



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS

CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

**EXTRACCIÓN DE ADN EN LARVAS DE *Engraulis mordax* PRESERVADAS EN
FORMALINA Y ESTIMACIÓN DE DIVERSIDAD GENÉTICA EN EL GOLFO DE
CALIFORNIA.**

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

BIOL. MAR. NOÉ DÍAZ VILORIA

La Paz, Baja California Sur, México

Octubre del 2003



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION**

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 29 del mes Octubre del año 2003, el (la) que suscribe NOE DIAZ VILORIA alumno(a) del Programa de MAESTRIA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS con número de registro A010125 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de: DR. RICARDO PÉREZ ENRÍQUEZ y cede los derechos del trabajo titulado: **“EXTRACCIÓN DE ADN EN LARVAS DE *Engraulis mordax* PRESERVADAS EN FORMALINA Y ESTIMACIÓN DE DIVERSIDAD GENÉTICA EN EL GOLFO DE CALIFORNIA”** al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: ndvilaria@hotmail.com

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


NOÉ DIAZ VILORIA
nombre y firma



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION
ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 11:00 horas del día 9 del mes de Octubre del 2003 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis de grado titulada:

**“EXTRACCIÓN DE ADN EN LARVAS DE *Engraulis mordax* PRESERVADAS
EN FORMALINA Y ESTIMACIÓN DE DIVERSIDAD GENÉTICA EN EL GOLFO DE CALIFORNIA”**

Presentada por el alumno:

DIAZ Apellido paterno	VILORIA materno	NOÉ nombre(s)							
		Con registro: <table border="1"><tr><td>A</td><td>0</td><td>1</td><td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>5</td></tr></table>	A	0	1	0	1	2	5
A	0	1	0	1	2	5			

Aspirante al grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Director de tesis
PRIMER VOCAL

DR. RICARDO PÉREZ ENRIQUEZ

PRESIDENTE

DRA. SILVIE DUMAS

SECRETARIO

DR. RUBÉN RODRÍGUEZ SÁNCHEZ

SEGUNDO VOCAL

DRA. TANIA SÁNCHEZ VELASCO
CO-DIRECTOR DE TESIS

TERCER VOCAL

MC. PEDRO CRUZ HERNÁNDEZ

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

DR. FRANCISCO ARREGUÍN SÁNCHEZ

ÍNDICE GENERAL

LISTA DE TABLAS.....	3
LISTA DE FIGURAS.....	4
RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	7
1. INTRODUCCIÓN.....	8
2. ANTECEDENTES.....	11
3. JUSTIFICACIÓN.....	14
4. OBJETIVOS.....	16
5. ÁREA DE ESTUDIO.....	17
6. METODOLOGÍA.....	19
6.1 Obtención de muestras.....	19
6.2 Extracción de ADN.....	20
6.3 Evaluación de concentración y calidad de ADN extraído.....	26
6.4 Amplificación (PCR).....	27
6.5 Secuencias.....	30
6.6 Análisis con enzimas de restricción (RFLP).....	31
6.7 Estimadores de diversidad genética.....	32
7. RESULTADOS.....	35
7.1 Extracción de ADN de larvas de <i>Engraulis mordax</i>	35
7.2 Amplificación de ADN extraído de larvas.....	37
7.3 Secuencia.....	39
7.4 Extracción de ADN de adultos de <i>Engraulis mordax</i>	40
7.5 Amplificación de ADN extraído de adultos.....	40
7.6 Secuencias.....	42
7.7 Análisis de RFLP de la región control II en adultos.....	43
7.8 Estimadores de diversidad genética.....	46
8. DISCUSIÓN.....	47
8.1 Extracción de ADN de larvas de <i>E. mordax</i>	48
8.2 Amplificación de ADN extraído de larvas.....	51
8.3 Extracción de ADN de adultos de <i>E. mordax</i>	54

8.4 Amplificación de ADN de adultos de <i>E. mordax</i>	54
8.5 Secuencias.....	55
8.6 Diversidad genética.....	55
9. CONCLUSIONES.....	61
10. RECOMENDACIONES.....	63
LITERATURA CITADA.....	64
APÉNDICE I.....	70
APÉNDICE II.....	71
GLOSARIO.....	75

