

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS



**“ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL DE *Fundulus lima* (Teleostei)
EN LOS SISTEMAS HIDROLÓGICOS DE SAN IGNACIO Y LA PURÍSIMA,
MÉXICO”**

Tesis Profesional

Que para obtener el Título de:

BIÓLOGO

Presenta:

José Arquímedes Echánove Juan

Ensenada, Baja California, Octubre de 2010.

RESUMEN DE TESIS

ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL DE *Fundulus lima* (Teleostei) EN LOS SISTEMAS HIDROLÓGICOS DE SAN IGNACIO Y LA PURÍSIMA, MÉXICO

Poblaciones de la sardinilla peninsular amenazada *Fundulus lima*, fueron estudiadas en dos cuencas hidrológicas prioritarias de Baja California Sur (San Ignacio y La Purísima), durante los años: 1997, 2003 y 2004. Mediante la técnica de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) se encontró una disminución en el tiempo (1997 vs. 2003-2004) en heterocigosis y polimorfismo del 71.8% y 65%, respectivamente. Se igual manera observó una disminución en la distancia genética de hasta 9.44 veces haciendo la misma comparación, dicho disminución es asociada a la introducción e invasión del cíclido exótico *Tilapia cf. zillii*. A su vez, se encontraron marcadores moleculares (OPC14-L33 y OPC14-L34) que permiten distinguir las poblaciones de ambas cuencas. Se detectaron cambios en la frecuencia del marcador OPC14-L34 entre las poblaciones de la cuenca La Purísima, mismas que sugieren eventos de dispersión rápida después de una creciente extraordinaria. Estos resultados permitirán apoyar futuros planes de conservación de este taxón.

Resumen aprobado por: _____
Dr. Faustino Camarena Rosales
Presidente del Jurado

INDICE

INTRODUCCIÓN.....Error! Bookmark not defined.

Generalidades de la Especie.Error! Bookmark not defined.

ANTECEDENTESError! Bookmark not defined.

Área Geográfica de Estudio.....Error! Bookmark not defined.

HIPÓTESISError! Bookmark not defined.

OBJETIVOError! Bookmark not defined.

MATERIALES Y MÉTODOS.....Error! Bookmark not defined.

Muestreo.....Error! Bookmark not defined.

Captura de Organismos.....Error! Bookmark not defined.

Preservación y aislamiento de ADN total..... Error! Bookmark not defined.

Cebadores Oligonucléotidos:.....Error! Bookmark not defined.

Amplificación de ADNError! Bookmark not defined.

**CONDICIONES DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA
POLIMERASA (PCR).....Error! Bookmark not defined.**

Captura de los datos.....Error! Bookmark not defined.

Análisis de DatosError! Bookmark not defined.

Estadística DescriptivaError! Bookmark not defined.

Estadístico-F.....**Error! Bookmark not defined.**
Medidas Genéticas.....**Error! Bookmark not defined.**
Agrupamiento de Unión Promedio (UPGMA).. **Error! Bookmark not defined.**

RESULTADOS.....**Error! Bookmark not defined.**
Extracción de ADN de Fundulus lima.**Error! Bookmark not defined.**
Condiciones fisicoquímicas de PCR y elección de oligonucleótidos.
.....**Error! Bookmark not defined.**
Amplificación de ADN al azar y recolección de datos de los organismos muestreados.....**Error! Bookmark not defined.**

ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS.....**Error! Bookmark not defined.**
Heterocigocidad (H) y Polimorfismo (%P) **Error! Bookmark not defined.**

Poblaciones de las Cuencas Río San Ignacio y Río La Purísima.
.....**Error! Bookmark not defined.**
Localidades muestreadas en las Cuencas Río San Ignacio y Río La Purísima.**Error! Bookmark not defined.**
DISTANCIAS GENÉTICAS**Error! Bookmark not defined.**
Poblaciones de las cuencas Río San Ignacio y Río La Purísima.
.....**Error! Bookmark not defined.**
Localidades muestreadas en las cuencas Río San Ignacio y Río La Purísima**Error! Bookmark not defined.**

AGRUPAMIENTOS (UPGMA) BASADOS EN LAS DISTANCIAS
GENÉTICAS INSEGADAS DE NEI (1978).**Error! Bookmark not defined.**

Poblaciones de las cuencas hidrológicas Río San Ignacio y Río La
Purísima.**Error! Bookmark not defined.**

Agrupamiento de las localidades de las cuencas hidrológicas Río
San Ignacio y Río La Purísima.**Error! Bookmark not defined.**

FRAGMENTOS DIAGNÓSTICOS.....**Error! Bookmark not defined.**

DISCUSIÓN.....**Error! Bookmark not defined.**

*Extracción de ADN, PCR y oligonucleótidos.... **Error! Bookmark not
defined.***

*Niveles de Variación Génica.....**Error! Bookmark not defined.***

*Fragmentos diagnósticos específicos en poblaciones de F. lima y su
consideración como Metapoblaciones.....**Error! Bookmark not defined.***

Consideraciones finales**Error! Bookmark not defined.**

BIBLIOGRAFIA.....**Error! Bookmark not defined.**

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Pez endémico *Fundulus lima* Vaillant 1894. Fotografía por G. Ruiz-Campos. 2

Figura 2. Ubicación geográfica de las dos cuencas prioritarias objeto de este estudio, Cuenca del Río La Purísima y Cuenca del Río San Ignacio. El área sombreada corresponde a la distribución actual del pez *Fundulus lima*. Error! Bookmark not defined.

Figura 3. Sitios de muestreo en el área de estudio. Cuenca San Ignacio: San Ignacio, Poza Larga, Los Corralitos, y San Sabas. Cuenca La Purísima: Ojo de Agua, Presa Carambuche, Carambuche, y La Purísima (El Pílon). 8

Figura 4. Imagen satelital del Huracán “Marty” (a) del 22 de septiembre de 2003 cuando alcanzó la etapa de huracán, y (b) la mejor ruta trazada de su desplazamiento del 18 al 24 de septiembre. Error! Bookmark not defined.

Figura 5. Area de estudio con las localidades muestreadas tanto para la Cuenca deL Río San Ignacio –RSI- (a) y la Cuenca del Río La Purísima – RLP- (b). SS= San Sabas; CC= Los Corralitos; PL=Poza larga. LP= La

Purísima; PC= Presa Carambuche; OA= Ojo de Agua. Error! Bookmark not defined.

Figura 6. Fotografía del producto de una electroforesis en agarosa, iluminada con luz UV, con muestras de ADN extraídas de aletas de organismos congelados o fijados en etanol absoluto del pez *Fundulus lima*. Carril 1: Marcador de ADN de 500 bp. Carriles 2-6: ejemplos de ADN extraídos. Error! Bookmark not defined.

Figura 7. Reproducibilidad y consistencia de bandas ante un gradiente de concentración de ADN entre las muestras analizadas y los cebadores empleados. En (a), las líneas A-C, D-F, G-I, J-L, M-O, P-R y S-U se presentan diferentes concentraciones (60ng, 30 ng, 6ng) de ADN molde en un volumen de reacción de 25 µl, para los cebadores OPC-10, OPC-09, OPC-08, OPC-06, OPC-04, OPC-02 y OPC-01 respectivamente. En (b), la variación en los productos de amplificación de cebador OPC-08 con el mismo gradiente de concentración empleado como en (a), las líneas 1-3, representa un organismo de la localidad Los Corralitos, 4-6; de La Purísima, 7-9 de Poza Larga, y 10-12, de Ojo de Agua. El carril sin número corresponde al marcador molecular estándar de 250 pb. Error! Bookmark not defined.

Figura 8. Amplificaciones por PCR del oligonucleótido OPC-19 cargados en geles de agarosa al 1.4% y teñidos con bromuro de etidio. Error! Bookmark not defined.

Figura 9. Amplificaciones por PCR del oligonucleótido OPC-14 cargados en geles de agarosa al 1.4% y teñidos con bromuro de etidio. La fotografía del lado derecho evidencia un efecto de electróforesis que no afectó el análisis de resultados. Error! Bookmark not defined.

Figura 10. Amplificaciones por PCR del oligonucleótido OPC-01 cargados en geles de agarosa al 1.4% y teñidos con bromuro de etidio. Error! Bookmark not defined.

Figura 11. Amplificaciones por PCR del oligonucleótido OPC-08 cargados en geles de agarosa al 1.4% y teñidos con bromuro de etidio. Error! Bookmark not defined.

Figura 12. Agrupamiento (UPGMA) de las poblaciones de las cuencas Río San Ignacio y Río La Purísima usando distancia insesgada de Nei (1978). Error! Bookmark not defined.

Figura 14. Frecuencias observadas para los fragmentos OPC14-L33 y OPC13-L34 en las localidades de cada cuenca muestreada. Error! Bookmark not defined.

Figura 15. Frecuencias observadas del fragmento OPC19-L01 en todas las localidades de las CSI'03, CLP'03, CLP'04 y SI'97. Error! Bookmark not defined.

Figura 17. Modelo Metapoblacional propuesto para las poblaciones de *Fundulus lima* de las Cuencas Río San Ignacio y Río La Purísima. Las

subpoblaciones se encuentran aisladas espacialmente por una barrera física, permitiendo en tiempos ecológicos diferenciarse genéticamente; la ruptura de esta barrera (comunicación debido a una alta precipitación dentro de las cuencas), permite flujo génico entre subpoblaciones. Error!

Bookmark not defined.

Figura 18. Modelo de jerarquización de ríos. a) Poblaciones naturales son separadas por varias probabilidades de conectividad. Los números se refieren a probabilidades hipotéticas de conexión entre hábitat a largo plazo (tiempo, espacio). b) Disrupción hipotética de las situaciones naturales; en este caso, presas o estaciones de bombeo causan alteraciones severas en hábitat y en el flujo génico. Error! Bookmark not defined.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Localidades y fechas de muestreo en ambas cuencas prioritarias de B.C.S. (*) indican las fechas en que fueron recolectadas las muestras analizadas durante el estudio, en los años 1997, 2003 y 2004. Error!**

Bookmark not defined.

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleotidos iniciadores probados, obtenidos del paquete comercial Operon C.. Error! Bookmark not defined.

Tabla 3. Representación de la matriz de datos generada para los individuos muestreados. Simbología: 1= presencia de bandas, 2= ausencia. Error! Bookmark not defined.

Tabla 4. Simbología utilizada en la designación de localidades. Error! Bookmark not defined.

Tabla 5. Localidades y número de muestras Error! Bookmark not defined.

Tabla 6. Lista de oligonucleótidos de la serie Operon-C seleccionados en el presente trabajo. Error! Bookmark not defined.

Tabla 7. Estimaciones de Heterocigosidad y porcentaje de Loci Polimórficos en las poblaciones analizadas de las dos cuencas hidrológicas Río San Ignacio y Río La Purísima. Entre paréntesis se encuentra los porcentajes de reduccion en Heterocigocidad promedio y % loci polimorficos en comparación a los valores obtenidos para San Ignacio'97 (subrayados y en negritas). Error! Bookmark not defined.

Tabla 8. Estimaciones de Heterocigosidad y porcentaje de Loci Polimórficos en las 9 localidades analizadas de las dos cuencas hidrológicas Río San Ignacio y Río La Purísima. Entre paréntesis se encuentra los porcentajes de reduccion en Heterocigocidad promedio y %

loci polimorficos en comparación a los valores obtenidos para San Ignacio'97 (subrayados y en negritas). Error! Bookmark not defined.

Tabla 9. Distancia Inssegada de Nei (1978), de las poblaciones de las cuencas Río San Ignacio y Río La Purísima. Error! Bookmark not defined.

Tabla 10. Distancia Inssegada de Nei (1978), de las localidades de las cuencas Río San Ignacio y Río La Purísima. Un primer bloque en amarillo muestran las comparaciones de distancia genética entre las localidades de S.S.'03, L.C.'03, P.L.'03 de la cuenca RSI. En azul un segundo bloque es identificado comparando las distancias genéticas entre las localidades de L.P.'03, O.A.'03, L.P.'04, P.C.'04, O.A.'04, pertenecientes a la cuencas RLP; en gris, un tercer bloque comparando distancias genéticas entre localidades de ambas cuencas, RSI y RLP. Un ultimo bloque en naranja compara las distancias genéticas calculadas de la localidad S.I.'97 con el resto de las localidades de las dos cuencas RSI y RLP y donde se pudo observar un aumento de la distancia genética respecto al resto de los bloques. Error! Bookmark not defined.

Tabla 11. Definiciones, distancias genéticas por UPGMA de las poblaciones agrupadas por cada nodo. Error! Bookmark not defined.

Tabla 12. Resultados del análisis por “bootstrap” (con 1000 permutaciones) para las poblaciones de las Cuencas CSI y CLP. Error! Bookmark not defined.

Tabla 13. Índice de consistencia para cada nodo generado por UPGMA, para las poblaciones de las cuencas RSI y RLP. 46 loci produjeron árboles que contenían ataduras. Error! Bookmark not defined.

Tabla 14. Definiciones y distancias genéticas por UPGMA de las poblaciones agrupadas por cada nodo. Error! Bookmark not defined.

Tabla 15. Resultados del análisis por “bootstrap” (1000 permutaciones) para las localidades muestreadas en las Cuencas RSI y RLP. Error! Bookmark not defined.

Tabla 16. Índice de consistencia para cada nodo generado por UPGMA, para las localidades de las cuencas RSI y RLP. 56 loci produjeron arboles que contenían ataduras. Error! Bookmark not defined.

Tabla 17. Matriz de probabilidades combinadas para la diferenciación de las poblaciones de las cuencas RSI y RLP. 35

Tabla 18. Matriz de probabilidades combinadas para la diferenciación de las localidades de las cuencas RSI y RLP. 36

Tabla 19. Frecuencias observadas de los fragmentos que permitieron diferenciar las localidades muestreadas de las cuencas Río San Ignacio y Río La Purísima. En negritas y subrayadas se observan cambios en las frecuencias del marcador OPC14-L34 para la localidad de Ojo de Agua en sus dos años de muestreo 2003 y 2004. Error! Bookmark not defined.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS



**“ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL DE *Fundulus lima*
(Teleostei) EN LOS SISTEMAS HIDROLÓGICOS DE SAN IGNACIO Y LA
PURÍSIMA, MÉXICO”**

Tesis Profesional

Que para obtener el Título de:

BIÓLOGO

Presenta:

José Arquímedes Echánove Juan

Ensenada, Baja California, Agosto de 2009.

INTRODUCCIÓN

Las poblaciones del pez *Fundulus lima* Vaillant, 1894 (Fundulidae), representan un taxón endémico de los oasis sudcalifornianos cuya reciente abundancia, ha venido disminuyendo significativamente a raíz de la introducción y establecimiento de organismos exóticos (Ruiz- Campos et al., 2007), situación que ha colocado a esta especie en peligro de extinción (SEMARNAT, 2008).

