Reproductores, se encontraron 3 haplotipos HA2, HA1 y HA5 en 10 muestras. Se presentaron 97 sitios polimórficos y una diversidad genética de 0.6444 +/- 0.1012. Se observaron 60 transversiones, 37 transiciones. La razón transiciones:transversiones fue de 0.61:1. La frecuencia relativa de los cuatro nucleótidos se presentó en los siguientes porcentajes: adenina (37.40%), timina (25.00%), citosina (26.34%) y guanina (11.26%). Su diversidad nucleotídica resultó en 0.284718 +/- 0.151903.

Las distancias inter-haplotípicas dentro del grupo de los reproductores se presentaron mayores entre los haplotipos HA2-HA5 y HA-HA2. (Tabla VI).

Tab(VI) Matriz de Distancias interhaplotípicas de la población RR. SD en la diagonal superior

	HA1	HA5	HA2
HA1		0.0116	0.0584
HA5	0.0324		0.0599
HA2	0.4949	0.5104	

Del mismo modo, la distribución observada en el número de diferencias pareadas entre los genotipos (mismatch distribution) mostró una distribución bimodal presentándose en un mayor porcentaje 8 diferencias entre pares de haplotipos (Fig. 4).

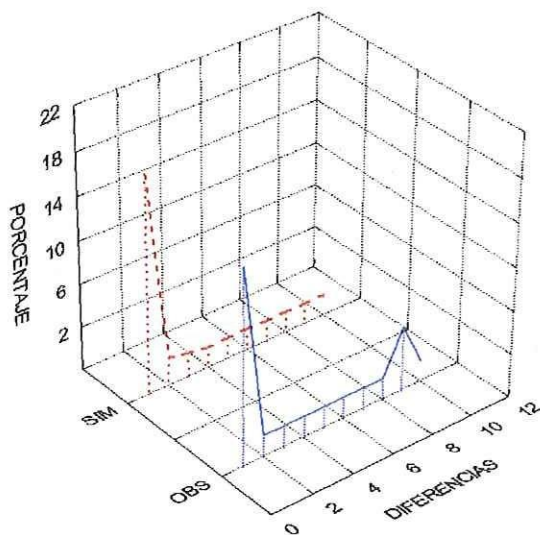


Fig.(4) Diferencias pareadas entre los haplotipos de la población de reproductores. OBS=Observado, SIM=Simulado.

2.2 DIVERSIDAD HAPLOTÍPICA POR GRUPO (CU):

En la población de cultivo, se encontró solamente un haplotipo HA1 en 10 muestras. Por lo tanto su diversidad genética, así como nucleotídica es 0.0. La frecuencia relativa de sus nucleótidos se presentó en los siguientes porcentajes: adenina (37.40%), timina (25.20%), citosina (26.38%) y guanina (11.02%).

2.3 DIVERSIDAD HAPLOTÍPICA POR GRUPO (RD):

El grupo externo fue constituido solamente por una muestra con el haplotipo HDR. Debido a esto su diversidad genética así como haplotípica se reporta con un valor de 0.0. La frecuencia relativa de sus nucleótidos consistió principalmente de adenina (40.16%), timina (24.02%), citocina (24.41%) y guanina (11.42%).

En lo referente al análisis de varianza molecular se encontró la mayor variación entre grupos 69.21% ($P=0.00196\pm0.00136$), una variación del 25.43% ($P=0.01760\pm0.00482$) dentro de las poblaciones y un 5.37% ($P=0.25024\pm0.01032$) entre los grupos dentro de las poblaciones.

Los valores de la comparación de diferencias pareadas de las poblaciones resultaron mayores entre los reproductores y el cultivo, mientras que dentro de las poblaciones, los reproductores tuvieron un mayor número de diferencias pareadas. (Tabla VII).

Tab(VII) DIFERENCIAS PROMEDIADAS PAREADAS ENTRE LAS POBLACIONES.