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Mezcla de reacción para la amplificación.....	28
Tabla 2.	Secuencias de los iniciadores empleados, temperatura a la cual se alinean y artículo de procedencia.....	29
Tabla 3.	Mezcla de reacción empleada para las enzimas: <i>Alu I</i> , <i>EcoR I</i> , <i>Fok I</i> , <i>Taq I</i> y <i>Sau 96I</i>	31
Tabla 4.	Mezcla de reacción empleada para las enzimas: <i>Xba I</i> y <i>Xmn I</i> ...	32
Tabla 5.	Técnicas de extracción de ADN probadas en larvas de <i>E. mordax</i> preservadas en formalina.....	35
Tabla 6.	Resultados de la amplificación de ADN extraído de larvas de <i>E. mordax</i> preservadas en formalina y un control (adulto preservado en etanol).....	38
Tabla 7.	Secuencia de nucleótidos de la fracción desconocida amplificada con los iniciadores propuestos para la fracción 16s ARNr.....	40
Tabla 8.	Secuencias de las fracciones de ADN mitocondrial: 16s ARNr y región control II, amplificadas en adultos de <i>E. mordax</i>	42
Tabla 9.	Haplotipos obtenidos a partir de la digestión de la región control II (551 pb) de <i>Engraulis mordax</i> con siete enzimas. Las letras A y B representan un haplotipo o patrón de corte para cada enzima. Las cantidades representan el tamaño (en pares de bases) de los fragmentos generados por los cortes.....	45
Tabla 10.	Frecuencia de haplotipos compuestos de la región control II obtenidos con siete enzimas de restricción (letras mayúsculas), en el siguiente orden: <i>Alu I</i> , <i>EcoR I</i> , <i>Fok I</i> , <i>Sau 96I</i> , <i>Taq I</i> , <i>Xba I</i> y <i>Xmn</i>	45

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Mapa del área de estudio en donde se pueden apreciar las estaciones de muestreo de larvas de *E. mordax* (2,7,8,9,11,13,15,17,18 y 21), así como la estación de muestreo de adultos (1)..... 20
- Figura 2. Diagrama de flujo de las diez técnicas probadas. En este diagrama se pueden apreciar las similitudes y diferencias entre los métodos de extracción..... 21 y 22
- Figura 3. Extracción de ADN de larvas de *E. mordax*, a través de diferentes técnicas propuestas para tejidos fijados en formalina. En el gel cada técnica comprende dos pozos que corresponden a la extracción de una larva (izquierdo) y cuatro larvas en conjunto (derecho)..... 36
- Figura 4. Extracción de ADN de larvas de *E. mordax*, a través de diferentes técnicas propuestas para tejidos fijados en formalina. En el gel cada técnica comprende dos pozos que corresponden a la extracción de una larva (izquierdo) y cuatro larvas en conjunto (derecho)..... 36
- Figura 5. Extracción de ADN de larvas de *E. mordax*, mediante la técnica de hidratación (Camarena-Rosales), realizada a temperatura ambiente..... 37
- Figura 6. Amplificación de ADN de larvas de *E. mordax* extraído con diferentes técnicas. Los iniciadores probados amplifican las fracciones 12s ARNr (A) y región control III (B) en muestras controles ó ADN extraído de adultos (último pozo a la derecha)..... 38

Figura 7.	Amplificación de ADN extraído de larvas de <i>E. mordax</i> con la técnica de hidratación (Camarena-Rosales) realizada a temperatura ambiente (A) y a 4 °C (B). Estos resultados se obtuvieron con los iniciadores de la fracción 16s ARNr. Los dos últimos pozos (de izquierda a derecha), corresponden a un control y a un marcador de tamaño conocido.....	39
Figura 8.	Extracción de ADN de adultos de <i>E. mordax</i> mediante la técnica de Taggart <i>et al.</i> (1992).....	41
Figura 9.	Amplificaciones de las fracciones: NADH1, 16s ARNr y región control II en adultos de <i>E. mordax</i> . El último pozo, de izquierda a derecha, corresponde a un marcador de tamaño conocido.....	41
Figura 10.	Patrones de corte de la región control II con las enzimas de restricción. Los primeros pozos de izquierda a derecha, corresponden a los productos de PCR digeridos con la enzima, el penúltimo pozo corresponde a un producto no digerido y el último pozo corresponde a un marcador de tamaño conocido.....	44

RESUMEN

La anchoveta norteña *Engraulis mordax*, es un pez pelágico de importancia ecológica y económica en el Pacífico Nororiental. En esta especie surge la necesidad de realizar estudios que contribuyan al conocimiento de su estructura genético-poblacional, debido a que aún existe desconocimiento sobre si la subpoblación de *E. mordax* que habita dentro del Golfo de California es residente y/o es una extensión de la subpoblación sureña de la Costa Occidental de la Península de Baja California. Los avances en el campo de la biología molecular e investigación médica en los últimos 20 años, han abierto la posibilidad de utilizar especímenes preservados en formalina en estudios de genética poblacional. En base a lo anterior los objetivos de este trabajo fueron: determinar qué técnica de extracción de ADN permite la obtención de ADN de calidad de larvas de *E. mordax* preservadas en formalina (4%) y estimar la diversidad genética mediante análisis de RFLP en una muestra de adultos preservados en etanol (70%). Tanto las larvas como los adultos de *E. mordax* provinieron de la región central del Golfo de California. Con las larvas se probaron diez técnicas de extracción de ADN diferentes, obteniéndose resultados solo con cuatro de ellas. Estas extracciones se intentaron amplificar con iniciadores propuestos para distintas fracciones de ADN mitocondrial (NADH1, 16s ARNr, 12s ARNr y región control) de distintos tamaños (entre 176 y 1,930 pb), no obteniéndose resultados satisfactorios. Este ADN no se pudo amplificar debido a que se encuentra muy degradado por efecto de la preservación en formalina por varios años. Las extracciones de ADN de adultos, mediante la técnica de extracción fenol-cloroformo, sirvieron para la amplificación de tres fracciones del ADN mitocondrial (NADH1, 16 s ARNr y región control), para secuenciación de las fracciones 16 s ARNr y región control, y para un análisis de diversidad de haplotipos mediante RFLP de la región control. Para esta última, el ADN de 41 adultos fue amplificado y digerido exitosamente con siete enzimas de restricción (*Alu I*, *EcoR I*, *Fok I*, *Sau 96I*, *Taq I*, *Xba I* y *Xmn I*). Los resultados de este último análisis revelaron una muy baja diversidad genética ($h= 0.1866$), que muy probablemente es producto de un reducido tamaño poblacional efectivo (N_f).