El presente trabajo evaluó parámetros genéticos poblacionales del pez endémico peninsular *F. lima*, cuantificando la variabilidad genética usando métodos moleculares de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPDs, por sus siglas en inglés). Estos marcadores moleculares se evaluaron para diferentes localidades y considerando diferentes periodos de recolecta. Con base en los niveles de disimilitud en términos de distancia y variación genética fueron contruidos dendogramas con los agrupamientos, para poblaciones de las dos principales cuencas hidrológicas de Baja California Sur; Cuenca del La Purísima y Cuenca del San Ignacio, por otro lado, se utilizarón muestras obtenidas antes y después de la introducción de *Tilapia* (cf.) *zilli*, considerando que se asocia con un mayor riesgo de extinción de la especie endémica.

Generalidades de la Especie.

El género *Fundulus* pertenece a la familia Fundulidae que involucra alrededor de 30 especies (Parenti, 1981), de las cuales solo dos habitan las costas del Pacífico Americano, *F. lima* y *F. parvipinnis* (Camarena et al., 1999). El pez endémico *Fundulus lima* Vaillant, 1894 (Figura 1), posee una distribución de los oasis de la vertiente del pacífico desde San Ignacio hasta arroyo Las Pocitas, Baja California Sur (Ruiz-Campos y Contreras-Balderas, 1987; Ruiz-Campos et al., 2002), con un estatus de conservación de amenazada (SEMARNAT, 2002) debido a su distribución confinada y abundancia baja. Actualmente se encuentra en proyecto de ley recategorizarla al nivel de peligro de extinción (SEMARNAT, 2008).



Figura 1. Pez endémico *Fundulus lima* Vaillant 1894. Fotografía por G. Ruiz-Campos.

Clasificación taxonómica de *F. lima*

Orden: Cyprinodontiformes.

Familia: Fundulidae.

Subfamilia: Fundulinae

Género: *Fundulus*

Subgénero: *Xenisma*

Especie: *Fundulus lima*

Recientemente la especie *F. lima* se ha visto afectada por la introducción de peces exóticos e invasivos en los oasis, especialmente del cíclido etíopico *Tilapia* cf. *zilli*, que ha causado efectos negativos en la distribución y abundancia de este pez nativo. Monitoreos recientes (1991-1998) han revelado una baja abundancia relativa (0-5%) de *F. lima* contrastada con aquellas de especies exóticas como *T. cf. zilli* y *P. reticulata*, las cuales están desplazando y en algunos casos, eliminando a la especie íctica *F. lima* (Ruiz-Campos, 2000, Ruiz-Campos et al., 2007).

La muy posible competencia excluyente de *T. cf. zilli* sobre *F. lima* y como resultado el confinamiento espacial en la distribución de las poblaciones en las diferentes localidades, así como la variabilidad en las condiciones hidrológicas de la región, incluyendo los efectos estacionales de las sequías que incomunican cuerpos de agua, llevan a pensar en una disminución de la diversidad genética de *F. lima*.

El efecto catastrófico de las condiciones ambientales extremas, se agudiza con la presencia de huracanes, como el caso del huracán “Marty”, que afectó la zona durante el periodo de muestreo, brindando en forma complementaria la posibilidad de describir el comportamiento genético poblacional en respuesta ante disturbios ambientales extremos.

ANTECEDENTES

Estudios basados en análisis aloenzimáticos revelaron en el pez endémico *F. lima* una baja variabilidad genética en relación con la subespecie *F. parvipennis*, ésta última, con dos subespecies en la región marina costera californiana (Camarena *et al.* 2001). Esta baja variabilidad se relacionó a un efecto de fragmentación y reducción de las poblaciones (Camarena-Rosales, 1999).

En lo que respecta a la presión biológica de especies exóticas sobre *F. lima*, Alaniz-García (1995) encontró un traslape trófico significativo (> 60%) con *Xiphophorus helleri*, siendo un factor de competencia por el recurso alimentario.

En el año de 1996 se detectó la presencia del cíclido exótico *Tilapia cf. zillii*, en el oasis de San Ignacio, localidad tipo de *Fundulus lima*. Antes de la introducción *F. lima* era la especie íctica dominante con niveles de abundancia relativa del 70 al 97% (Alaníz-García, 1995), sin embargo diez años después la comunidad íctica fue dominada por el exótico con abundancias relativas del 84 al 94% (Ruiz-Campos *et al.*, 2006).

Considerando el inminente riesgo de extinción de *F. lima*, se ha recomendado un monitoreo en el tiempo, así como evaluar la variabilidad genética para determinar la vulnerabilidad que posee una población con estas características (Camarena-Rosales, 1999).

En cuanto a las técnicas para la evaluación genético poblacional, resalta la basada en RAPD-PCR, ya que permite un análisis rápido del ADN amplificado que permite comparar datos de decenas o cientos de individuos, sin la necesidad de requerir combinar otras técnicas como las de clonación (Arnheim et al, 1990). Los ensayos de amplificación aleatoria de ADN, se puede aplicar en la determinación individual y de parentesco, en análisis más sencillos, rápidos y efectivos, detectando polimorfismos (Rabouam, 1999). Su aplicación se basa en el uso de cebadores oligonucleótidos de secuencia aleatoria que producen fragmentos amplificados por PCR que de acuerdo a su ausencia o presencia son interpretadas como polimorfismos del ADN y producen marcadores genéticos finos a nivel de individuo, población o especie (Hadrys, 1992; Williams *et al*, 1990)

El estudio de análisis de marcadores RAPD's han sido probados por Dinesh *et al* (1993), en la detección de polimorfismo de peces permitiendo obtener resultados de distinción de huellas genéticas, como un método importante para el manejo de pesquerías y genética de conservación.

Área Geográfica de Estudio

La especie *Fundulus lima*, tiene un ámbito de distribución en los oasis de Baja California Sur, principalmente en las cuencas hidrológicas prioritarias de San Ignacio (CSI) y La Purísima (CLP) (Figura 2 y 3). Ambas cuencas no presentan ningún tipo de comunicación espacial evidente por lo que se encuentran geográficamente aisladas. Durante la temporada de sequía se

forman cuerpos de agua temporalmente aislados (oasis), mismos que se comunican entre sí durante la temporada de lluvias.

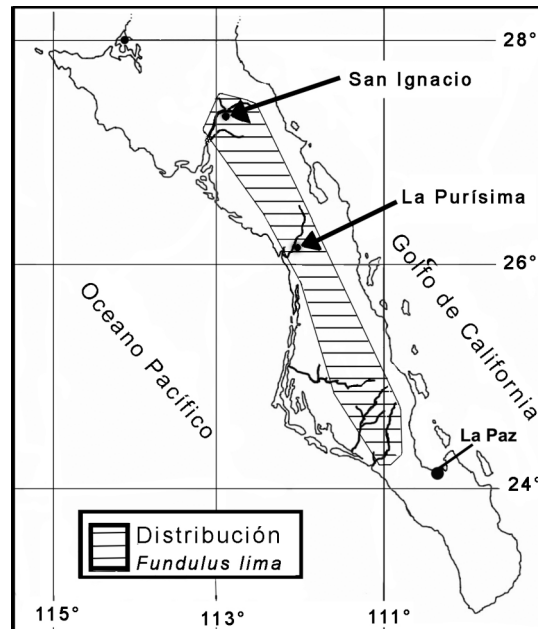


Figura 2. Ubicación geográfica de las dos cuencas prioritarias objeto de este estudio, Cuenca del Río La Purísima y Cuenca del Río San Ignacio. El área sombreada corresponde a la distribución actual del pez *Fundulus lima*.



SAN IGNACIO



POZA LARGA



LOS CORRALITOS



SAN SABAS



OJO DE AGUA



PRESA CARAMBUCHE



CARAMBUCHE



EL PILON

Figura 3. Sitios de muestreo en el área de estudio. Cuenca San Ignacio: San Ignacio, Poza Larga, Los Corralitos, y San Sabas. Cuenca La Purísima: Ojo de Agua, Presa Carambucho, Carambucho, y La Purísima (El Pilón).

En estos sistemas hidrológicos ocurren eventos extraordinarios de crecientes que modifican las condiciones fisiográficas e hidrológicas en las cuencas, prueba de ello ha sido la existencia del fenómeno climatológico Huracán “Marty” ocurrido entre el 18 y 24 de septiembre del 2003 (Figura 4a y 2b). “Marty” se desarrolló de una onda tropical que se movió dentro de la cuenca del Pacífico Norte desde Centroamérica 10 de septiembre, alcanzó el estado de Huracán escala 2 cuando aterrizó a 265 millas al sur-sureste de Cabo San Lucas, y en el período del 21 al 22 del mismo mes esparció fuertes vientos y lluvias torrenciales por la Península antes de disiparse (National Hurricane Center, NOAA, 2003). Este fenómeno comunicó de manera inusual y significativa los cuerpos de agua en la CSI y CLP, situación que no había ocurrido durante los últimos 50 años.

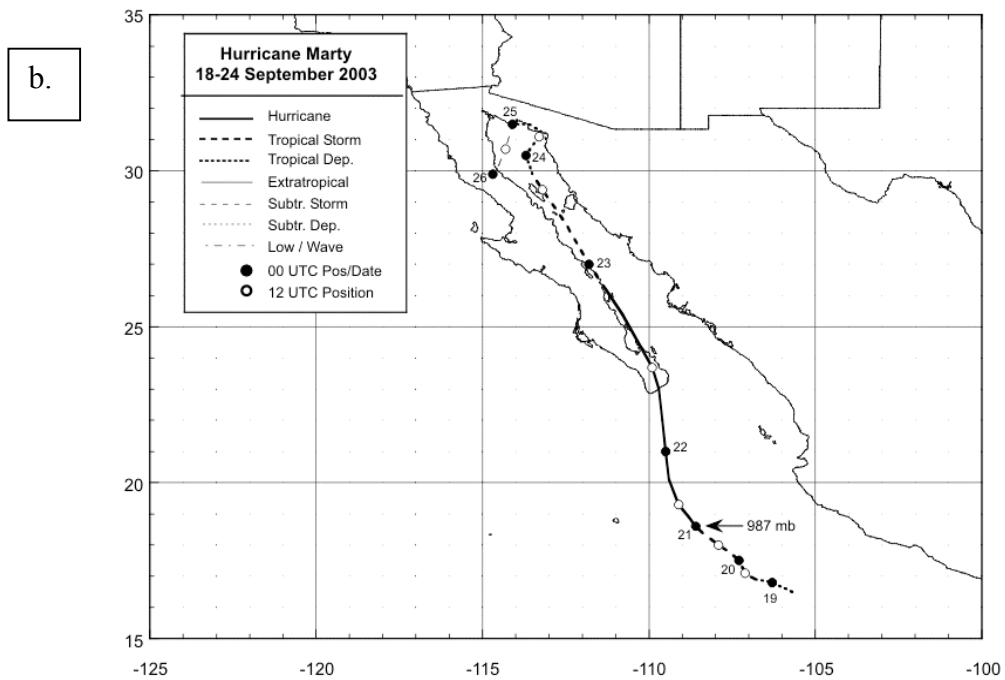
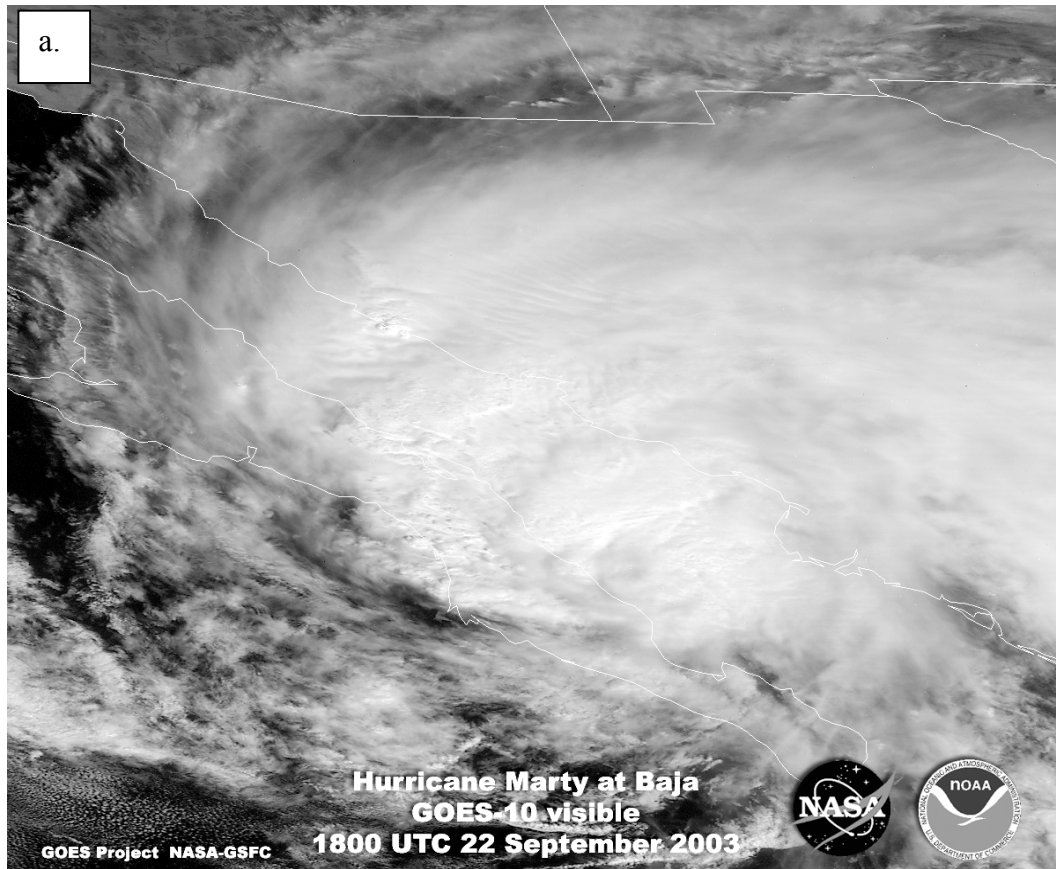


Figura 4. Imagen satelital del Huracán “Marty” (a) del 22 de septiembre de 2003 cuando alcanzó la etapa de huracán, y (b) la mejor ruta trazada de su desplazamiento del 18 al 24 de septiembre.

HIPÓTESIS

1. El pez *F. lima* es una especie endémica con niveles bajos de variabilidad genética.
2. Los niveles bajos de variabilidad genética de *F. lima*, están relacionados con altos niveles de endogamia y fragmentación de hábitat.
3. La variabilidad genética de *F. lima* se ha visto disminuida en el patrón temporal, asociada a un aumento en la densidad de peces exóticos (i.e. *Tilapia* cf. *zillii*, *Poecilia reticulata*, *Xiphophorus helleri*).
4. Debido al efecto catastrófico de las condiciones ambientales, existen diferencias significativas en los clados agrupados por estaciones de secas vs. estaciones con lluvias.
5. Existen diferencias significativas entre las poblaciones de *F. lima* concurrentes con peces exóticos (i.e. *Tilapia* cf. *zillii*, *Poecilia reticulata*, *Xiphophorus helleri*) y las poblaciones que no lo son.