Encima Diagonal: No. Promedio de Diferencias Pareadas Entre las Poblaciones (PiXY)

Diagonal : No. Promedio de Diferencias Pareadas Dentro las Poblaciones(PiX)

Debajo Diagonal: No. Promedio Corregido de Diferencias Pareadas(PiXY-(PiX+PiY)/2)

Distancia: Kimura 2P

	MN	RR	CU
MN	64.09388	66.05783	47.32633
RR	-2.14825	72.31830	66.14923
CU	15.27940	29.99008	0.00000

Finalmente, se generaron arboles filogenéticos utilizando varios algoritmos; Single Linkage (vecino mas cercano) Complete Linkage (vecino mas distante) y UPGMA. El resultado fue el mismo en todos los casos (Fig. 5)

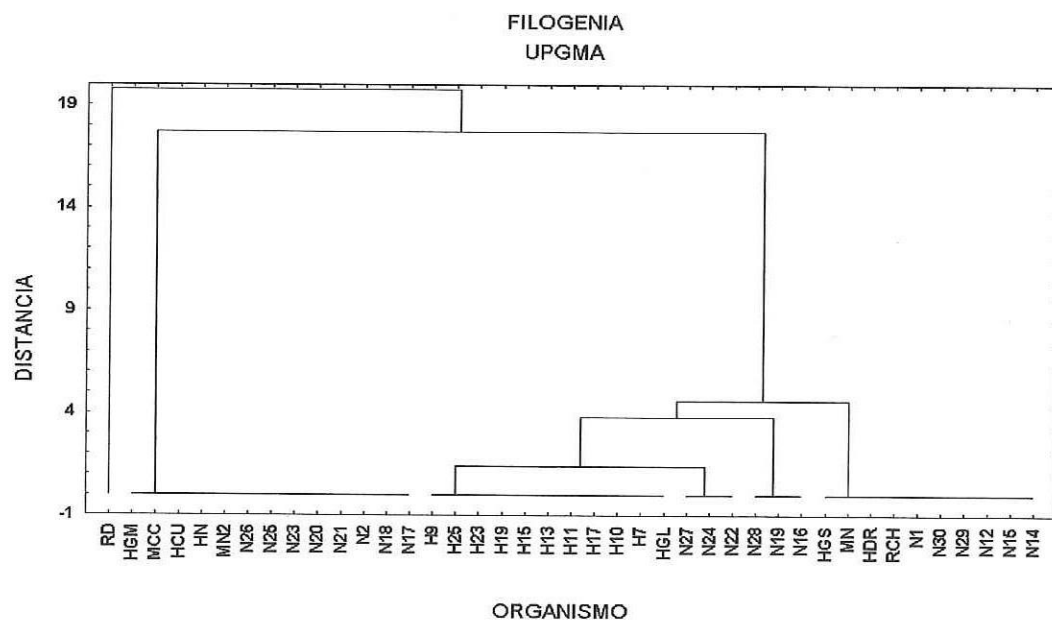


Fig. 5. Arbol filogenético de la totalidad de las muestras de totoaba generado con el algoritmo UPGMA. Incluye Red Drum.

DISCUSION

Los resultados de variabilidad haplotípica obtenidos en el presente estudio fueron altos, pero dentro de los rangos reportados para otras especies de peces marinos, incluyendo una especie endémica del Golfo de California (*Axoclinus nigricaudus*) la cual, tampoco presenta resultados fuera de los intervalos reportados para región control del mtDNA (Riginos & Nachman, 2001).

Sin embargo, la diversidad nucleotídica observada resulta particularmente alta en comparación al resto de las especies de peces marinos que han sido estudiadas mediante el análisis de su mtDNA. Por ejemplo, uno de los estudios más completos en que se han realizado utilizando el genoma mitocondrial para evaluar la variabilidad genética en especies de peces es el de Churikov *et al.* (2001). En ese estudio, se analizaron siete segmentos del mtDNA, que comprende el 97% del genoma mitocondrial en tres especies de salmón del Pacífico *Oncorhynchus gorbusha*, *O. keta*, *O. nerka*. La diversidad haplotípica que obtuvieron para las tres especies fluctuó en un intervalo de 0.098 a 0.77 mientras que su composición nucleotídica se mantuvo entre 0.032 y 0.56. Esto coincide con los valores de variabilidad genética encontrados en el genoma mitocondrial de la totoaba.