ABSTRACT

The Northern anchovy *Engraulis mordax*, is an ecologically and economically important pelagic fish in the Northwest Pacific. Whether *E. mordax* in the Gulf of California is a resident subpopulation or belongs to the population distributed along the Pacific coast of Baja California, demands studies that contribute to the knowledge about the population genetic structure. The advances in molecular biology and medical research in the last twenty years, open the possibility of using formalin preserved fish samples for population genetics studies. The objectives of this study were to determine a suitable DNA extraction technique of formalin (4%) preserved *E. mordax* larvae, and estimate the genetic diversity of an adult ethanol preserved sample, by means of RFLP analysis. Both larvae and adult samples were obtained from the central region of the Gulf of California. Ten different techniques of DNA extraction in larvae were tested, obtaining results in four. However, the amplification of these extractions for different mtDNA fractions (NADH1, 16s rRNA, 12s rRNA and control region) of different sizes (between 176 and 1,930 bp) were unsuccessful, indicating that the DNA was very degraded by the effect of the formalin preservation method. DNA from adults was positively amplified and sequenced for three mtDNA fractions (NADH1, 16s rRNA and control region). The RFLP analysis of a sample of 41 individuals on the control region was done digesting with seven restriction enzymes (*Alu I*, *EcoR I*, *Fok I*, *Sau 96I*, *Taq I*, *Xba I* y *Xmn I*). Results with the RFLP analysis revealed a very low genetic diversity ($h= 0.1866$), probably due to low population effective size (N_f).

1. INTRODUCCIÓN

La anchoveta norteña *Engraulis mordax* (Girard, 1854) es un pez pelágico de afinidad templada con una amplia distribución en el Pacífico Nororiental. Hasta antes de 1985 su distribución estaba reportada desde la parte Norte de las Islas de Vancouver, Canadá hasta Cabo San Lucas, México (Whitehead *et al.*, 1988). Posterior a este año, a través de los registros de captura comercial (Hammann y Cisneros 1989) y de huevos y larvas (Green-Ruiz y Hinojosa-Corona, 1997; Green-Ruiz y Aguirre-Medina, 1989 en Cotero-Altamirano, 2000), se reportó su presencia masiva en el Golfo de California, extendiéndose su rango de distribución. Hammann y Cisneros (1989) asociaron este hecho a la detección de un evento frío con fuertes anomalías durante 1985 precedido por el evento de El Niño (ENSO) 1982-1983. Sin embargo Holmgren–Urba y Baumgartner (1993), basándose en un estudio de escamas de *E. mordax* en depósitos laminados, infirieron su residencia desde el año 1730 en el Golfo de California detectando cambios en su abundancia asociados a variaciones climáticas. Estos autores también encontraron una asociación inversa entre las abundancias de sardinas y anchovetas a lo largo del tiempo en dicho Golfo.

En esta especie surge la necesidad de realizar estudios que contribuyan al conocimiento de su estructura genético-poblacional, debido a que aún existe desconocimiento sobre si la subpoblación de *E. mordax* que habita dentro del Golfo de California es residente y/o es una extensión de la subpoblación sureña de la Costa Occidental de la Península de Baja California. Una forma de establecer la estructura de la población es mediante la aplicación de marcadores genéticos. El uso más común de los marcadores genéticos en la biología pesquera es determinar si las muestras de una subpoblación son diferenciadas genéticamente de cualquier otra. La detección de diferencia puede implicar que la fuente de grupos comprende stocks diferentes (Carvalho y Hauser, 1994 en Ferguson y Danzmann, 1998) y deben ser tratadas como unidades de manejo separadas (Moritz, 1994 en Ferguson y Danzmann, 1998). El manejo de las subpoblaciones en un nivel específico es basado sobre la idea de que los stocks tienen patrones individuales de reclutamiento y mortalidad, por lo que reaccionan de manera