OBJETIVO

- Evaluación de la estructura genética poblacional de la especie íctica endémica *F. lima* en diferentes localidades de las cuencas hidrológicas de San Ignacio y La Purísima, Baja California Sur, México, donde existe presencia o ausencia de peces exóticos.
- Relacionar los parámetros poblacionales con la presión biológica ejercida por las especies exóticas (i.e. *Tilapia* cf. *zillii*, *Poecilia reticulata*, *Xiphophorus helleri*).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Los organismos se recolectaron en las dos principales cuencas hidrológicas prioritarias de Baja California Sur: Cuenca Río San Ignacio (CSI) y Cuenca Río La Purísima (CLP) (Figura 1). Se analizaron muestras provenientes de la localidad tipo San Ignacio (El Manantial) localizada dentro de CSI, recolectadas en Diciembre de 1997 (SI'97) del proyecto “Estudio de la Variabilidad Genética de *Fundulus lima* y sus Relaciones Filogeográficas con otros Fundúlidos (Pises: Fundulidae) de la Península de Baja California, México” (Camarena *et al.*, 1999) previas a la introducción de *T. cf. zillii* en esa localidad, al igual que muestras post-introducción de exóticos en localidades de las cuencas anteriormente mencionadas (Tabla I, Figura 3) obtenidas en el proyecto “Evaluación Ecológica y Distributiva de Peces Exóticos en los Oasis de San Ignacio” (Ruiz-Campos *et al* 2002). Con lo anterior, se realizó un análisis tanto espacial (localidades) como temporal (1997 vs. 2003 y 2004) de la variación genética inter- e intrapoblacional de *F. lima*.

Tabla 1. Localidades y fechas de muestreo en las cuencas de Río San Ignacio y Río La Purísima, Baja California Sur. Los asteriscos indican las fechas de recolecta durante los años 1997, 2003 y 2004. Entre paréntesis se incluyen el acrónimo de la localidad seguida por el año de la recolecta.

LOCALIDADES	FECHAS DE MUESTREO			
	Diciembre 1997	Febrero 2003	Abril 2003	Marzo 2004
Cuenca Río San Ignacio (CSI)	SI'97	CSI'03		
El Manantial (SI'97)	***			
27°17'53"N, 112°53'12"W				
San Sabas (SS'03)		***		
27°11'51"N, 113°00'09"W				
Los Corralitos (LC'03)		***		
27°13'01"N, 112°59'16"W				
Poza Larga (PL'03)		***		
27°16'26"N, 112°54'46"W				
Cuenca Río La Purísima (CLP)			CLP'03	CLP'04
La Purísima-El Pílon (LP'03, LP'04)			***	***
26°10'58"N, 112°05'18"W				
Presa Carambuche (PC'04)				***
26°12'58"N, 112°01'12"W				
Ojo de Agua (OA'03, OA'04)			***	***
26°19'36.4"N, 111°58'40"W				

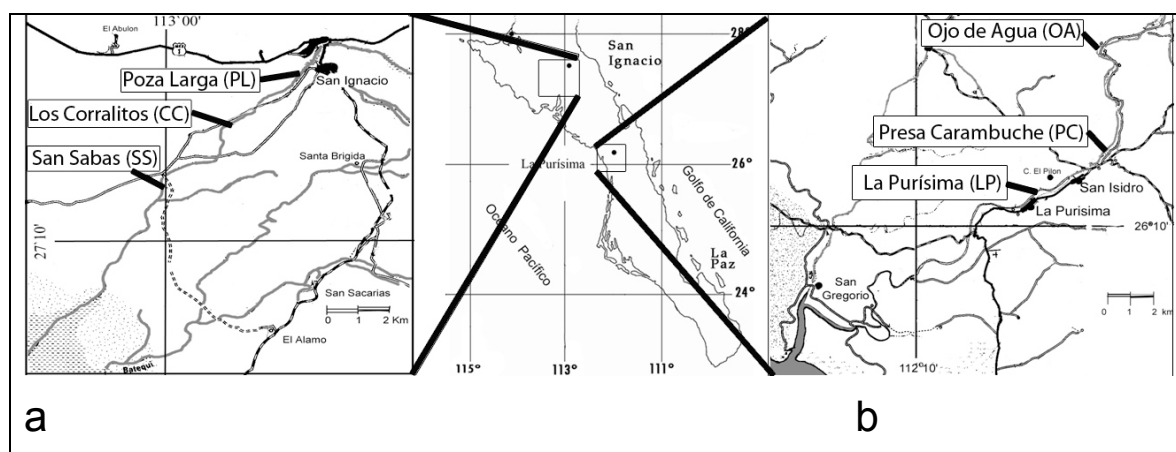


Figura 5. Área de estudio con las localidades muestreadas tanto para la Cuenca del Río San Ignacio –RSI- (a) y la Cuenca del Río La Purísima –RLP- (b). SS= San Sabas; CC= Los Corralitos; PL=Poza larga. LP= La Purísima; PC= Presa Carambuche; OA= Ojo de Agua.

Captura de Organismos

Se utilizaron trampas sardineras (tipo “minnow”), de 42 cm de longitud por 22 cm de ancho, con una entrada circular de 23 cm, y una luz de malla de 7.4 mm (descritas por Alaníz-García *et al.*, 2004), y fueron dejadas de 6 a 12 horas. Otras muestras fueron obtenidas mediante captura con chinchorro.

Preservación y aislamiento de ADN total.

Los organismos recolectados de las localidades de estudios fueron preservados individualmente, por dos métodos para su transporte al laboratorio: (a) por congelamiento con dióxido de carbono que permitió que el tejido se mantenga a una temperatura aproximada de -40°C , para su posterior almacenamiento en un ultracongelador Revco ® a -75°C ó (b) por fijación directa con alcohol etílico grado absoluto de cada organismo en el campo. Todo lo anterior con un previo etiquetamiento para cada una de las localidades y fechas de muestreo.

Para la extracción de ADN total, se tomaron de 20 a 50 mg de tejido epidérmico de la aleta pectoral de cada organismo, cortados con navajas y pinzas esterilizadas que permitieran la manipulación durante el corte, fueron lavados enérgicamente con agua destilada esterilizada, para luego ser pesados en una balanza analítica (Precisión $\pm 0.0001\text{g}$) hasta el rango deseado, también se realizaron extracciones de tejido muscular, evitando la posible contaminación de parásitos, como del nematodo *Contracaecum multipapillatum* frecuentemente alojado en la cavidad corporal (reportado por Camarena *et al.*, 2001 y Ruiz-

Campos *et al.*, 2007). La potencial contaminación de ADN foráneo que ha sido demostrada en otros estudios es un problema por la amplificación de bandas exógenas no pertenecientes al organismo de estudio debido a la sensibilidad de la técnica RAPD (Rabouam, 1999).

El ADN fue aislado mediante el método de extracción por sales descrito por Aljanabi y Martínez (1997), con la cual de 25-50 mg de tejido epitelial de la aleta pectoral del pez fueron homogenizados en 400 µl de una solución estéril del amortiguador STE (0.4 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM EDTA pH 8.0), 40 µl de SDS 20% (concentración final 2%) y 8 µl de Proteinasa K (20mg/ml) fueron añadidos a cada muestra y mezclados. Las muestras fueron incubadas a 55 °C durante 1.5 h, y retiradas; se mantuvieron hasta que alcanzaran la temperatura ambiente para evitar contaminación cruzada por escape de aerosoles entre muestras y se añadieron 300 µl de NaCl 6M (NaCl saturado en H₂O), posteriormente fueron mezcladas por 30 s a 1200 r.p.m., para luego ser centrifugadas por 30 min a 10,000 g. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo y fue añadido un volumen igual de cloroformo, homogenizado y centrifugado por 30 min a 10,000 g, la fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo y se le añadió un volumen igual de isopropanol absoluto (Sigma), mezclado e incubado al menos por 1 h a -20 °C. Las muestras fueron finalmente centrifugadas a 12,000 g a 4°C por 20 min., descartado el sobrenadante y el precipitado lavado con etanol 75%, secado, resuspendido en 200 µl de TE pH 8.0 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) y almacenado a -80 °C hasta su uso. La concentración del ADN total extraído de las muestras de *F. lima* fueron

estimadas con un estándar molecular (Ladder 250 bp-12Kb, Stratagene Cat. No. 201115-81).

Cebadores Oligonucléotidos:

Veinte oligonucleótidos de la serie comercial Operon-C (Operon Technologies) fueron probados para el análisis de la estructura genética de *F. lima*, y seleccionados con base en la reproducibilidad y consistencia en la amplificación de los fragmentos (Tabla 2).

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos iniciadores probados, obtenidos del paquete comercial Operon C..

Cebador	Secuencia
OPC-01	5'-TTCGAGCCAG-3'
OPC-02	5'-GTGAGGCGTC-3'
OPC-03	5'-GGGGGTCTTT-3'
OPC-04	5'-CCGCATCTAC-3'
OPC-05	5'-GATGACCGCC-3'
OPC-06	5'-GAACGGACTC-3'
OPC-07	5'-GTCCCGACGA-3'
OPC-08	5'-TGGACCGGTG-3'
OPC-09	5'-CTCACCGTCC-3'
OPC-10	5'-TGTCTGGGTG-3'
OPC-11	5'-AAAGCTGCGG-3'
OPC-12	5'-TGTCATCCCC-3'
OPC-13	5'-AAGCCTCGTC-3'
OPC-14	5'-TGCGTGCTTG-3'
OPC-15	5'-GACGGATCAG-3'
OPC-16	5'-CACACTCCAG-3'
OPC-17	5'-TTCCCCCAG-3'
OPC-18	5'-TGAGTGGGTG-3'
OPC-19	5'-GTTGCCAGCC-3'

OPC-20	5'-ACTTCGCCAC-3'
--------	------------------

Amplificación de ADN

Las muestras de ADN total del pez *F. lima* fueron amplificadas en mezclas de reacción que contenían en un volumen final de 25 µl: 1.1X Amortiguador de PCR (Invitrogen), 3mM MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 10 picomoles de cebador y 1 U de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen Cat. No. 18038) y 15-25 ng de ADN muestra. Los productos de amplificación fueron separados en geles de agarosa al 1.4 % (velocidad de corrimiento= 5 volts/cm), teñidos con Bromuro de Etidio (10 µg/ml) y visualizados en un transiluminador UV. Finalmente se fotografiaron en película Polaroid® Polapan 664.

CONDICIONES DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

Para comprobar la reproducibilidad y consistencia de los ensayos RAPD's, se realizaron experimentos siguiendo el protocolo descrito por Bielawski *et al* (1995) con olionucleotidos de la serie OP-C (Operon Technologies) (Tabla 2), que comprenden las siguientes condiciones del termociclador: [45 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 36°C y 2 min. a 72°C, con una extensión final de 10 min. a 72°C] y una desnaturalización inicial de 2 min, para ello se comprobaron el efecto en la concentración de ADN en el tubo de reacción en los cebadores empleados (Figura 1a y 1b) y la concentración de MgCl₂ (Figura 1c). Los experimentos mostraron reproducibilidad de bandas ante diferentes concentraciones de ADN (Figura 1b). De esta manera, el criterio de

selección de los cebadores se fundamentó en los oligonucleótidos que amplificaban fragmentos visibles y eran reproducibles dentro de cada muestra analizada ante un gradiente de concentración de ADN o de $MgCl_2$, con esto se aseguró que las bandas observadas no se vieran afectadas por la concentración de ADN de la muestra, para evitar amplificación de fragmentos que pudieran generar lecturas erróneas de los resultados.

Captura de los datos.

Las fotografías tomadas de los geles fueron capturadas digitalmente y analizadas con el programa Adobe Photoshop® 6.0 y se calculó el peso molecular a cada banda homóloga de acuerdo a la distancia de migración en el gel respecto del marcador estándar, con el programa FRAGMENT. Se construyó una matriz en código de dos números de acuerdo a la ausencia (2) ó presencia (1) de las bandas amplificadas entre las muestras de los diferentes organismos de *F. lima* (Tabla 3).

Tabla 3. Representación de la matriz de datos generada para los individuos muestreados. Simbología: 1= presencia de bandas, 2= ausencia.

Individuos	Loci analizados
1,1,	2,1,2,2,1,2,2,1,2,1,1,1,2,2,1,1,1,1,2,2,1,1,1,1,1,2,2,1,2,2,2,2,2,2,2,2,2,2,1,1,1,1,2,1,2,2,2,2
1,1,	2,1,2,2,1,2,2,1,2,1,2,1,1,2,2,1,1,1,1,2,2,1,2,2,2,2,2,2,2,2,2,2,1,1,1,1,1,2,1,2,2,2,2
2,2,	1,1,2,2,1,2,2,1,2,1,1,1,2,2,1,1,1,1,2,2,1,1,1,1,1,2,2,1,2,2,2,2,2,2,2,2,2,2,1,2,1,1,1,2,1,2,2,2,2
3,1,	1,1,2,2,1,2,2,1,2,1,1,1,2,2,1,1,1,1,2,2,1,1,1,1,1,2,2,1,2,2,2,2,2,2,2,2,2,2,1,1,1,1,2,1,2,2,2,2

Cada localidad muestreada perteneciente al mismo año y cuenca fueron consideradas como una población y su identificación en la matriz se resumió en la Tabla 4.

Tabla 4. Simbología utilizada en la designación de localidades.

Localidad	Descripción
1,1	Cuenca Río San Ignacio, localidad San Sabas 2003
1,2	Cuenca Río San Ignacio, localidad Los Corralitos 2003
1,3	Cuenca Río San Ignacio, localidad Poza Larga 2003
2,1	Cuenca Río La Purísima, localidad La Purísima (El Pilón) 2003
2,2	Cuenca Río La Purísima, localidad Ojo de Agua 2003
3,1	Cuenca Río La Purísima, localidad La Purísima (El Pilón) 2004
3,2	Cuenca Río La Purísima, localidad Presa Carambucho 2004
3,3	Cuenca Río La Purísima, localidad Ojo de Agua 2004
4,1	Cuenca Río San Ignacio, localidad El Manantial 1997

Análisis de Datos

Estadística Descriptiva

Los datos fueron analizados considerando el grupo total de bandas en todas las muestras de individuos. Los parámetros calculados fueron: a) frecuencia alélica y de heterocigotos, b) heterocigocidad por locus, c) heterocigocidad sobre todos los loci promedio, d) porcentaje de loci polimórficos, considerando ambas cuencas, por cuenca y por localidad de cada cuenca.

Los análisis de datos fueron conducidos con la asistencia del programa "Tools for Population Genetic Analysis"- TFPGA (Miller 1997), donde se

consideró la matriz de datos completos (Lynch y Milligan, 1994). El análisis estadístico se realizó a partir de la estimación de las frecuencias de los fragmentos no amplificados (q), con base en los fragmentos homólogos amplificados por el PCR en una población de individuos y que representan los loci homocigotos recesivos con la fórmula (Lynch y Milligan): $q = x^{-1/2}(1 - [x(1-x)/N]/8x^2)$, donde x es la proporción de la población sin el marcador, y N es el número de individuos muestreados; a partir de estas estimaciones se calcularon frecuencias alélicas, heterocigosidad, porcentaje de loci polimórficos, mismos que fueron analizados entre y dentro de cuencas, así como entre los diferentes años de muestreo del pez *F. lima*

Estadístico-F

Para establecer el grado de diferenciación de las localidades dentro de las poblaciones, así como el grado de diferenciación entre las poblaciones, se emplearon los métodos descritos por Weir y Cockerham (1984), aplicados a los datos para el cálculo de la estadístico F de Wright, que usualmente es empleado como una medida de la variación observada en las frecuencias alélicas entre poblaciones (Futuyma, 1998), y en términos biológicos representa la fracción en la reducción en heterocigosidad de una subpoblación debido, al menos, por deriva genética (Hartl, 1988).