Del mismo modo, se ha caracterizado la diversidad genética de las poblaciones de salmón (*Salmo salar*), de prácticamente toda Europa, mediante el análisis del mtDNA de 2369 organismos distribuidos alrededor del continente. En este estudio se encontraron niveles máximos de diversidad haplotípica de 0.70 con una diversidad nucleotídica máxima reportada de 0.011, (Nilsson *et al.*, 2001). Esta última, es significativamente menor a la observada en el presente estudio tanto para las muestras del medio natural, como para las muestras de los reproductores

Por otro lado, se ha evaluado la variabilidad genética de otras especies de salmónidos como la trucha café (*Salmo trutta*) en el Danubio austríaco. Este estudio se realizó en 27 poblaciones, con un total de 600 individuos reportando diversidades haplotípicas y nucleotídicas promedio de 0.62 y 0.007, respectivamente con 12 haplotipos observados (Weiss, 2001). Otros estudios de la misma especie, han reportado intervalos de diversidad haplotípica de 0.22 a 0.80, así como de diversidad nucleotídica en el intervalo de 0.0009 a 0.0044 (Aurelle, 2001). De igual manera, en estos dos estudios, los valores de diversidad haplotípica se aproximan a los observados en la totoaba, mas no así los valores de diversidad nucleotídica.

Dentro de la familia de los Sciaenidos, en especies mas cercanas genéticamente a la totoaba, se han reportado índices de diversidad genética

para el red drum (*Sciaenops ocellatus*). Esta especie del Atlántico, de la misma manera que la totoaba, posee un gran valor comercial y fue objeto de pesca industrial intensa a mediados del siglo XX. En este caso se obtuvo la secuencia de 209 especímenes, en los cuales encontraron 134 haplotipos diferentes, lo que resultó en una diversidad haplotípica promedio de 0.98, y una diversidad nucleotídica promedio de 0.03 (Seyoum *et al*, 2000).

Los altos índices de diversidad nucleotídica se deben principalmente a la presencia del haplotipo HA2 en las muestras del medio natural. Debido a que este haplotipo es substancialmente diferente al resto, su observación en las muestras del medio natural se traduce en una alta diversidad nucleotídica.

El haplotipo HA2 está representado de igual manera dentro del grupo de los reproductores (Tab III). A pesar de que los reproductores fueron capturados dentro de la misma zona de muestreo, transcurrieron 6 años entre la captura de éstos y la colecta de muestras del medio natural empleadas en el presente estudio. Este hecho indica que el haplotipo HA2 prevalece en la población, por lo tanto, su hallazgo no es fortuito.

Lo anterior adquiere relevancia no por la presencia de este haplotipo en sí, sino por la ausencia de otros haplotipos que potencialmente formarían parte de la variabilidad genética de la población del medio natural.

Al respecto, podrían ser varias las probables causas que explicaran la ausencia de estos haplotipos. En primer lugar, se podría atribuir a la falta de una muestra más abundante y completa, ya que si damos por cierto el patrón migratorio de la totoaba, el cual considera al alto Golfo como el área de reproducción y crianza de la especie, entonces, dado el tamaño pequeño de la muestra, probablemente no se ha colectando toda la extensión de la variación de haplotipos existentes en la población natural.

Otra posible explicación podría ser la presencia de una marcada estructuración dentro de la población natural. Una fuerte estructuración en subpoblaciones o demos, trae como resultado una diferenciación entre los haplotipos pertenecientes a cada uno de éstos. La estructuración se genera mediante el aislamiento reproductivo de grupos de organismos; sin embargo, en el caso de organismos móviles es factible que exista coincidencia de organismos de más de una subpoblación en un punto del espacio por razones tróficas, etológicas, etc. Probablemente tan marcada divergencia entre el haplotipo HA2 y el resto, esté dada a causa de un aislamiento por distancia. A pesar de los altos niveles de flujo génico en organismos marinos, el aislamiento por distancia (Wright 1943) ha sido observado en un gran número de peces e invertebrados (e.g Johnson & Black 1995; Pogson *et al.*, 1995). Se tiene evidencia que las relaciones entre la distancia geográfica y la distancia genética dependen principalmente de la escala de la recolecta. Por ejemplo,