independiente a la captura y explotación (Carvalho y Hauser, 1994 en Ferguson y Danzmann, 1998). El objetivo común del análisis genético-molecular es el de encontrar diferencias diagnósticas entre presumibles stocks (Ferguson y Danzmann, 1998). Los análisis genéticos además proveen estimaciones de la diversidad genética (Chatigny, 2000). Un paso inicial en la mayoría de los análisis genéticos es la extracción de ADN de un tejido. Una vez extraído, el ADN a menudo es amplificado usando la Reacción en Cadena Polimerasa (PCR) y analizado por una variedad de técnicas moleculares (RAPD, RFLP, Microsatélites, etc.). Las técnicas basadas en el PCR requieren muy pequeñas cantidades de ADN, además no siempre se requiere extraer ADN de tejido fresco (Chatigny, 2000). Aunado a esto, los avances en los últimos 20 años en la biología molecular e investigación médica han hecho posible la extracción, amplificación y secuenciación de ADN de diferentes tipos de tejido, incluyendo fósiles en ámbar, huesos, organismos diminutos, hojas, momias, especímenes secos, folículos capilares, sangre seca, estiércol y especímenes fijados en formalina preservados en etanol (Shiozawa *et al.*, 1992; France y Kocher, 1996; Shedlock *et al.*, 1996; Chase *et al.*, 1998).

Ante estos avances, existe la posibilidad de utilizar larvas de peces preservadas en formalina provenientes de colecciones de cruceros oceanográficos, con la finalidad de dirigir trabajos encaminados a responder preguntas fundamentales como la estructura genética de la población y sus variaciones a lo largo del tiempo (Chase *et al.*, 1998). Esta posibilidad se debe considerar si se toma en cuenta que existen colecciones de varios años en instituciones de todo el mundo, incluyendo nuestra institución el CICIMAR, que realizan investigaciones oceanográficas.

En este estudio se probaron diez técnicas diferentes de extracción de ADN, propuestas en su mayoría para tejidos fijados en formalina, para probar empíricamente si se puede extraer y amplificar ADN de larvas de anchoveta (*E. mordax*) preservadas en formalina. La forma de descartar cualquier artificio de las técnicas empleadas fue comparando los resultados obtenidos en larvas a los obtenidos en una muestra de adultos de la misma especie preservados en etanol (muestra control). Posteriormente con esta última muestra

se hizo una estimación de diversidad genética mediante el análisis de RFLP de la región control del ADN mitocondrial.

2. ANTECEDENTES

Anteriormente ya se ha trabajado con *Engraulis mordax* a nivel poblacional en el Pacífico nororiental; dentro de los primeros trabajos se encuentra el de Vrooman *et al.* (1981), quienes utilizando transferrinas como marcadores genéticos, corroboraron la existencia de tres subpoblaciones propuestas por estudios morfométricos y merísticos (McHugh 1925 y McHugh 1951 en Vrooman *et al.*, 1981). Estas subpoblaciones son: una subpoblación norteña desovante en el río Columbia (Canadá), una subpoblación central en el Sur de California y una subpoblación sureña de Punta Eugenia a Bahía Magdalena, B. C. S. Posteriormente Hedgecock *et al.* (1989), Hedgecock (1994) y Hedgecock *et al.* (1994), quienes utilizando alozimas como marcadores genéticos y estudios morfométricos, revelaron substancial polimorfismo genético y morfométrico en esta especie así como heterogeneidad y carencia de un patrón geográfico (parches caóticos) en las frecuencias alélicas de la subpoblación central que en parte se encuentra en la Bahía del Sur de California.

De manera reciente Díaz–Jaimes *et al.* (1999), analizaron las subpoblaciones central y sureña de *E. mordax* en la costa occidental de la Península de Baja California, mediante electroforesis de hemoglobinas, esterases y parvalbúminas. Estos autores encontraron que las hemoglobinas no presentaron polimorfismo y las esterases no aportaron datos que pudieran ser utilizados como marcadores diferenciales, pero que las proteínas totales de músculo y parvalbúminas mostraron fenotipos exclusivos tanto en la subpoblación central como en la sureña, proponiéndose estas últimas como marcadores genéticos útiles.

Cabe resaltar que no se encontraron estudios genético-poblacionales, para la especie, realizados en el Golfo de California.

Una de las técnicas actuales más utilizada para el estudio de la estructura y diversidad genética de poblaciones de peces es la del análisis de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de ADN mitocondrial. Esta técnica ya ha sido aplicada

en diferentes especies de peces, tales como *Pseudopentaceros wheeleri* (Martin *et al.*, 1992), *Oncorhynchus tshawytscha*, *O. keta* (Cronin *et al.*, 1993), *Salmo salar* (Tessier *et al.*, 1995; King *et al.*, 2000), *Salmo trutta* (Hansen y Loeschke, 1996; Morán *et al.*, 1996; Laikre *et al.*, 2002), *Engraulis encrausicolus* (Bembo *et al.*, 1996) *Pagrus major* (Tabata y Mizuta, 1997), *Thymallus thymallus* (Gross *et al.*, 2001), *Solea vulgaris* (Guarniero *et al.*, 2002) y *Limnothrissa miodon* (Hauser *et al.*, 1998). Dentro de estas especies resalta *E. encrausicolus*, por ser la más relacionada a *E. mordax* (especie del presente estudio) desde el punto de vista filogenético.