Medidas Genéticas

Se empleó las medidas de distancia insesgada de Nei (1978). La identidad normalizada de Nei (1972) define a dos poblaciones diploides que se reproducen aleatoriamente como:

$$I_j = \sum x_i y_i / \sqrt{\sum x_i^2 y_i^2}$$

Donde x_i y y_i son las frecuencias del i -ésimo alelo en el j -ésimo locus en las poblaciones X y Y, respectivamente. También se ha descrito la identidad de genes entre las poblaciones X y Y respecto a todos los loci y se define como:

$$I = J_{xy} / \sqrt{J_x J_y}$$

Donde J_{xy} , J_x y J_y son las medias aritméticas de $\sum x_i y_i$, $\sum x_i^2$ y $\sum y_i^2$, sobre todos los loci, respectivamente.

De ahí entonces la distancia de Nei (1978) es definida como

$$D = -\log_e I$$

Agrupamiento de Unión Promedio (UPGMA)

Con base en las distancias genéticas calculadas se construyeron agrupaciones a nivel de cuencas y localidades muestreadas, usando UPGMA, que define la distancia entre grupos, como el promedio de todas las distancias comparadas para los miembros de dos grupos (Weir, 1996). Para obtener el grado de confiabilidad entre las topologías de los fenogramas construidos con

base en las distancias calculadas, se generaron 1000 pseudoréplicas por remuestreo con reemplazo para los loci. Esto último, fue construido con el propósito de reportar la significancia de los nodos o grupos resultantes (Weir, B. 1996).

RESULTADOS.

Extracción de ADN de *Fundulus lima*.

Muestras de ADN fueron extraídas de 116 especímenes de *Fundulus lima* recolectados en ambas cuencas y en diferentes periodos (Tabla 5), los cuales fueron seleccionados de acuerdo a la calidad de extracción, y a su vez verificadas y cuantificadas por medio de electroforesis en geles de agarosa, con marcadores estándares de ADN (Figura 4).

Tabla 5. Localidades y número de muestras

Año	de	Localidad	Número de muestras
recolecta			
2003		Poza Larga '03	14
2003		Los Corralitos '03	16
2003		San Sabas '03	14
2003		El Pílon '03	7
2003		Ojo de Agua '03	22
2004		El Pílon '04	7
2004		P. Carambuche '04	11
2004		Ojo de Agua '04	6
1997		San Ignacio '97	19
		TOTAL	116

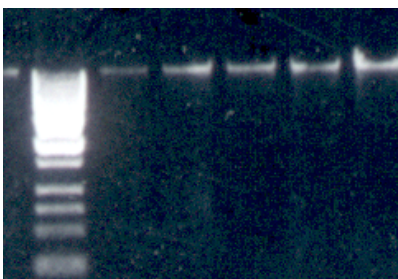


Figura 6. Fotografía del producto de una electroforesis en agarosa, iluminada con luz UV, con muestras de ADN extraídas de aletas de organismos congelados o fijados en etanol absoluto del pez *Fundulus lima*. Carril 1: Marcador de ADN de 500 bp. Carriles 2-6: ejemplos de ADN extraídos.

Condiciones fisicoquímicas de PCR y elección de oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos seleccionados: OPC-01, OPC-08, OPC-14 y OPC-19 (Tabla 6) de la serie Operon-C, generaron fragmentos de ADN amplificados por PCR que fueron consistentes al usar diferentes concentraciones de ADN molde y Cloruro de Magnesio (Figura 5).

Tabla 6. Lista de oligonucleótidos de la serie Operon-C seleccionados en el presente trabajo.

Cebador	Secuencia
OPC-01	5'-TTCGAGCCAG-3'
OPC-08	5'-TGGACCGGTG-3'
OPC-14	5'-TGCGTGCTTG-3'
OPC-19	5'-GTTGCCAGCC-3'

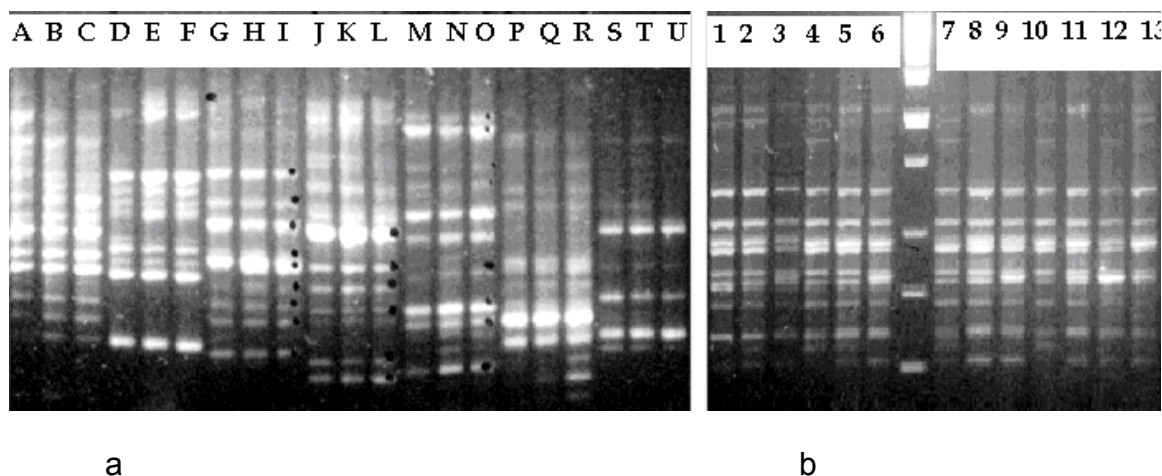


Figura 7. Reproducibilidad y consistencia de bandas ante un gradiente de concentración de ADN entre las muestras analizadas y los cebadores empleados. En (a), las líneas A-C, D-F, G-I, J-L, M-O, P-R y S-U se presentan diferentes concentraciones (60ng, 30 ng, 6ng) de ADN molde en un volumen de reacción de 25 μ l, para los cebadores OPC-10, OPC-09, OPC-08, OPC-06, OPC-04, OPC-02 y OPC-01 respectivamente. En (b), la variación en los productos de amplificación de cebador OPC-08 con el mismo gradiente de concentración empleado como en (a), las líneas 1-3, representa un organismo de la localidad Los Corralitos, 4-6; de La Purísima, 7-9 de Poza Larga, y 10-12, de Ojo de Agua. El carril sin número corresponde al marcador molecular estándar de 250 pb.

Amplificación de ADN al azar y recolección de datos de los organismos muestreados.

Un total de 58 loci fueron identificados (Figuras 6-9) para todas las poblaciones del pez *F. lima*, resumidos en una matriz de datos y usados en el análisis genético con el software TFPGA (Anexo I).

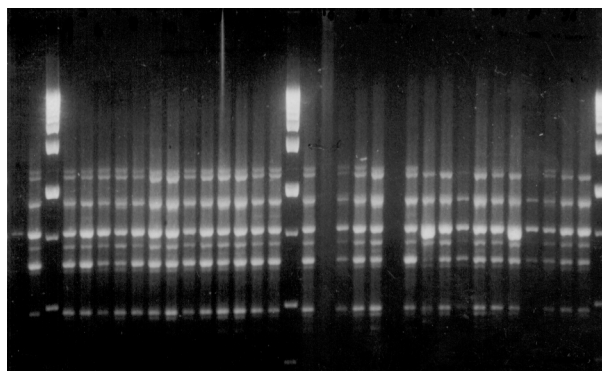


Figura 8. Amplificaciones por PCR del oligonucleótido OPC-19 cargados en geles de agarosa al 1.4% y teñidos con bromuro de etidio.

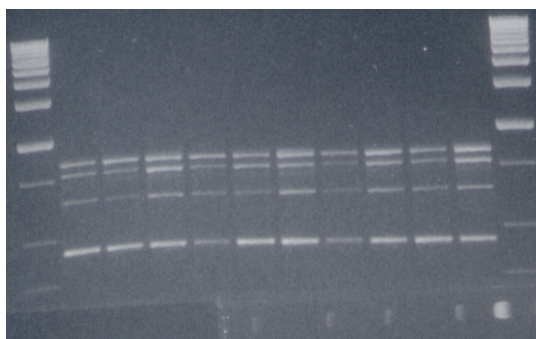


Figura 9. Amplificaciones por PCR del oligonucleótido OPC-14 cargados en geles de agarosa al 1.4% y teñidos con bromuro de etidio. La fotografía del lado derecho evidencia un efecto de electróforesis que no afectó el análisis de resultados.

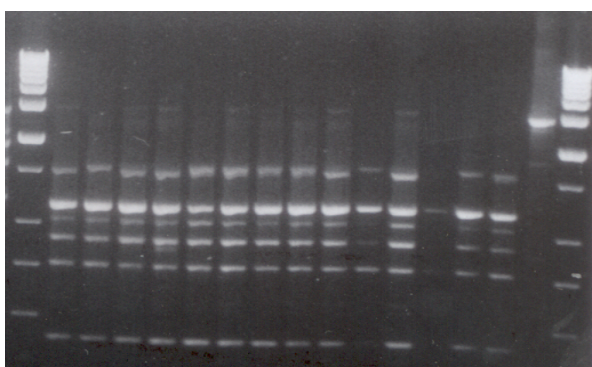


Figura 10. Amplificaciones por PCR del oligonucleótido OPC-01 cargados en geles de agarosa al 1.4% y teñidos con bromuro de etidio.

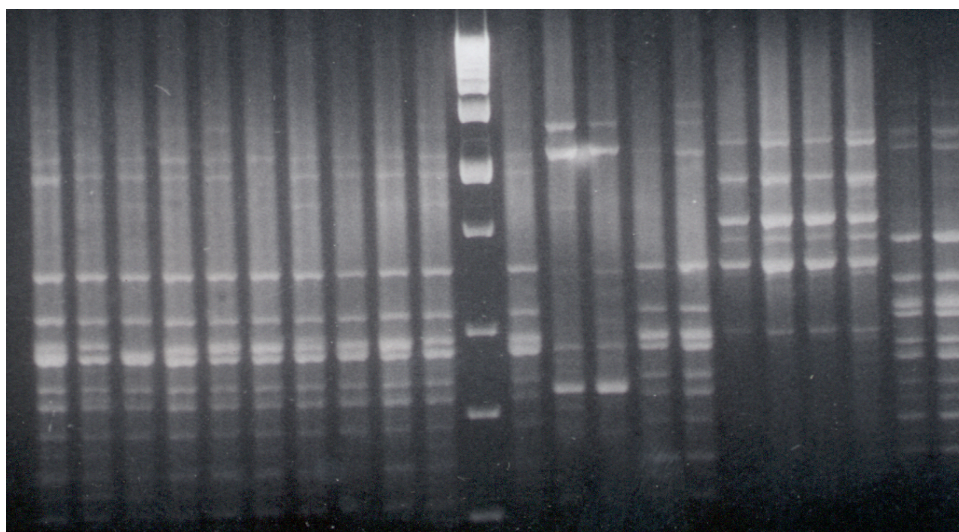


Figura 11. Amplificaciones por PCR del oligonucleótido OPC-08 cargados en geles de agarosa al 1.4% y teñidos con bromuro de etidio.

ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS

Heterocigocidad (H) y Polimorfismo (%P)

Poblaciones de las Cuencas Río San Ignacio y Río La Purísima.

Con base en las muestras de la población SI'97 ($H=0.2082$), para las recolectas de 2003 y 2004, se observó una reducción en la heterocigosidad promedio calculada de 49% en SI'03 ($H=0.1042$), 65% en LP'03 ($H=0.0733$), y 54.9% en LP'04 ($H=0.0939$) (Tabla 4).

De igual manera el porcentaje de loci polimórfico respecto a la población SI'97 (%P.= 67.24%), se redujo en un 46% en las poblaciones de SI'03

(%P.=36.2%), 71.8% en LP'03 (%P.=18.96) y 39.65% en LP'04 (%P.=27.58%) (Tabla 5).

Tabla 7. Estimaciones de Heterocigosidad y porcentaje de Loci Polimórficos en las poblaciones analizadas de las dos cuencas hidrológicas Río San Ignacio y Río La Purísima. Entre paréntesis se encuentra los porcentajes de reducción en Heterocigosidad promedio y % loci polimórficos en comparación a los valores obtenidos para San Ignacio'97 (subrayados y en negritas).

Población	Tamaño de muestra promedio	Heterocigosidad Promedio	Heterocigosidad Promedio insesgada	Heterocigosidad Prom. (Conteo Directo)	% loci polimórficos	% loci polimórfico (criterio 95%)
San Ignacio 2003 (SI'03)	41.90	0.104 (49)	0.106 (50.6)	0.104 (49)	36.207 (46)	31.035 (48.6)
La Purísima 2003 (LP'03)	25.59	0.073 (65)	0.075 (65)	0.073 (65)	18.966 (71.8)	18.966 (68.6)
La Purísima 2004 (LP'04)	20.60	0.094 (54.9)	0.097 (54.8)	0.094 (54.9)	27.586 (59)	24.138 (60)
San Ignacio 1997 (SI'97)	18.40	<u>0.208</u>	<u>0.214</u>	<u>0.208</u>	<u>67.241</u>	<u>60.345</u>

Localidades muestreadas en las Cuencas Río San Ignacio y Río La Purísima.

En los valores calculados para Heterocigosidad promedio y Porcentaje de loci polimórfico se observó una clara disminución en todas las localidades muestreadas en el 2003 y 2004, en comparación a la localidad de SI'97 muestreada en 1997 (Tabla 6). Por ejemplo, los resultados de H promedio mostraron valores menores desde un 59.3 % (LC'03, H=0.084) hasta un 73.5 % (LP'04, H=0.0551) respecto al valor H promedio de SI'97 (H=0. 2082).

Tabla 8. Estimaciones de Heterocigosidad y porcentaje de Loci Polimórficos en las 9 localidades analizadas de las dos cuencas hidrológicas Río San Ignacio y Río La Purísima. Entre paréntesis se encuentra los porcentajes de reducción en Heterocigosidad promedio y % loci polimórficos en comparación a los valores obtenidos para SI'97 (subrayados y en negritas).