Palumbi *et al.* (1997), observaron una alta diferenciación genética en una población de cangrejos del Caribe únicamente a una escala geográfica amplia. Del mismo modo, en poblaciones de esturión, se han encontrado correlaciones positivas de distancias genéticas y geográficas entre archipiélagos, mas no dentro de los archipiélagos (Planes *et al.*, 1997). Algunas comparaciones entre corales solitarios altamente dispersos y no dispersos, han revelado aislamiento por distancia entre los que se consideran altamente dispersos, mas no así por los no dispersos (Helleberg, 1996).

A su vez, la discontinuidad del hábitat podría reducir el flujo genético en poblaciones de organismos marinos. Por ejemplo, varios estudios han encontrado que poblaciones isleñas aisladas por aguas oceánicas son genéticamente divergentes de aquellas continentales (Winans 1980; Bell *et al.*, 1982; Johnson & Black 1995). Del mismo modo, a lo largo de líneas de costa rocosas, se han reportado poblaciones de copépodos divergentes a aquellas poblaciones que ocupan un hábitat arenoso (Burton & Feldman 1981). El mismo patrón se ha observado en el pez gato (Ayvazian *et al.*, 1994) en el cual, subpoblaciones pertenecientes a un hábitat discontinuo divergen de sus homólogas de hábitats continuos.

En el caso del Golfo de California, se consideran al menos dos distintas áreas biogeográficas basadas en rango de distribuciones, composición de la

comunidad ictiológica, diferencias de salinidad, temperatura y corrientes (Thomson & Gillian 1983) y se conoce un caso de aislamiento por distancia en un pez de la región *Axoclinus nigricaudus*. Esta especie es endémica del Golfo de California y se reporta una alta diferenciación haplotípica entre los organismos recolectados en las costas de Baja California, las cuales presentan un hábitat discontinuo principalmente conformado por costas rocosas, y los obtenidos de las costas de Sonora, que por su parte presentan en su mayoría hábitats uniformemente arenosos (Riginos & Nachman 2001). Debido a esto, se podría especular un bajo flujo génico dentro de la población de totoaba, formando así subpoblaciones que se agregan en el alto Golfo, originadas principalmente mediante un aislamiento por distancia en conjunción a la discontinuidad del hábitat que se presenta en el Golfo de California. Sin embargo, hasta el momento esto no es más que una especulación, ya que para corroborarlo se requiere de un muestreo a mayor escala geográfica que abarque el rango completo de distribución de la especie.

Quizá la razón mas convincente de la ausencia de ciertos haplotipos potenciales sea la combinación de factores que llevaron a esta especie al peligro de extinción, como lo son la sobrepesca y la alteración del hábitat. Como se mencionó anteriormente, el mtDNA es sensible a cambios severos en el tamaño efectivo de la población, es decir el número de individuos que contribuyen al reservorio genético de la población y dejan descendencia a la

siguiente generación. Por lo tanto, la ausencia de estos haplotipos, bien puede ser atribuida a algún evento lo suficientemente intenso en tiempo y magnitud como la sobrepesca y alteración del hábitat, que redujo significativamente el tamaño efectivo de la población, eliminando así una gran porción de haplotipos de la población.

Por otro lado, encontramos un haplotipo dentro del grupo de los reproductores (HA1), que no está representado en las muestras del medio natural. A pesar de que este haplotipo presentó la menor frecuencia dentro del grupo de los reproductores (Tab. IV), es este único haplotipo el que dio origen a la progenia con la que se está repoblando a la población natural. Si este haplotipo efectivamente es poco frecuente en el medio natural, lo anterior resultaría conveniente para fines del repoblamiento, debido a que por medio del cultivo, teóricamente se esta incrementando la frecuencia de este haplotipo en el medio natural.