El número de trabajos realizados a partir de tejidos fijados en formalina en comparación a los trabajos realizados con tejidos frescos o preservados en etanol, es escaso. Dentro de los trabajos reportados para tejidos fijados en formalina (biopsias, especímenes de colecciones y museos) se encuentran los de Heller *et al.* (1992), Malmgren *et al.* (1992), Shiozawa *et al.* (1992), France y Kocher (1996), Shedlock *et al.* (1996), Wirgin *et al.* (1997), Chase *et al.* (1998), Coombs *et al.* (1999), Chatigny (2000) y Ren *et al.* (2000). También existen trabajos que aún no han sido publicados como los de Eckerman y Walsh (1997), y Klanten *et al.* (en prensa). Algunos de estos estudios, en donde los especímenes fueron fijados en formalina y preservados en alcohol, demostraron exitosamente la extracción y amplificación de ADN. France y Kocher (1996), demostraron la recuperación de ADN a partir de especies de crustáceos de profundidad fijados en formalina preservados en etanol. Incluso realizaron un análisis filogenético con las secuencias de los genes mitocondriales 16s ARNr y COI, que obtuvieron de estos especímenes. Estos investigadores señalan que en ausencia de tejido fresco o congelado, los especímenes fijados en formalina preservados en etanol pueden proveer un fuente útil de material para análisis secuencias de genes por PCR y secuenciación directa. El estudio realizado por Wirgin *et al.* (1997) con perca rayada (*Morone saxatilis*), demostró la posibilidad de emplear ADN de especímenes fijados en formalina preservados en isopropanol, para la discriminación de poblaciones mediante análisis RFLP. Wirgin y colaboradores extrajeron ADN a partir de especímenes fijados en formalina, amplificaron un fragmento de 191 pares de bases (pb) y lo cortaron con una

enzima de restricción diagnóstica *Xba I*. Con sus resultados resaltan el uso potencial de colecciones de museos en estudios poblacionales retrospectivos.

3. JUSTIFICACIÓN

La anchoveta norteña, al igual que otros pelágicos menores, es una especie de gran importancia ecológica debido a su abundancia y su dependencia sobre los niveles tróficos inferiores en la trama alimenticia pelágica constituyendo un importante eslabón del flujo de energía hacia los niveles tróficos superiores (Tudela *et al.*, 1999).

Esta especie tiene una singular importancia económica en la costa occidental de Baja California, la cual ha conformado uno de los pilares de la producción de los recursos pesqueros en cuanto a volúmenes de explotación nacional se refiere (en algunos años aproximadamente el 25%), además se le ha considerado con un potencial superior al medio millón de toneladas anuales (Escudero–Díaz, 1984). La pesquería en esta área ha transitado por un período de cambios rápidos. Aunque existen reportes de capturas desde 1965, es a partir de la década de los 70's cuando se inicia su pesquería con incrementos en los volúmenes de pesca hasta llegar a un máximo de 258,745 t en 1981 y decreciendo hasta 99 t en 1990. En 1995 alcanza un máximo de 17,772 t y decrece a un mínimo de 75.8 t en el 2001 (Pedrín-Osuna *et al.*, 1992; García-Franco y Sánchez-Ruíz, 2002) (Apéndice I).

A partir de 1986 cuando se reportó la especie en altas abundancias en el Golfo de California, se consideró como una especie pesquera potencial. Sin embargo ante el desconocimiento de si esta es una subpoblación residente o es una extensión de la subpoblación sureña, se ha generado la necesidad de realizar estudios que contribuyan al conocimiento de la estructura poblacional de la especie para un manejo adecuado de la pesquería en la región.

Con respecto al tipo de marcador genético utilizado, el ADN mitocondrial es un marcador genético adecuado tanto para estudios de genética poblacional como para estudios de progenie larval (Banks *et al.*, 1993 en Hedgecock, 1994; Bembo *et al.*, 1996). Este marcador puede ser altamente informativo acerca de la estructura geográfica de las poblaciones (Hartl y Clark, 1997). La molécula de ADN mitocondrial es relativamente

pequeña y fácil de aislar, está presente en múltiples copias por célula, posee una herencia clonal vía materna y presenta polimorfismo en su genoma (Banks *et al.*, 1993 en Hedgecock, 1994; Bembo *et al.*, 1996;). El ADN mitocondrial no es recombinante, de tal forma que solo tiene un cuarto del tamaño poblacional efectivo (N_f) de los marcadores nucleares. Este reducido N_f hace que presente un efecto cuatro veces mayor de deriva génica, en consecuencia lo hace un marcador genético sensible a las reducciones en la variación genética (Ferguson y Danzmann, 1998).