LOCALIDAD	Tamaño de muestra promedio	Heterocigosidad Promedio	Heterocigosidad Promedio (Inesgada)	Heterocigosidad Prom. (Conteo Directo)	% loci polimórfico (sin criterio)	% loci polimórfico (criterio 95%)
Poza Larga '03 (PL'03)	13.707	0.065 (69)	0.067 (68.6)	0.065 (69)	22.414 (66.6)	17.241 (71.4)
Los Corralitos '03 (PL'03)	15.069	0.084 (59.6)	0.087 (59.3)	0.084 (59.6)	25.862 (61.5)	22.414 (62.8)
San Sabas '03 (SS'03)	13.121	0.057 (73)	0.059 (72.5)	0.057 (73)	18.966 (71.8)	13.793 (77.1)
La Purísima '03 (El Pilón) (LP'03)	6.690	0.063 (70)	0.068 (68.1)	0.063 (70)	15.517 (76.9)	15.517 (74.3)
Ojo de Agua '03 (OA'03)	19.571	0.060 (71.2)	0.061 (71.3)	0.060 (71.2)	16.071 (76.1)	14.286 (76.3)
La Purísima '04 (El Pilón) (LP'04)	6.107	0.055 (73.5)	0.061 (71.5)	0.055 (73.5)	14.286 (78.7)	14.286 (76.3)
Presa Carambuche '04 (PC'03)	9.707	0.066 (68.5)	0.070 (67.2)	0.066 (68.5)	17.241 (74.3)	17.241 (71.4)
Ojo de Agua '04 (OA'03)	5.179	0.052 (75)	0.058 (72.7)	0.052 (75)	14.286 (78.7)	14.286 (76.3)
San Ignacio '97 (SI'97)	18.397	<u>0.208</u>	<u>0.214</u>	<u>0.208</u>	<u>67.241</u>	<u>60.345</u>

DISTANCIAS GENETICAS

Poblaciones de las cuencas Río San Ignacio y Río La Purísima.

En las comparaciones de las poblaciones San Ignacio'03 (SI'03), La Purísima '03 (CLP'03) y La Purísima'04 (CLP'04), se observaron bajos valores de distancia genéticas (SI'03-LP'03, $D = 0.0627$; SI'03-CLP'04, $D = 0.0567$; y CLP'03-CLP'04, $D = 0.0683$). Cuando comparamos estas mismas poblaciones con la población muestreada en 1997 de San Ignacio (SI'97), es posible observar en ellas un aumento similar en sus distancias genéticas (por ejemplo, la comparación SI'97-LP'03, $D = 0.6705$), representando en promedio un aumento de 9.44 veces la distancia genética observada.

TABLA 9. Distancia Insegada de Nei (1978), de las poblaciones de las cuencas Río San Ignacio y Río La Purísima.

Distancia Insegada de Nei (1978)				
Población	Población			
	San Ignacio 2003	La Purísima 2003	La Purísima 2004	San Ignacio 1997
San Ignacio 2003 (SI'03)	*****			
La Purísima 2003 (CLP'03)	0.063	*****		
La Purísima 2004 (CLP'04)	0.057	0.068	*****	
San Ignacio 1997 (SI'97)	0.528	0.671	0.573	*****

El conjunto de datos contienen genotipos de individuos muestreados a partir de localidades dentro de poblaciones. Para el análisis se consideraron las condiciones de Organismos Diploides, con un tipo de marcador Dominante y asumiendo el equilibrio H-W. Las frecuencias alélicas fueron estimadas a partir de la expansión de Lynch y Milligan (1994).

Localidades muestreadas en las cuencas Río San Ignacio y Río La Purísima

La distancia genética es baja, dentro del grupo de las localidades muestreadas de la CSI y CLP para el período 2003-2004, con valores dentro de la cuenca CSI de $D=0.059$ (SS'03-LC'03), $D=0.061$ (SS'03-PL'03), y $D=0.008$ (LC'03-PL'03). Esta última distancia representa el valor más bajo y por consecuente la identidad más alta para todas las localidades comparadas de ambas cuencas. Por su parte, en CLP se observaron distancias calculadas que oscilaron entre 0.0095 (LP'03-PC'04) y 0.0900 (OA'03-OA'04), para las localidades comparadas.

La comparación de localidades entre ambas cuencas para el período 2003-2004, en general arrojaron valores similares a la comparación en una misma cuenca. Sin embargo, se observaron algunas distancias ligeramente altas del orden de 0.1474 (SS'03-OA'04), 0.0985 (LC'03-OA'04), y 0.1063 (PL'03-OA'04).

Hubo una disminución de 9.24 veces en la distancia genética calculada de las localidades muestreadas en el período 2003-2004, con respecto a la localidad tipo de SI'97.

TABLA 8. Distancia Insegada de Nei (1978), de las localidades de las cuencas Río San Ignacio y Río La Purísima. Un primer bloque en amarillo muestran las comparaciones de distancia genética entre las localidades de S.S.'03, L.C.'03, P.L.'03 de la cuenca RSI. En azul un segundo bloque es identificado comparando las distancias genéticas entre las localidades de L.P.'03, O.A.'03, L.P.'04, P.C.'04, O.A.'04, pertenecientes a la cuencas RLP; en gris, un tercer bloque comparando distancias genéticas entre localidades de ambas cuencas, RSI y RLP. Un ultimo bloque en naranja compara las distancias genéticas calculadas de la localidad S.I.'97 con el resto de las localidades de las CSI y CLP y donde se pudo observar un aumento de la distancia genética respecto al resto de los bloques.

Localidad	LOCALIDAD							
	SS'03	L.C '03	PL'03	LP'03	OA'03	LP'04	PC'04	OA'04
1. SS'03	*****							
2. LC'03	0.059	*****						
3. PL'03	0.061	0.008	*****					
4. LP'03	0.100	0.054	0.074	*****				
5. OA'03	0.059	0.040	0.041	0.034	*****			
6. LP'04	0.071	0.063	0.077	0.048	0.051	*****		
7. PC'04	0.063	0.081	0.094	0.070	0.030	0.010	*****	
8. OA'04	0.147	0.099	0.106	0.065	0.090	0.050	0.051	*****
9. SI'97	0.586	0.573	0.584	0.715	0.648	0.683	0.606	0.599

AGRUPAMIENTOS (UPGMA) BASADOS EN LAS DISTANCIAS GENÉTICAS INSESGADAS DE NEI (1978).

Poblaciones de las cuencas hidrológicas Río San Ignacio y Río La Purísima.

Utilizando las distancias genéticas ineseegadas de Nei (1978) se construyeron fenogramas para las poblaciones de la CSI y CLP (Figura 10). Aquí se identificó la separación del clado SI'97 del resto de las poblaciones analizadas. Réplicas validadas con bootstrap arrojaron una proporción idéntica para esta clasificación y con un soporte del 100% de loci totales (Tabla 10 y 11). Un segundo nodo fue observado separando a la población de CLP'03 de aquéllas de CLP'04 y CSI'03, con una proporción de réplicas idénticas generadas con bootstrap de 1.0 y un soporte de 72.41% (Tabla 10). Las poblaciones de CLP'04 y CSI'03 fueron separadas en un tercer nodo del resto, con un soporte bajo del orden de 3.45%.

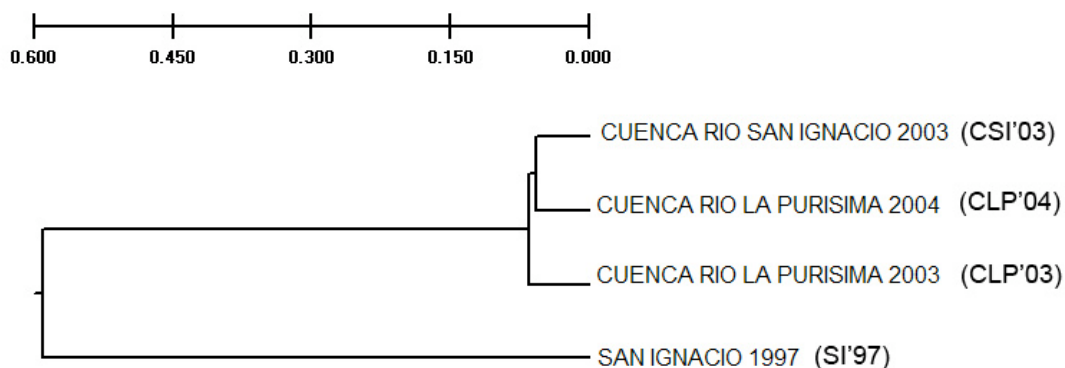


Figura 12. Agrupamiento (UPGMA) de las poblaciones de las cuencas Río San Ignacio y Río La Purísima usando distancia ineseegada de Nei (1978).

Tabla 11. Definiciones por nodo de las distancias genéticas basado en UPGMA de las poblaciones analizadas.

NODO	DISTANCIA	POBLACIONES
1	0.057	RIO SAN IGNACIO 2003, RIO LA PURISIMA 2004.
2	0.066	RIO SAN IGNACIO 2003, RIO LA PURISIMA 2004, RIO LA PURISIMA 2003.
3	0.590	RIO SAN IGNACIO 2003, RIO LA PURISIMA 2004, RIO LA PURISIMA 2003, RIO SAN IGNACIO 1997.

Tabla 12. Resultados del análisis por “bootstrap” (con 1000 permutaciones) para las poblaciones de las Cuencas CSI y CLP.

Nodo	Proporción de Réplicas Idénticas
1	0.493
2	1.000
3	1.000

Cero réplicas por bootstrap produjeron árboles que contienen ataduras

Tabla 13. Índice de consistencia para cada nodo generado por UPGMA, para las poblaciones de las cuencas CSI y CLP. 46 loci produjeron árboles que contenían ataduras.

Nodo	Número de loci que soportan el nodo	% loci totales soportando el nodo	% de loci utilizados para soportar el nodo
1	2	5.17%	3.45%
2	42	74.14%	72.41%
3	58	100.00%	100.00%

Agrupamiento de las localidades de las cuencas hidrológicas Río San Ignacio y Río La Purísima.

Se observó la formación de tres grupos con base en las distancias genéticas calculadas, donde un nodo separa a SI'97 del resto de las localidades analizadas, con una distancia de $D=0.6245$, una proporción de replicas idénticas generadas por bootstrap de 1.0, y un soporte de 96.55% de loci totales. Con excepción de SI'97 las localidades analizadas formaron dos grupos claramente visibles, uno que separa a las localidades de la cuenca Río San Ignacio muestreada en el año 2003 (LC'03, PL'03 y SS'03), de las localidades de la Cuenca Río La Purísima muestreada en los años 2003 y 2004 (LP'04, PC'04, LP'03, OA'03 y OA'04) con una distancia promedio de $D=0.078$, una proporción de réplicas idénticas generadas por bootstrap de 0.996, y una consistencia de 70.69% de loci totales.

Dentro de la CSI se reconocieron dos nodos, el primero con una distancia promedio de $D=0.058$ que separó a SS'03 del resto de las localidades; y un segundo separando a las localidades de LC'03 y PL'03 con una distancia promedio de $D=0.008$.

En la CLP se distinguió un nodo que separó a OA'04 del resto de las localidades con una distancia promedio de $D=0.078$. Asimismo, los grupos de localidades LP'04-PC'04 y LP'03-OA'03 fueron separados en dos nodos con distancias genéticas promedios de 0.01 y 0.034, respectivamente.

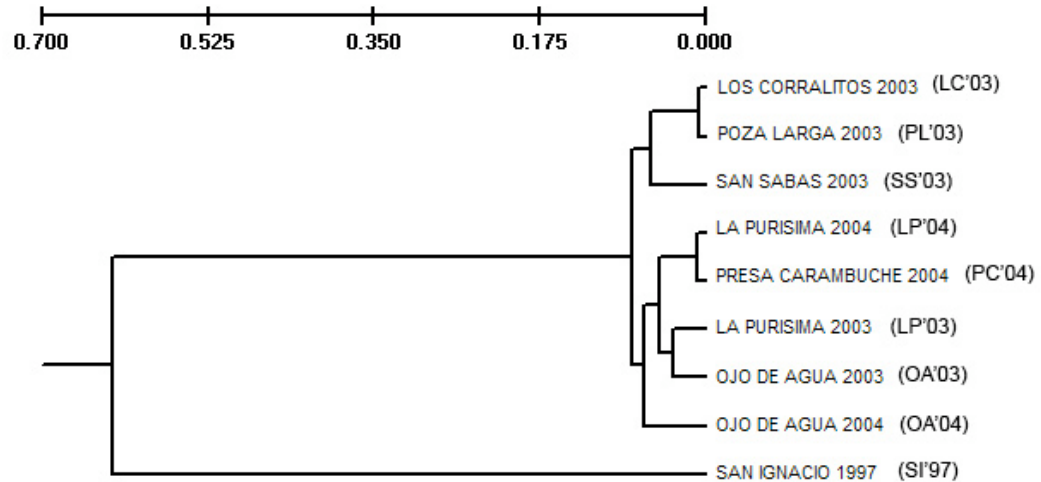


Figura 13. Agrupamiento por localidades (UPGMA) usando distancia insesgada de Nei (1978).

Tabla 14. Definiciones y distancias genéticas de las poblaciones agrupadas por nodo.

NODO	DISTANCIA	POBLACIONES
1	0.008	LC'03, PL'03
2	0.058	LC'03, PL'03, SS'03
3	0.010	LP'04, PC'04
4	0.034	LP'03, OA'03
5	0.050	LP'04, PC'04, LP'03, OA'03
6	0.064	LP'03, OA'03, LP'04, PC'04, LP'03, OA'3
7	0.078	LC'03, PL'03, SS'03, LP'03, OA'03, LP'04, PC'04, LP'03, OA'03
8	0.625	LC'03, PL'03, SS'03, LP'03, OA'03, LP'04, PC'04, LP'03, OA'03, SI'97.

Tabla 15. Resultados del análisis por “bootstrap” (1000 permutaciones) para las localidades muestreadas en las CSI y CLP.

Nodo	Proporción de Réplicas Idénticas
1	0.932
2	0.423
3	0.920
4	0.463
5	0.216
6	0.334
7	0.996
8	1.000

Cero réplicas por bootstrap produjeron árboles que contienen ataduras

Tabla16. Índice de consistencia para cada nodo generado por UPGMA, para las localidades de las CSI y CLP. 56 loci produjeron árboles que contenían ataduras.

Nodo	Número de Loci que soportan el nodo	% loci totales soportando el nodo	% de loci utilizados para soportar el nodo
1	1	1.72%	1.79%
2	1	1.72%	1.79%
3	5	8.62%	12.50%
4	3	5.17%	5.36%
5	2	3.45%	5.36%
6	39	67.24%	69.64%
7	41	70.69%	73.21%
8	56	96.55%	100.00%

PRUEBAS EXACTAS DE DIFERENCIACION ENTRE POBLACIONES Y ENTRE LOCALIDADES MUESTREADAS.

Se observaron diferencias significativas en las frecuencias alélicas calculas mediante la prueba exacta de diferenciación (Raymond y Rousset, 1995), para la localidad tipo (SI'97) con respecto a las localidades de la misma cuenca, como también entre cuencas. Por otro lado si se excluye a SI'97 no se encontraron diferencias significativas entre poblaciones ó localidades.

Tabla 17. Matriz de probabilidades combinadas para la diferenciación de las poblaciones de las CSI y CLP.