Como se mencionó con anterioridad, el mtDNA se hereda únicamente por vía materna, por lo tanto, la nula variabilidad genética observada en la población en cautiverio corresponde solamente al linaje materno de los individuos que le dieron origen. Queda por conocer si en realidad la variabilidad genética de la progenia es en efecto nula. Para tal efecto, se necesita de un análisis con técnicas capaces de detectar variación genética a nivel nuclear, como lo son

los microsatélites, en el cual se incluya a los machos del grupo de reproductores para conocer si la progenia proviene de una sola pareja o presenta paternidad múltiple.

CONSIDERACIONES FINALES

Se debe poner en contexto las variables que pueden influenciar directamente los niveles de variabilidad encontrados, tales como el intervalo de distribución de la especie, el área de recolecta y el tamaño de muestra. La mayoría de las muestras de totoaba fueron obtenidas en un área geográfica reducida (San Felipe-Santa Clara) (Fig. 1) en relación a la distribución de la especie a lo largo del Golfo de California. Del mismo modo, las muestras restantes se colectaron exclusivamente en las costas del puerto de San Felipe. Este aspecto, aunado al hecho que la toma de muestras se realizó totalmente de manera aleatoria, sin ningún tipo de diseño de recolección, reduce potencialmente la probabilidad de observar un mayor número de haplotipos y por lo tanto el intervalo completo de diversidad genética representado en la muestra. En lo posterior, se deberá realizar una recolección más completa en magnitud e intensidad aumentando principalmente el tamaño de muestra y el área de colecta.

Finalmente, el presente estudio provee descripciones básicas de la composición genética de la totoaba y plantea algunas posibles hipótesis respecto a las interpretaciones de los resultados obtenidos. Sin embargo, no es posible afirmar de manera conclusiva la estructura o no estructura de la población, la cual es de fundamental importancia para establecer las bases de un plan de manejo.

LITERATURA CITADA

- Aurelle, P. Berrebi, 2001. Genetic structur of brown trout (*Salmo trutta*) populations of south-western France: data from mitochondrial control region variability. *Molecular Ecology*, 10, 1551-1561.
- Avise J. C., Hamrick J.L. 1994. Conservation genetics: Case histories from nature. Chapman and Hall., N.Y., 512 pp.
- Avise J. C., Saunders., Hales L.S. 1979. Mitochondrial DNA differentiation in North Atlantic eels: population genetic consequences of an unusual life history pattern. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 83:4350-4354.
- Ayvazian S.G., Jonson M.S. , McGlashan D.J., 1994. High levels of genetic subdivision of marine and estuarine populations of the estuarine catfish *Cnidogobius macrocephalus* (Plotosidae) in southwestern Australia. *Marine Biology*, 118,25-31
- Bell L.J., Moyer J.T., Numachi K. 1982. Morphological and genetic variation in Japanese populations of the anemonefish *Amphiprion clarkii*. *Marine Biology*, 72,99-108.
- Berdegue J., 1955. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural* Tomo XVI Nums. 1-4 diciembre 1955.
- Burton R.S., Feldman M.W. 1981. Population genetics of *Tigriopus californicus*: II Differentiation among neighboring populations. *Evolution*, 35,1192-1205.
- Churikov, M. Matsuoka, X. Luan, A.K. Gray, VI.A. Brykov & A. J. Gharrett. 2001. Assessment of concordance among genealogical reconstructions from various mtDNA segments in three species of Pacific salmon (*genus Ocorhynchus*) *Molecular Ecology*, 10, 2329-2339.