Muchos de los trabajos con ADN mitocondrial han sido sobre la secuencia de la región control. Esta región es altamente variable, la variabilidad se presenta en un subgrupo de sitios que son altamente mutables. Estos últimos son tan mutables que a menudo pueden presentar múltiples substituciones (Hartl y Clark, 1997). Los análisis de ADN mitocondrial definidos con la región control despliegan una fuerte especificidad geográfica (Vigilant *et al.*, 1991). Además los análisis de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de ADN mitocondrial, particularmente de las fracciones: región control, han sido más sensibles que el análisis de alozimas (Tabata y Mizuta, 1997).

Más aún este trabajo se justifica debido a que la capacidad de extraer, amplificar (PCR) y secuenciar ADN de especímenes fijados y preservados en formalina incrementaría el valor informativo de los mismos (Shiozawa *et al.*, 1992), generando la posibilidad de utilizar especímenes de muestras provenientes de cruceros oceanográficos en estudios de evolución, filogenia y estructura genética poblacional (Chase *et al.*, 1998). El **CICIMAR** al igual que otras instituciones posee, dentro de sus colecciones, series históricas de muestras de plancton. Estas colecciones pueden proveer series temporales detalladas de muestras que pueden ser comparables entre épocas y localidades.

4. OBJETIVOS

Generales:

- Determinar qué técnica de extracción de ADN, de las previamente reportadas, permite la obtención de ADN de alta calidad a partir de larvas de *Engraulis mordax* fijadas y preservadas en formalina.
- Estimar la diversidad genética, mediante análisis de RFLP de la región control del ADN mitocondrial, en adultos de *E. mordax* de la región central del Golfo de California preservados en etanol.

Particulares:

- Evaluar la calidad del ADN extraído de larvas.
- Estandarizar los parámetros termocíclicos de amplificación para los iniciadores de las fracciones de ADN mitocondrial, a partir de ADN extraído de adultos.
- Evaluar la calidad de amplificación del ADN extraído de larvas con las condiciones establecidas para adultos.
- Secuenciar y comparar el producto de las amplificaciones de larvas y adultos.
- Evaluar la técnica de RFLP en ADN extraído de adultos.

5. ÁREA DE ESTUDIO

El Golfo de California es un mar semicerrado, está localizado entre la península de Baja California y el macizo continental de México (Sonora y Sinaloa). Es de forma abruptamente rectangular, tiene cerca de 1000 Km. de largo, de 100 a 200 Km. de ancho y está orientado de Noroeste a Sudeste. En su terminación sur, el Golfo está en comunicación abierta con el océano Pacífico (Roden, 1958; Badan-Dangon *et al.*, 1985; Hamman *et al.*, 1988). Las dos principales provincias oceanográficas y fisiográficas, la parte superior y la parte baja del Golfo están separadas por un grupo de islas cerca de los 29°N. La parte superior del Golfo es una plataforma continental semicircular de aproximadamente 300 Km. de largo y 125 Km. de ancho, en donde el 75% del área es poco profunda (menor a 200 m de profundidad). La parte inferior del Golfo consiste de una serie de umbrales y cuencas. Estas últimas se hacen progresivamente más profundas, desde cerca de 2000 m en el centro de la cuenca de Guaymas hasta 3000 m en la boca del Golfo. Los márgenes del macizo continental (costa este), en la parte inferior del Golfo tienen una plataforma continental más amplia y una línea de costa más variable que los de la península de Baja California (costa oeste). La comunicación entre la parte superior e inferior del Golfo es principalmente a través del canal de Ballenas (Badan-Dangon *et al.*, 1985; Hammann *et al.*, 1988).

La circulación en el Golfo de California está definida por el intenso forzamiento de mareas, vientos, calentamiento solar, batimetría e interacciones con el océano Pacífico (Badan-Dangon *et al.*, 1985). En la boca del Golfo se han registrado importantes frentes de transición de temperatura y salinidad, uno afuera de Cabo San Lucas y otro afuera de Cabo Corrientes. La transición de Cabo San Lucas representa una muy marcada frontera entre el agua caliente y altamente salina del Golfo y agua fría y de salinidad más baja de la región de California. Esta fue primero descrita por Thorade (1909) en Roden (1958), quien señaló que la intensidad del frente es de carácter estacional y que la máxima intensidad se presentaba en primavera tardía cuando las diferencias de temperatura entre el Golfo de California y la Corriente de agua son más grandes. El frente de Cabo San Lucas es marcado por una estrecha banda en la cual la temperatura

decrece de 21° a 18 °C, y la salinidad de 34.6 a 34.1‰. Desde 1949 cuando el “Golden Bear” realizó estudios en la entrada del Golfo se asumió que la masa de agua caliente era empujada hacia afuera del Golfo y esta a su vez empujaba el agua fría al norte de Cabo San Lucas y al sur al lado de Cabo Corrientes, dando origen a los frentes observados (Roden, 1958).