Población	Población			
	San Ignacio 2003 (CSI'03)	La Purísima 2003 (CLP'03)	La Purísima 2004 (CLP'04)	San Ignacio 1997 (SI'97)
San Ignacio 2003 (CSI'03)	*****			
La Purísima 2003 (CLP'03)	0.960	*****		
La Purísima 2004 (CLP'04)	0.046	0.566	*****	
San Ignacio 1997 (SI'97)	0.000	0.000	0.000	*****

Tabla 18. Matriz de probabilidades combinadas para la diferenciación de las localidades de las cuencas RSI y RLP.

Localidad	LOCALIDAD								
	SS'03	L. C. 2003	P.L. 2003	L.P. 2003	O.A. 2003	L.P. 2004	P.C. 2004	O.A. 2004	S.I.97
1. S.S. 2003	*****								
2. L.C. 2003	1.000	*****							
3. P.L. 2003	1.000	1.000	*****						
4. L.P. 2003	0.990	1.000	0.985	*****					
5. O.A. 2003	0.950	0.997	0.991	1.000	*****				
6. L.P. 2004	1.000	1.000	0.995	1.000	1.000	*****			
7. P.C. 2004	0.998	1.000	0.935	1.000	0.999	1.000	*****		
8. O.A. 2004	0.522	0.951	0.820	1.000	0.518	1.000	1.000	*****	
9. S.I.1997	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	*****

FRAGMENTOS DIAGNÓSTICOS

Tres fragmentos denominados OPC14-L33, OPC14-L34, OPC19-L01 permitieron diferenciar a las localidades de ambas cuencas, CSI y CLP (Tabla 15, Figura 12 y 13). El fragmento OPC14-L33 sólo fue observado en todas las localidades de CLP en los dos años consecutivos de muestreo (CLP'03 y CLP'04). El marcador OPC14-35 generalmente fue observado en mayor proporción en CLP, con frecuencias observadas de 1.0 (LP'03), 0.714 (LP'04), 0.72 (PC'04), 1.0 (OA'04), con excepción de 0.09 (OA'03). Las frecuencias observadas en el marcador OPC14-34 para la CSI variaron de 0.142 (SS'03 y PL'03) a 0.562 (LC'03).

Se observaron cambios en la frecuencia del marcador OPC14-34 para la localidades de OA'03 (0.09) y OA'04 (1.0) (Figura 7b). Por último, el fragmento OPC19-L01 fue consistente en los dos años de muestreo (2003 y 2004) para todos los individuos de CLP; este mismo fragmento apareció con una frecuencia menor a 0.6 en los individuos de CSI'03 y fue ausente en la población de SI'97.

Tabla 19. Frecuencias observadas de los fragmentos que permitieron diferenciar las localidades muestreadas de las cuencas Río San Ignacio y Río La Purísima. En negritas y

subrayadas se observan cambios en las frecuencias del marcador OPC14-L34 para la localidad de Ojo de Agua en sus dos años de muestreo 2003 y 2004.

	OPC14-L33	OPC14-L34	OPC19-L01
SS'03	0	0.142	0.280
LC'03	0	0.562	0.466
PL'03	0	0.142	0.357
EP'03	1	1	1
OA'03	1	<u>0.090</u>	1
EP'04	1	0.714	1
PC'04	1	0.720	1
OA'04	1	<u>1</u>	1
SI'97	0	0	0

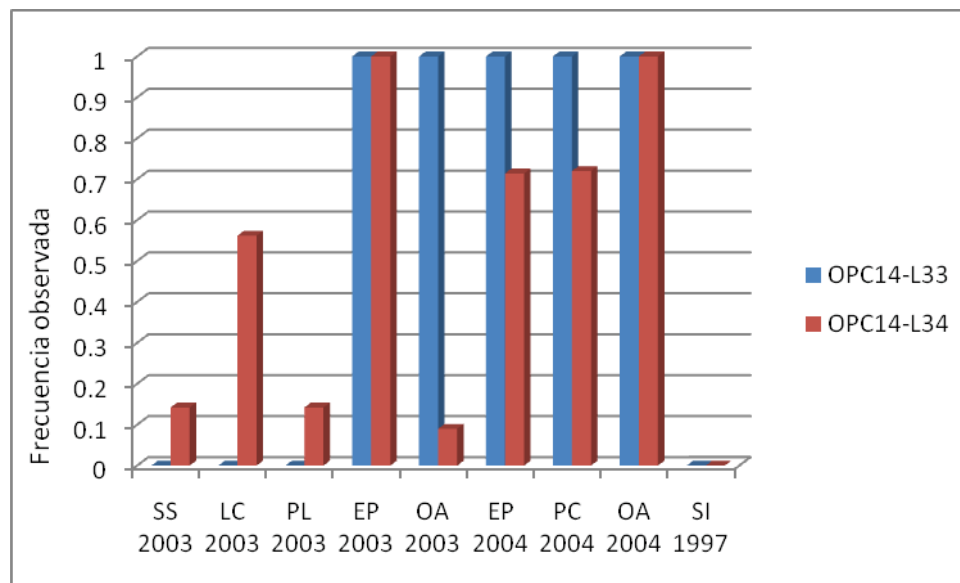


Figura 14. Frecuencias observadas para los fragmentos OPC14-L33 y OPC13-L34 en las localidades de cada cuenca muestreada.

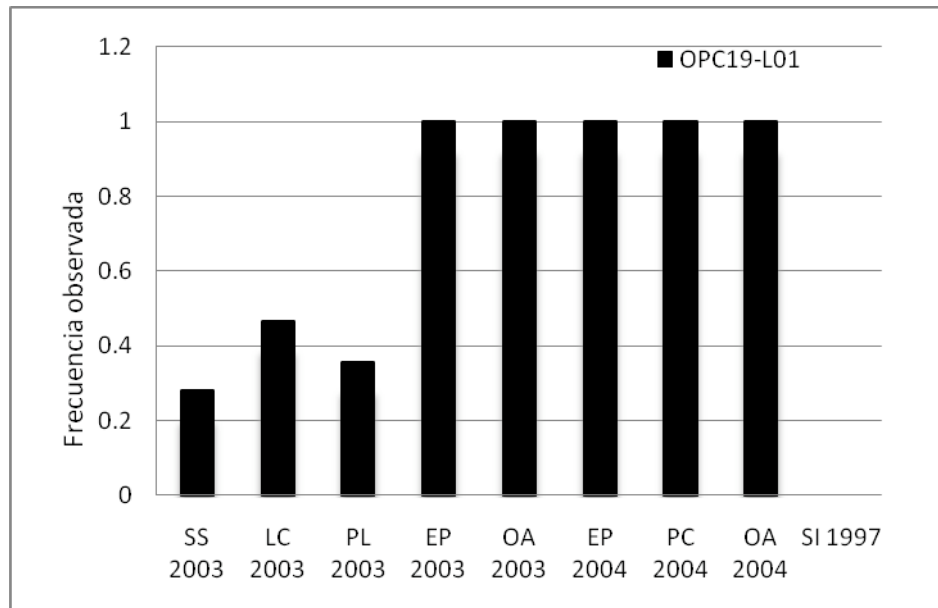


Figura 15. Frecuencias observadas del fragmento OPC19-L01 en todas las localidades de las CSI'03, CLP'03, CLP'04 y SI'97.

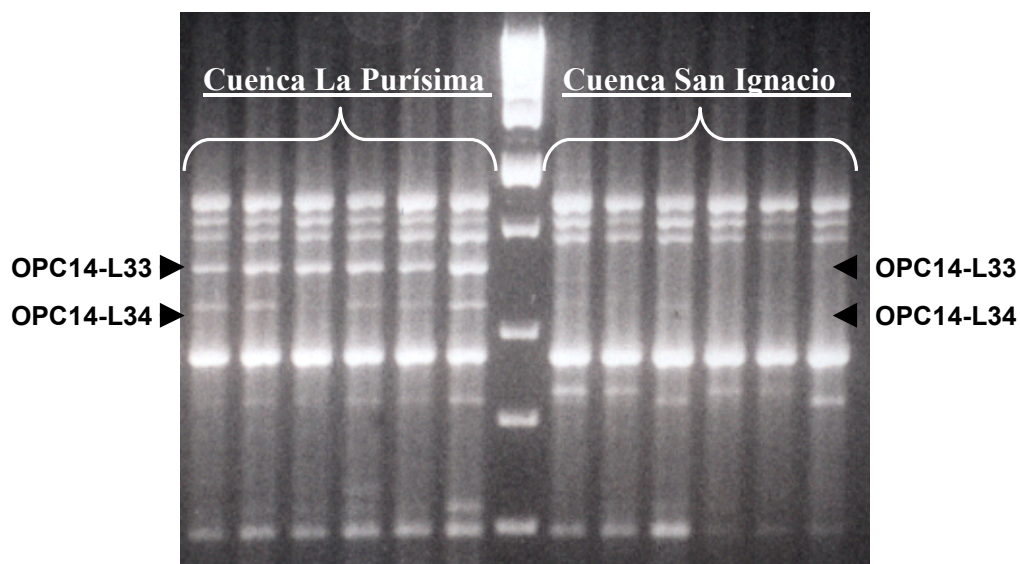


Figura 16. Fragmentos diagnósticos OPC14-L33 y OPC14-L34 (subrayada y con flechas) que permiten diferenciar a las cuencas hidrológicas Río San Ignacio (CSI) y Río La Purísima (CLP).

DISCUSIÓN

Extracción de ADN, PCR y oligonucleótidos.

La cantidad en nanogramos de ADN probadas en este estudio como factor de variación en las reacciones de PCR no generaron diferencias visibles en los productos amplificados (Figura 2).

Las reacciones de amplificación (25 µl): [45 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 36°C y 2 min. a 72°C, con una extensión final de 10 min. a 72°C]; las condiciones de amplificación difieren de las recomendadas por Williams et al (1990) de [35 o 45 ciclos de 1 min. a 94°C, 1 min. a 36°C y 2 min. a 72°C] o los reportados por Yu y Pauls (1992) en ADN genómico de plantas [35 ciclos de 5 s a 94°C, 30 s a 36°C y 60 s a 72°C] y los analizados por Enríquez-Paredes (1999) [5 ciclos de 7s a 94°C, 30s a 33°C, 1.5 min. a 72°C] y [38 ciclos de 7s a 94°C , 30s a 36°C y 1.5 min. a 72°C y una extensión final de 10 min. a 72°C]. En general se consideran temperaturas de alineación similares a 36°C, ésta es una temperatura esperada dado el contenido de G+C promedio del 60% y la longitud para los cebadores empleados. A su vez la cantidad de MgCl₂ empleadas en el intervalo de 1 mM y 4 mM, no presentaron una variación en los ensayos de especificidad y sensibilidad en la amplificación de ADN, tal como ha sido descrito por Blanchard et al. (1993), quienes utilizaron concentraciones menores a 4 mM en sus pruebas y que están dentro de los intervalos empleados en el presente trabajo.

Cuatro nucleótidos de la serie OP-C fueron escogidos amplificando 58 loci en un ámbito promedio de 250 pb a 2.0 kb, lo cual se explica por los tiempos de elongación limitados en los ciclos de reacción de PCR para la amplificación de los fragmentos. Es posible observar en la figura 2 (línea ABC, PQR, STU) que otros oligonucleótidos utilizados amplifican fragmentos con de alto peso molecular, pero el grado de sensibilidad e intensidad es limitada a diferentes concentraciones de ADN.

Niveles de Variación Génica.

En las muestras analizadas de las poblaciones de *Fundulus lima* se observó una reducción en la heterocigosis (H) y en el polimorfismo (%P) para el total de fragmentos analizados en las poblaciones de las cuencas de Río San Ignacio 2003 (CSI'03, H=0.1042, %P=36.2069), Río La Purísima 2003 (CLP'03, H=0.0733, %P=18.9655) y Río La Purísima 2004 (CLP'04, H=0.0939, %P=27.5862), cuando comparadas con la población tipo de San Ignacio muestreada en el año de 1997 (H=0.2082, %P=67.2414); dicho cambio representa reducciones en heterocigosis para las poblaciones mencionadas de 49%, 65% y 54.9%, y en polimorfismo de 46%, 71.8% y 39.65%, respectivamente. Este dramático decremento sugiere una fuerte presión competitiva por parte del cíclido exótico *Tilapia cf. zillii* durante los últimos años, como se demuestran en los reportes de las primeras introducciones en el año 1996, un año previo a los análisis genéticos de ejemplares de *F. lima* en la localidad tipo de San Ignacio, cuando el cíclido exótico exhibía un nivel bajo de abundancia (Ruiz-Campos, 2000; Ruiz-Campos et al., 2006).

En los análisis de las distancia genéticas (Nei, 1978) calculadas por población, muestran la misma tendencia de agrupación para los loci, un nodo separa a la localidad tipo San Ignacio 1997 ($D=0.5904$) del resto de las poblaciones estudiadas. En el grupo conformado por las poblaciones Cuenca Río San Ignacio 2003-Cuenca Río La Purísima 2003-Cuenca Río La Purísima 2004, se atan a una distancia menor ($D=0.0655$) soportada por bootstrap (1.0). Asimismo, es posible observar otro nodo que reúne a las poblaciones de Río San Ignacio 2003 y Río La Purísima 2004 a una distancia de 0.0567, pero la proporción de replicas es baja (0.493); dicha clasificación es soportada por el 5.17% de loci totales.

A nivel de poblaciones las distancias genéticas calculadas con base en Nei (1978), evidencian una clara reducción de las distancias compartidas entre las poblaciones muestreas en los años 2003-2004 de ambas cuencas y logra separar en un orden de 9.44 veces en promedio a la población tipo SI'97 ($D=0.5904$), evidenciando el margen de diferenciación genética en este corto período y una atribución directa al tiempo post introductorio de *T. cf. zillii*.

La misma divergencia genética es observada en los dendrogramas basados en la distancia genética de Nei pero separadas por localidades. La divergencia genética fue baja ($D=0.078$, Bootstrap=0.2160, %loci=3.45) entre las localidades de CLP'03 y las localidades de CSI'03. Por otra parte hubo una divergencia genética significativamente alta ($D=0.6295$, Bootstrap=1, %loci=96.55) de la localidad tipo SI'97 del resto de las localidades. En este mismo dendrograma se aprecia un nodo que divide a la CSI'03 en dos grupos: uno que comprende a las localidades de Los Corralitos 2003 y Poza Larga 2003, y el otro a San Sabas 2003, la diferencia atribuible a 1 locus observado y a una

baja divergencia genética para el primer y el segundo grupo (0.0079 y 0.0584, respectivamente). Esto nos indica en otros términos que las poblaciones analizadas en los años 2003-2004 exhibieron una baja divergencia genética basada en las estimaciones de Nei, o dicho de otra forma fueron idénticas para todos los loci empleados en el estudio. Sin embargo estas mismas poblaciones difieren significativamente de la población tipo de SI'97 debido a la proporción de replicas idénticas generadas por reemplazo ($P=1.0$). Igualmente las pruebas exactas confirman una heterogeneidad en las frecuencias alélicas entre las poblaciones de la localidad tipo con las poblaciones y localidades más recientemente muestreadas ($p<0.001$).