- Chute G R. 1928. The Totuava Fishery of the California Gulf. California Fish and Game. 14:275-281.
- Cisneros Mata -, G Montemayor-López, M Roman Rodríguez. 1994. Life history and conservation of *Totoaba macdonaldi*. Conservation Biology. Pages 806-814. Volume 4. August 1995.
- Flanagan C. A. Hendrickson J. R., 1976. Observations of the commercial fishery and reproductive biology of the Totoaba *Cynoscion macdonaldi* in the northern Gulf of California. Fishery bulletin: Vol 74, No. 3
- Fleming, I. A. 1994. Captive breeding and the conservation of wild salmon populations. Conservation Biology, 8: 886-888.
- Helleberg M.E. 1996. Dependence of gene flow on geographic distance in two solitary corals with differential larval dispersal capabilities. *Evolution*, 50, 116-1175.
- Johnson M.S., Black R. 1995. Neighborhood size and importance of barriers to gene flow in an intertidal snail. *Heredity*, 75, 142-154.
- Kimura, M. 1983. The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press, New York, New York, USA.
- Palumbi 1997. Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annual review of Ecology and Systematics* 25, 547-572.
- Parker Issue Patricia G: March, 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker.
- Planes S., Galzin R., Bonhomme F. 1996. A genetic metapopulation model for reef fishes in oceanic islands: the case of the surgeonfish, *Acanthurus triostegus*. *Journal of Evolutionary Biology*, 9, 103-117.

- Pogson G.H., Mesa K.A., Boutilier R.G. 1995. Genetic population structure and gene flow in the Atlantic cod *Gadus Morhua*: a comparison of allozyme and nuclear RFLP loci. *Genetics*, 139, 375-385.
- Resienbichler R.R., Rubin S.P., 1999. Genetic changes from artificial propagation of Pacific salmon affect the productivity and viability of supplemented populations.- *ICES Journal of Marine Science*, 56: 459-466.
- Riginos & M. W. Nachman. 2001. Population subdivision in marine environments: the contribution of biogeography, geographical distance, and discontinuous habitat to genetic differentiation in a blennioid fish, *Axoclinus nigricaudus*. *Molecular Ecology*, 10, 1439-1453.
- Seifu Seyoum., Michael D. Triglani., Theresa M. Bert., Doug McElroy., Rod Stokes. 2000. An analysis of genetic population structure in red drum (*Sciaenops ocellatus*), based on mtDNA control region sequences. *Fish. Bull.* 98:127-138(2000).
- Sharrocks A. D. 1994. The design of primers for PCR. Pags 5-10 En *PCR TECHNOLOGY Current Innovations* (Eds. Griffin H.G. y A.M. Griffin). CRC Press, Inc. U.S.A. 5-60 pp.
- Thomson D.A., Gillian M. 1983. The rocky-shore fishes. In: *Island Biogeography of the Sea of Cortez* (Eds Case T, Cody M), pp 98-129. University of Berkeley Press, Berkeley C.A.
- True C. D., Loera A., Castro N., 1996. Is aquaculture the answer for the endangered totoaba? *World aquaculture*, December 1996.
- Waples, R. S. 1991. Genetic interactions between hatchery and wild salmonids: lessons from the Pacific Northwest. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48: 124-133.

- Waples, R. S.. Chi Do. 1994. Genetic risk associated with supplementation of Pacific Salmonids: Captive Broodstock programs. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 51: 310-329.
- Weiss, C. Schlotterer, H. Waidbacher & M. jungwgigh, 2001. Haplotype (mtDNA) diversity of brown trout *Salmo trutta* in tributaries of the Atlantic Danube: massive introgression of Atlantic basin fish-by man or nature?. *Molecular Ecology*, 10, 1241-1246.
- Winans G.A. 1980. Geographic variation in the milkfish *Chanos chanos*. I. Biochemical evidence. *Evolution*, 34,558-574.
- Wright S. 1943. Isolation by distance. *Genetics*, 28,114-138.

ANEXO 2

```
%ENCUENTRA LAS DIFERENCIAS PAREADAS DE NUCLEÓTIDOS ENTRE  
DOS SECUENCIAS  
%Y MUESTRA LA POSICION DE ESTAS.
```

```
T='T';  
A='A';  
C='C';  
G='G';  
N='N';
```

```
seq1 = input ('Alimenta Secuencia 1:');  
seq2 = input ('Alimenta Secuencia 2:');
```

```
o=length(findstr(seq1,seq2))  
if o==0  
    for k=1:length(seq1)  
        if seq1(k)~=seq2(k)  
            k  
            [seq1(k),seq2(k)]  
        end  
    end  
end  
end
```