6. METODOLOGÍA

6.1 Obtención de muestras

Este estudio se realizó con larvas de *Engraulis mordax* preservadas en formalina (4%), las cuales fueron aportadas por el departamento de Plancton y Ecología Marina del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (**CICIMAR**). Estas larvas corresponden al último de los cuatro cruceros reportados en el estudio realizado por Sánchez-Velasco *et al.* (2000). Un total de 1,821 larvas fueron colectadas durante este crucero que se realizó en la región central del Golfo de California (entre los 26 y 30°N y los 109 y 114°O) a bordo del B/O BIP XI en Marzo de 1999 (Fig. 1). Las larvas se obtuvieron con una red tipo bongo, con un diámetro de boca de 60 cm y mallas de 333 y 505 μm . Los arrastres fueron oblicuos desde 10 m sobre el fondo a la superficie o desde de 200 m de profundidad a la superficie fuera de la plataforma continental, siguiendo la metodología propuesta por Smith y Richardson (1979), y las muestras fueron fijadas en formalina (4%) neutralizada con borato de sodio. Posteriormente fueron separadas e identificadas de acuerdo a los criterios de Moser (1996).

Un total de 80 organismos adultos de *E. mordax* fueron donados por el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (**CIBNOR**) Unidad Guaymas. Esta única muestra se obtuvo de un lance (28° 30' N y 113° 01' O) realizado en la región central del Golfo de California a bordo del B/O BIP XI el 13 Noviembre del 2001(Fig. 1). Los organismos fueron congelados y transportados al laboratorio de genética acuícola del **CIBNOR** (La Paz, B.C.S.), en donde fueron almacenados a -20°C y posteriormente preservados en etanol al 70%.

Tanto las larvas preservadas en formalina (4%) como los adultos preservados en etanol fueron procesados en el laboratorio de genética acuícola del **CIBNOR**.