Aunque en este trabajo se demuestra los efectos de pérdida de la variabilidad genética en las poblaciones de *Fundulus lima* por la interacción competitiva del cíclido exótico *Tilapia* cf. *zillii*, es recomendable continuar con estudios comparativos más detallados en tiempo y espacio.

Fragmentos diagnósticos específicos en poblaciones de *F. lima* y su consideración como Metapoblaciones.

Se pudo observar tres fragmentos diagnósticos que diferenciaron a las poblaciones de *F. lima* entre la Cuenca Río San Ignacio y la Cuenca Río La Purísima. El fragmento amplificado OPC19-L01 se encontró 100% presente en la Cuenca La Purísima a diferencia de la Cuenca San Ignacio 2003, en esta última registrando frecuencias menores al 50%, y su ausencia en la localidad tipo San Ignacio 1997. Por su parte, el fragmento OPC14-L33 permitió diferenciar completamente a las poblaciones entre ambas cuencas,

presentándose solamente en todos los individuos analizados de la Cuenca Río La Purísima para ambos años (2003 y 2004). Con el fragmento OPC14-L34 ocurrió lo siguiente: a) una proporción menor a 0.56 del fragmento en las poblaciones de la Cuenca del Río San Ignacio; b) una proporción mayor a 0.72 para las poblaciones de la Cuenca Río La Purísima, excepto la localidad Ojo de Agua 2003 que presentó un valor inferior a 0.09 y que sugiere una diferenciación marcada dentro de la misma cuenca; y c) cambios en la frecuencias del marcador OPC14-34 de la localidad Ojo de Agua durante los dos años de muestreos (2003 y 2004), de 0.09 a 1. Este cambio podría estar asociado con eventos de dispersión masiva de los individuos de río abajo a río arriba (de La Purísima a Ojo de Agua), favorecido por el evento de inundación extraordinaria, ocasionada por el Huracán Marty que azotó la región el 23 de septiembre de 2003, comunicando temporalmente a las poblaciones aisladas y generando un efecto de panmixia.

De esto último, se propone un modelo de dinámica poblacional y sugiere elevar al menos a las poblaciones de *Fundulus lima* en cada cuenca (San Ignacio y La Purísima) como Metapoblación, con subdivisión subpoblacional dentro de cada cuenca (Figura 15). Dicho modelo se ajusta al modelo de jerarquización de ríos (Meffe y Vrijenhoek, 1988) donde la estructura poblacional ocurre en peces que habitan en sistemas fluviales con diferentes grados de conectividad y flujo génico, con una conectividad periódica o permanente vía migración, y una probabilidad de flujo génico entre individuos; por tanto, la divergencia es menos extrema si se compara con aquélla de modelos de poblaciones aisladas (Figura 16).

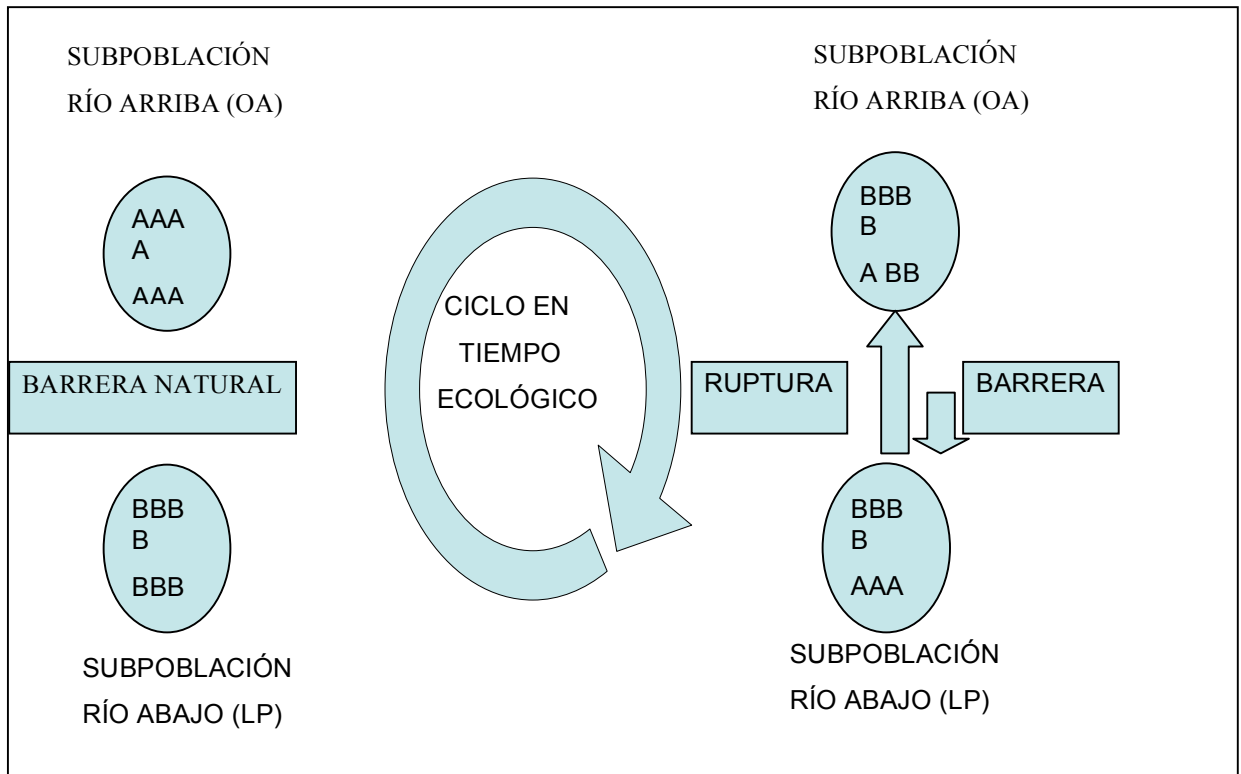


Figura 17. Modelo Metapoblacional propuesto para las poblaciones de *Fundulus lima* de las Cuencas Río San Ignacio y Río La Purísima. Las subpoblaciones se encuentran aisladas espacialmente por una barrera física, permitiendo en tiempos ecológicos diferenciarse genéticamente; la ruptura de esta barrera (comunicación debido a una alta precipitación dentro de las cuencas), permite flujo génico entre subpoblaciones.

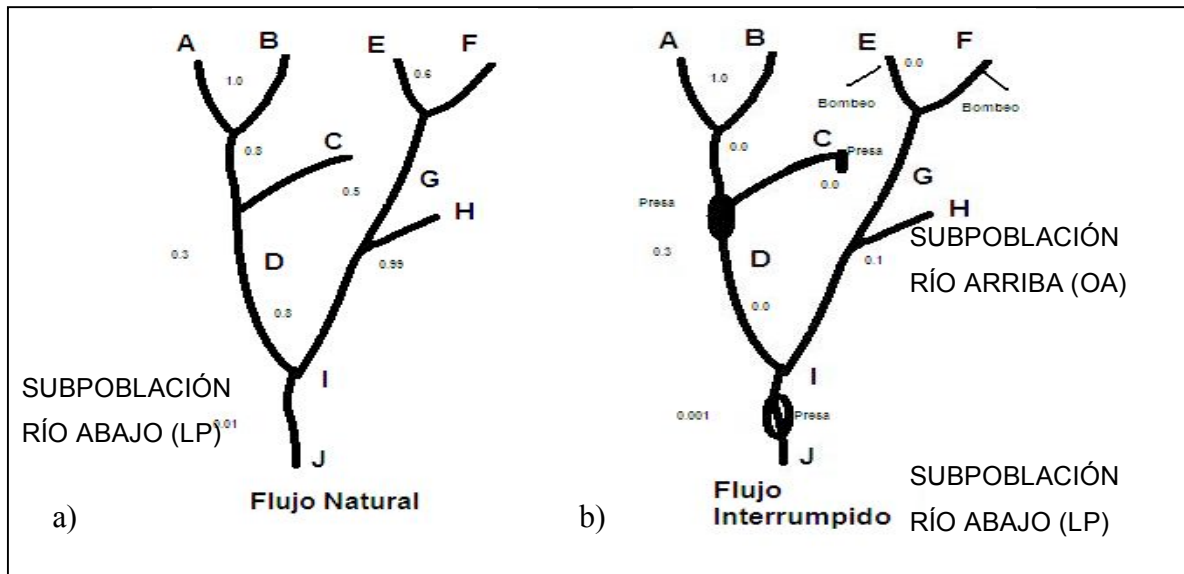


Figura 18. Modelo de jerarquización de ríos. a) Poblaciones naturales son separadas por varias probabilidades de conectividad. Los números se refieren a probabilidades hipotéticas de conexión entre hábitat a largo plazo (tiempo, espacio). b) Disrupción hipotética de las situaciones naturales; en este caso, presas o estaciones de bombeo causan alteraciones severas en hábitat y en el flujo génico.

CONCLUSIONES

1. La diversidad genética de *Fundulus lima* en las cuencas del los ríos San Ignacio y La Purísima, disminuyó en polimorfismo a 71.8% y en heterocigosidad a 65%, en el periodo de 1997 a 2003-2004.
2. Las distancia genética de *Fundulus lima* de 1997 a 2003-2004 disminuyó en un orden promedio de 9.44 veces de 1997 a 2003-2004.
3. La disminución de la variabilidad genética en *F. lima* está asociada a a la introducción e invasión del cíclido exótico *Tilapia* cf. *zillii* en los oasis estudiados
4. Tres fragmentos amplificados por RAPD: OPC14-L33, OPC14-L34 y OPC19-L01 permitieron diferenciar a las poblaciones de *F. lima* de las cuencas de San Ignacio y La Purísima.
5. Los cambios en las frecuencias del marcador OPC14-L34 sugieren que *F. lima* en la Cuenca La Purísima se comporta como una Metapoblación, con eventos de dispersión masiva de individuos hacia río arriba.

Consideraciones finales

Sin duda alguna asociar estos efectos a los procesos invasivos de especies no nativas resulta desconcertante si queremos explicar los efectos genéticamente erosivos para este taxón endémico en las poblaciones muestreadas en los años 2003 y 2004, y es inminente hacer un estudio comparativo más detallado con su contraparte en este caso *T. cf. zilli*. Por ejemplo Kolbe et al (2004) observó en una especie de anuro invasora un incremento de la variación genética que sobrevivió a fondo de botella durante el proceso de invasión, fundada principalmente un eventos independientes de introducción, como tal podría ser el caso para esta especie exótica en los oasis sudcalifornianos, pero a su vez también como en el caso reportado por Tsutsui et al (1999) en que una especie de hormiga argentina (*Linepithema humile*) que debe su éxito invasivo a la disminución de variación genética que traen consigo disminución en agresividad hacia nidos espacialmente separados y a la formación de supercolonias dominantes. No se sabe si estos cambios conductuales ocurren dentro *T. cf. zillii*, pero podrían dar una explicación al éxito de su abundancia y distribución espacial y a su vez la causa del detrimento de la variación genética observada para *F. lima* en el lapso de estos siete años, y a su vez estos estudios mencionados sugerirían una esperanza en la recuperación de este taxón endémico ante esta reducción genética de encontrarse en una zona de amortiguamiento genético capaz de soportar el paso de los años post-invasivos.

Se ha documentado en estudios la variación genética en peces desérticos realizando estudios bioquímicos en la trucha *Oncorhynchus clarki*

basado en el estudio de 46 loci de enzimas (Leary, 1987) de estos resultados las distancias genéticas de Nei reportadas muestran poco o nada de evidencia de divergencia genética, adecuándose los resultados en los ámbitos de divergencia genética observadas entre poblaciones conespecíficas geográficamente continuas, pero no reporta algún hecho biológicamente invasivo observado para ese estudio, dicho lo anterior, *Fundulus lima* presenta tanto poblaciones geográficamente continuas (aunque separadas temporalmente) y poblaciones geográficamente separadas, pero el grado de divergencia genética presentada en las distancias calculadas no sugiere adecuarse a los datos calculados en especies geográficamente continuas al no observarse divergencia genética significativa para las poblaciones muestreadas en el 2003 y 2004, basado en las pruebas por bootstrap y las pruebas exactas. Sin embargo, la presencia de marcadores diagnósticos específicos para poblaciones y localidades, sugiere una reducción temporal de la divergencia genética en las poblaciones actuales que fueron afectadas ecológicamente por procesos invasivos de especies exóticas, cuando las comparamos con la población tipo de San Ignacio de 1997, la cual manifestaba la incidencia de factores biológicos estables.

Varias situaciones se clarifican y que sin duda alguna impactaran en los futuros planes de manejo de conservación que se pretendan implementar para este taxón endémico bajacaliforniano.

Varias preguntas surgen de este estudio:

¿Cómo estará enfrentando su futuro *F. lima* a los procesos invasivos de exóticos en los años próximos a este estudio?

¿Podrán ser implementados planes de conservación efectivos para la recuperación de las poblaciones (reproducción en cautiverio, recolocación a pozas prístinas, eliminación de exóticos) que reviertan los procesos actualmente observados?

Acaso ¿podrá llegar a coexistir y a generar una nueva ruta evolutiva ante estos cambios casi inevitables?

¿Cuánta información genética ha sido perdida y se está perdiendo durante estos eventos y cuál es su valor biológico de adaptabilidad?

¿Estaremos ante un siguiente evento de extinción de esta especie en la faz de la Tierra?

Sin duda alguna los Oasis Californianos brindan una oportunidad para contestar estas y otras preguntas y nos recuerda la fragilidad con la que vivimos en este Planeta, y nuestra responsabilidad ineludible de lo que ocurra en ella ante el suceso de una Séptima Gran Extinción.

BIBLIOGRAFIA

- Alaníz-García, J. 1995. Interacción trófica entre dos especies ícticas, *Fundulus lima* Vaillant y *Xiphophorus helleri* Heckel, en el Oasis de San Ignacio, Baja California Sur, México. M. Sc. Thesis, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Baja California, México. 81 pp.
- Allendorf, F. W., Leary, R. F. 1988. Conservation and Distribution of Genetic Variation in a Polytypic Species, the Cutthroat Trout. *Conservation Biology*. 2:2, 170:184.
- Arnheim, N., White, T., Rainey, W. E. Application of PCR: Organismal and Population Biology. 1990. *Bioscience* 40: 174-182.
- Blanchard MM, Tailon-Miller P, Nowotny P, Nowotny V. (1993) PCR buffer optimization with a uniform temperature regimen to facilitate automation. *PCR Methods Applic.* 2:234-240.
- Camarena-Rosales, F., J. De la Rosa-Vélez, F. Correa-Sandoval & G. Ruiz-Campos. 1999. Estudio de la variabilidad genética de *Fundulus lima* y sus relaciones filogeográficas con otros fundúlidos (Pisces: Fundulidae) de la península de Baja California, México. Final Technical Report L013, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México. 42 pp.
- Dinesh, K. R., Lim T. M., Chua K. L., Chan W. K., & Phang V.P.E. 1993. RAPD analysis: An Efficient Method of DNA Fingerprinting In Fishes. *Zoological Science* 10: 849-854.
- Enríquez-Paredes, L. M. 1999. Estructura genética de las agregaciones de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en el Golfo de California, México. Tesis (Maestría). Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas, Ensenada.
- Espinosa Pérez, H. & J. L. Castro-Aguirre. 1996. A new freshwater clingfish (Pisces: Gobiesocidae) from Baja California Sur, México. *Bull. South. Calif. Acad. Sci.*

95: 120-126.

Follet, W. I. 1996. The freshwater fishes: their origins and affinities. Symposium on biogeography of Baja California and adjacent areas. Syst. Zool. 9: 212-232.

Hadrys H. ; B.M. Schierwater, B. 1992. Molecular Ecology. 1:55-63.

Hartl, Daniel L. 1988. A Primer of Population Genetics. Second Ed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland Massachusetts. pp. 305.

Isabel N. J.; Beaulieu, P.; Th  reault & J. Bousquets, 1999. Direct evidence for biased gene diversity estimates from dominant random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints. Molecular Ecology. 8: 477-483.

Kolbe, J. J. Glor, R. E., Rodriguez, L. Chamizo, A., Larson, A., Losos, J. B. 2004. Genetic variation increases during biological invasión by a Cuban lizard. Nature. 431, 177-181.

Leary, R. F., Allendorf, F.W., Phelps, S. R., Knudsen K. I. 1987. Genetic divergence among seven subspecies of cutthroat trout and rainbow trout. Transactions of the American Fisheries Society. 116:580-587.

Lynch M., B. G. Milligan. 1994. Analysis of population structure with RAPD markers. Molecular Ecology. 3, 91-99.

Meffe, G. K., Vrijenhoek, R. C. 1998. Conservation Genetics in the Management of Desert Fishes. Conservation Biology. 2:2, 157,169.

Myers, G.S. 1930. The Killifish of San Ignacio and the stikleback of San Ramon, lower California. Proc. Calif. Acad. Sci., Ser. 4, 19: 95-104.

Parenti; L.R.1981. A Phylogenetic and biogeographic analysis of ciprinodontiform fishes (Teleostei:Atherinomorpha). Bull.Amer.Mus.Nat.Hist. 168:341-557,

Robouam C.; A.M. Comes; V. Bretagnolle; J. F. Humbert; G. Periquets y Y. Bigots. 1999. Features of DNA fragments obtained by random amplified polymorphic

- DNA (RAPD) assays. *Molecular Ecology*. 8, 493-503.
- Ruiz-Campos, G. y S. Contreras-Balderas. 1987. Ecological and zoogeographical checklist of the continental fishes of the Baja California Peninsula. *Proceedings of the Desert Fishes Council*, 17:61-69.
- Ruiz-Campos, G. 2000. Threatened fishes of the world: *Fundulus lima* Vaillant, 1894. *Environmental Biology of Fishes* 59:20 Pages.
- Ruiz-Campos, G., J. L. Castro-Aguirre. S. Contreras-Balderas, M.L Lozano-Vilano, A.F. González, y S. Sánchez-González. 2002. An annotated distribution checklist of the freshwater fishes from Baja California Sur, México. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 12:143–155.
- SEMARNAT (Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales) (2002). NORMA Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección Ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestre. Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio- Lista de especies en riesgo. *Diario Oficial de la Federación*, Miércoles 6 de Marzo de 2002. Segunda Sección, 81 pp.
- Tsutsui, N. D., Suarez, Andrew V., Holway, D. A., Case, T. 2000. Reduced genetic variation and success of an invasive species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 197:11, 5948-5953.
- Vucetich, J.A.; Waite, T. A. 1998. Erosion of Heterozygosity in Fluctuating Populations. *Conservation Biology*. 13: 4, 860-868.
- Weir, B. S. 1996. *Genetic Data Analysis*. Sinauer Associates, Inc. Second Edition. 449 páginas.
- Williams J.G.K.; A.R. Kubelik; K. J. Livak; J. A. Rafalski; S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research*. 18, 6531-6535.

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
<i>Generalidades de la Especie</i>	<i>3</i>
ANTECEDENTES	6
<i>Área Geográfica de Estudio</i>	<i>7</i>
HIPÓTESIS	12
OBJETIVO	12
MATERIALES Y MÉTODOS	13
<i>Muestreo</i>	<i>13</i>
<i>Captura de Organismos</i>	<i>15</i>
<i>Preservación y aislamiento de ADN total</i>	<i>15</i>
<i>Cebadores Oligonucleótidos:</i>	<i>17</i>
<i>Amplificación de ADN</i>	<i>18</i>
<i>CONDICIONES DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)</i>	<i>18</i>
<i>Captura de los datos.</i>	<i>19</i>
<i>Análisis de Datos</i>	<i>20</i>
<i>Estadística Descriptiva</i>	<i>20</i>
<i>Estadístico-F</i>	<i>21</i>
<i>Medidas Genéticas</i>	<i>22</i>
<i>Agrupamiento de Unión Promedio (UPGMA)</i>	<i>22</i>
RESULTADOS.	24
<i>Extracción de ADN de Fundulus lima</i>	<i>24</i>
<i>Condiciones fisicoquímicas de PCR y elección de oligonucleótidos</i>	<i>25</i>

<i>Amplificación de ADN al azar y recolección de datos de los organismos muestreados...</i>	26
<i>ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS</i>	28
Heterocigocidad (H) y Polimorfismo (%P).....	28
Poblaciones de las Cuencas Río San Ignacio y Río La Purísima.....	28
Localidades muestreadas en las Cuencas Río San Ignacio y Río La Purísima.....	29
DISTANCIAS GENÉTICAS	31
Poblaciones de las cuencas Río San Ignacio y Río La Purísima.....	31
Localidades muestreadas en las cuencas Río San Ignacio y Río La Purísima	32
AGRUPAMIENTOS (UPGMA) BASADOS EN LAS DISTANCIAS GENÉTICAS	
INSEGADAS DE NEI (1978).....	34
Poblaciones de las cuencas hidrológicas Río San Ignacio y Río La Purísima.....	34
Agrupamiento de las localidades de las cuencas hidrológicas Río San Ignacio y Río La Purísima.....	36
FRAGMENTOS DIAGNÓSTICOS	41
DISCUSIÓN	44
<i>Extracción de ADN, PCR y oligonucleótidos.</i>	44
<i>Niveles de Variación Génica.</i>	45
<i>Fragmentos diagnósticos específicos en poblaciones de F. lima y su consideración como Metapoblaciones.</i>	47
Consideraciones finales	52
BIBLIOGRAFIA	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Pez endémico *Fundulus lima* Vaillant 1894. Fotografía por G. Ruiz-Campos. 2

Figura 2. Ubicación geográfica de las dos cuencas prioritarias objeto de este estudio, Cuenca del Río La Purísima y Cuenca del Río San Ignacio. El área sombreada corresponde a la distribución actual del pez *Fundulus lima*. 8

Figura 3. Sitios de muestreo en el área de estudio. Cuenca San Ignacio: San Ignacio, Poza Larga, Los Corralitos, y San Sabas. Cuenca La Purísima: Ojo de Agua, Presa Carambuche, Carambuche, y La Purísima (El Pílon). 8

Figura 4. Imagen satelital del Huracán “Marty” (a) del 22 de septiembre de 2003 cuando alcanzó la etapa de huracán, y (b) la mejor ruta trazada de su desplazamiento del 18 al 24 de septiembre. 11

Figura 5. Area de estudio con las localidades muestreadas tanto para la Cuenca deL Río San Ignacio –RSI- (a) y la Cuenca del Río La Purísima – RLP- (b). SS= San Sabas; CC= Los Corralitos; PL=Poza larga. LP= La Purísima; PC= Presa Carambuche; OA= Ojo de Agua. 14

Figura 6. Fotografía del producto de una electroforesis en agarosa, iluminada con luz UV, con muestras de ADN extraídas de aletas de organismos congelados o fijados en etanol absoluto del pez *Fundulus lima*. Carril 1: Marcador de ADN de 500 bp. Carriles 2-6: ejemplos de ADN extraídos. 25

Figura 7. Reproducibilidad y consistencia de bandas ante un gradiente de concentración de ADN entre las muestras analizadas y los cebadores empleados. En (a), las líneas A-C, D-F, G-I, J-L, M-O, P-R y S-U se presentan diferentes concentraciones (60ng, 30 ng, 6ng) de ADN molde en un volumen de reacción de 25 µl, para los cebadores OPC-10, OPC-09, OPC-08, OPC-06, OPC-04, OPC-02 y OPC-01 respectivamente. En (b), la variación en los productos de amplificación de cebador OPC-08 con el mismo gradiente de concentración empleado como en (a), las líneas 1-3, representa un organismo de la localidad Los Corralitos, 4-6; de La Purísima, 7-9 de Poza Larga, y 10-12, de Ojo de Agua. El carril sin número corresponde al marcador molecular estándar de 250 pb. 26

Figura 8. Amplificaciones por PCR del oligonucleótido OPC-19 cargados en geles de agarosa al 1.4% y teñidos con bromuro de etidio. 27

Figura 9. Amplificaciones por PCR del oligonucleótido OPC-14 cargados en geles de agarosa al 1.4% y teñidos con bromuro de etidio. La fotografía del lado derecho evidencia un efecto de electróforesis que no afectó el análisis de resultados. 27

Figura 10. Amplificaciones por PCR del oligonucleótido OPC-01 cargados en geles de agarosa al 1.4% y teñidos con bromuro de etidio. 27

Figura 11. Amplificaciones por PCR del oligonucleótido OPC-08 cargados en geles de agarosa al 1.4% y teñidos con bromuro de etidio. 28

Figura 12. Agrupamiento (UPGMA) de las poblaciones de las cuencas Río San Ignacio y Río La Purísima usando distancia insesgada de Nei (1978). 34

Figura 14. Frecuencias observadas para los fragmentos OPC14-L33 y OPC13-L34 en las localidades de cada cuenca muestreada. 42

Figura 15. Frecuencias observadas del fragmento OPC19-L01 en todas las localidades de las CSI'03, CLP'03, CLP'04 y SI'97. 43

Figura 17. Modelo Metapoblacional propuesto para las poblaciones de *Fundulus lima* de las Cuencas Río San Ignacio y Río La Purísima. Las subpoblaciones se encuentran aisladas espacialmente por una barrera física, permitiendo en tiempos ecológicos diferenciarse genéticamente; la ruptura de esta barrera (comunicación debido a una alta precipitación dentro de las cuencas), permite flujo génico entre subpoblaciones. 49

Figura 18. Modelo de jerarquización de ríos. a) Poblaciones naturales son separadas por varias probabilidades de conectividad. Los números se refieren a probabilidades hipotéticas de conexión entre hábitat a largo plazo (tiempo, espacio). b) Disrupción hipotética de las situaciones naturales; en este caso, presas o estaciones de bombeo causan alteraciones severas en hábitat y en el flujo génico. 50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Localidades y fechas de muestreo en ambas cuencas prioritarias de B.C.S. (*) indican las fechas en que fueron recolectadas las muestras analizadas durante el estudio, en los años 1997, 2003 y 2004. 14**

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleotidos iniciadores probados, obtenidos del paquete comercial Operon C.. 17

Tabla 3. Representación de la matriz de datos generada para los individuos muestreados. Simbología: 1= presencia de bandas, 2= ausencia. 19

Tabla 4. Simbología utilizada en la designación de localidades. 20

Tabla 5. Localidades y número de muestras 24

Tabla 6. Lista de oligonucleótidos de la serie Operon-C seleccionados en el presente trabajo. 25

Tabla 7. Estimaciones de Heterocigosidad y porcentaje de Loci Polimórficos en las poblaciones analizadas de las dos cuencas hidrológicas Río San Ignacio y Río La Purísima. Entre paréntesis se encuentra los porcentajes de reduccion en Heterocigocidad promedio y % loci polimorficos en comparación a los valores obtenidos para San Ignacio'97 (subrayados y en negritas). 29

Tabla 8. Estimaciones de Heterocigosidad y porcentaje de Loci Polimórficos en las 9 localidades analizadas de las dos cuencas hidrológicas Río San Ignacio y Río La Purísima. Entre paréntesis se

encuentra los porcentajes de reduccion en Heterocigocidad promedio y % loci polimorficos en comparación a los valores obtenidos para San Ignacio'97 (subrayados y en negritas). 30

Tabla 9. Distancia Insegada de Nei (1978), de las poblaciones de las cuencas Río San Ignacio y Río La Purísima. 31

Tabla 10. Distancia Insegada de Nei (1978), de las localidades de las cuencas Río San Ignacio y Río La Purísima. Un primer bloque en amarillo muestran las comparaciones de distancia genética entre las localidades de S.S.'03, L.C.'03, P.L.'03 de la cuenca RSI. En azul un segundo bloque es identificado comparando las distancias genéticas entre las localidades de L.P.'03, O.A.'03, L.P.'04, P.C.'04, O.A.'04, pertenecientes a la cuencas RLP; en gris, un tercer bloque comparando distancias genéticas entre localidades de ambas cuencas, RSI y RLP. Un ultimo bloque en naranja compara las distancias genéticas calculadas de la localidad S.I.'97 con el resto de las localidades de las dos cuencas RSI y RLP y donde se pudo observar un aumento de la distancia genética respecto al resto de los bloques. 33

Tabla 11. Definiciones, distancias genéticas por UPGMA de las poblaciones agrupadas por cada nodo. 35

Tabla 12. Resultados del análisis por "bootstrap" (con 1000 permutaciones) para las poblaciones de las Cuencas CSI y CLP. 35

Tabla 13. Índice de consistencia para cada nodo generado por UPGMA, para las poblaciones de las cuencas RSI y RLP. 46 loci produjeron árboles que contenían ataduras. 35

Tabla 14. Definiciones y distancias genéticas por UPGMA de las poblaciones agrupadas por cada nodo. 37

Tabla 15. Resultados del análisis por “bootstrap” (1000 permutaciones) para las localidades muestreadas en las Cuencas RSI y RLP. 38

Tabla 16. Índice de consistencia para cada nodo generado por UPGMA, para las localidades de las cuencas RSI y RLP. 56 loci produjeron arboles que contenían ataduras. 38

Tabla 17. Matriz de probabilidades combinadas para la diferenciación de las poblaciones de las cuencas RSI y RLP. 35

Tabla 18. Matriz de probabilidades combinadas para la diferenciación de las localidades de las cuencas RSI y RLP. 36

Tabla 19. Frecuencias observadas de los fragmentos que permitieron diferenciar las localidades muestreadas de las cuencas Río San Ignacio y Río La Purísima. En negritas y subrayadas se observan cambios en las frecuencias del marcador OPC14-L34 para la localidad de Ojo de Agua en sus dos años de muestreo 2003 y 2004. 41

AGRADECIMIENTOS

Gracias por el apoyo otorgado al desarrollo de este trabajo.

SEMARNAT-CONACyT 173/A-1

UABC-DGIP 1275

Permiso de Recolecta SGPA/DGVS-6559

A todos los amigos de la carrera y a los profesores Dr. Faustino Camarena Rosales y Dr. Gorgonio Ruiz Campos por aguantar y por su amabilidad y por permitirme trabajar en lo que ha sido mi preocupación desde niño.

A todos los profesores.

A la family.