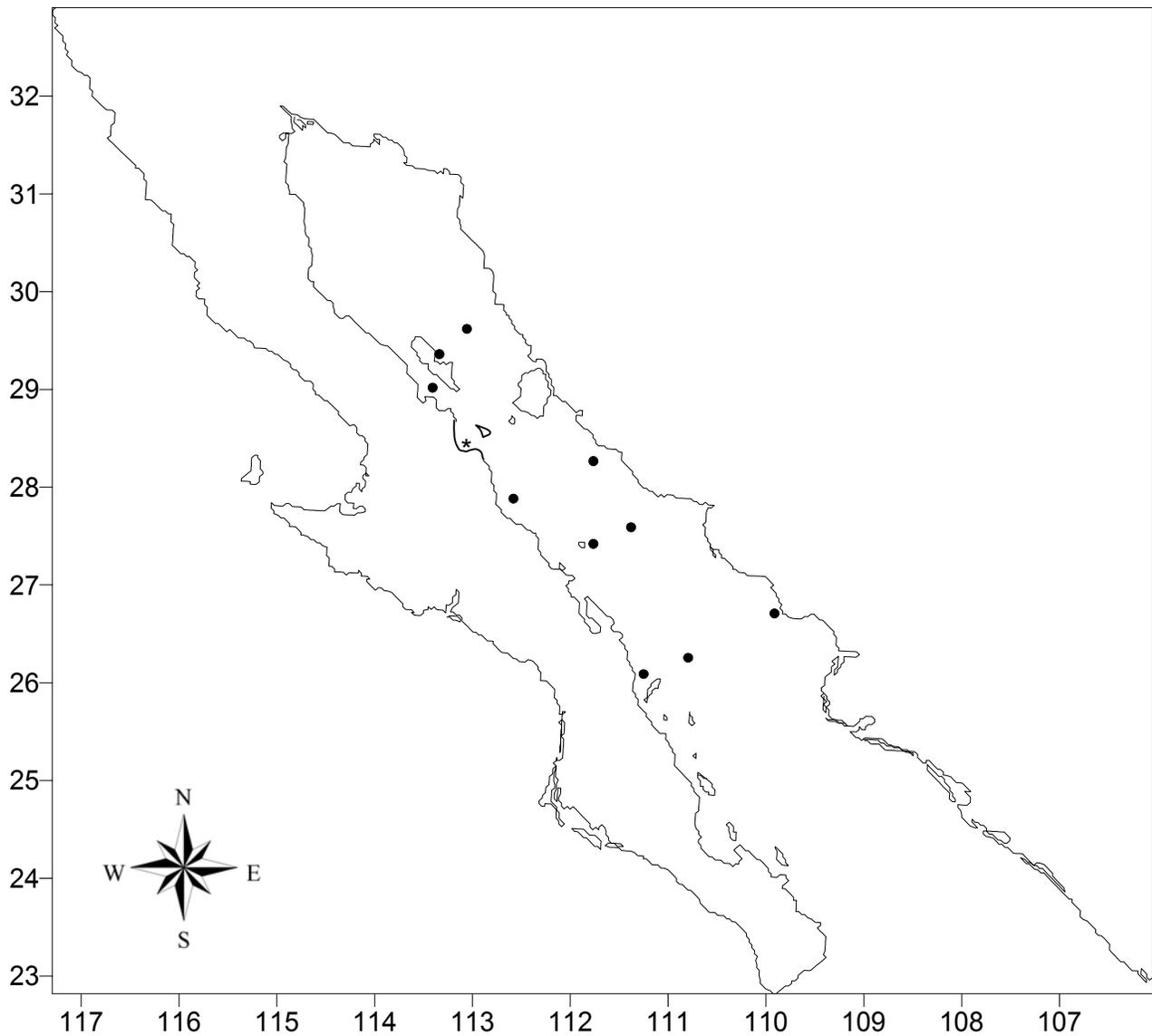


Figura 1. Estaciones de muestreo de larvas de *E. mordax* (•) y adultos (*).

6.2 Extracción de ADN

6.2.1 Larvas de *Engraulis mordax* preservadas en formalina (4%)

Se probaron diez diferentes técnicas, para la extracción de ADN, que en su mayoría contemplaban los efectos de la fijación en formalina (Fig. 2).

Figura 2 (archivo anexo)

Figura 2. (continuación)

Con cada una de las técnicas se hizo la extracción de ADN a partir de tres larvas por separado y cuatro en conjunto. Esta última se realizó debido a que el reducido tamaño de las larvas tiene posibles implicaciones en la cantidad de ADN extraído.

A cada una de las larvas se le retiró el tracto digestivo previo a la extracción de ADN. Esto se hizo para eliminar la posibilidad de contaminación con ADN no perteneciente a *E.mordax*.

Cada técnica se probó por lo menos tres veces, siguiendo lo anteriormente establecido. Las técnicas probadas fueron:

1) Taggart *et al.* (1992): Esta es la técnica tradicional de extracción de ADN con fenol – cloroformo. Esta técnica consistió primeramente en lavar las larvas con agua destilada (dos veces) y en homogenizarlas en solución amortiguadora de TNES-Urea (Apéndice II). Se le adicionó proteinasa-K (QIAGEN) y se incubó a 55 °C (3 h). Se purificó dos veces con fenol-cloroformo-isoamilalcohol y una vez con cloroformo-isoamilalcohol. Se precipitó con NaOAc y etanol absoluto a -20 °C durante toda la noche. Se centrifugó, se enjuagó con etanol (70%) y se volvió a centrifugar. Se tiró el sobrenadante y se dejó secar el ADN. Este último se resuspendió en solución amortiguadora de TE (Apéndice II).

2) Camarena-Rosales (com. pers.): Esta técnica conocida como “hidratación” fue propuesta para la eliminación de formalina previa a la extracción tradicional de ADN con fenol–cloroformo. Esta técnica consiste en lavados con etanol a diferentes concentraciones (Apéndice II), hasta llegar a agua destilada en un periodo de 16 hrs. La principal modificación que se hizo a esta técnica fue en la duración de cada lavado en etanol (a diferente concentración) y en agua destilada, cambiándose de dos horas y media a un día completo. Con esta técnica se probaron dos variantes: (1) realizando los lavados a temperatura ambiente y (2) a temperatura de 4 °C.

3) Shedlock *et al.* (1996): Esta técnica consistió en mantener a las larvas en solución GTE (Apéndice II) por periodos prolongados (72 h) a temperatura ambiente para la eliminación de la formalina. Posteriormente las larvas fueron secadas completamente, cortadas en fragmentos pequeños y digeridas en solución amortiguadora de extracción con proteinasa-K (QIAGEN) y DTT a una temperatura de 65 °C (24h). Después de las primeras 10 h de digestión se agregó proteinasa-K adicional. La purificación se realizó dos veces con fenol-cloroformo-isoamilalcohol y una vez con cloroformo-isoamilalcohol. Se precipitó con NaOAC y etanol absoluto a -20 °C durante toda la noche. Se centrifugó, se enjuagó con etanol (70%) y se volvió a centrifugar. Se tiró el sobrenadante y se dejó secar el ADN. Este último se resuspendió en solución amortiguadora de TE (Apéndice II).

4) Shiozawa *et al.* (1992): Esta técnica consistió en mantener a las larvas en solución amortiguadora TE9 (Apéndice II) por periodo de 24 h a temperatura ambiente, previo a la digestión. Posteriormente las larvas fueron cortadas en fragmentos pequeños y colocadas en nueva solución amortiguadora TE9 con SDS y proteinasa-K (QIAGEN). La digestión se realizó a 55 °C por períodos prolongados (74 h) con cantidades adicionales de proteinasa-K y SDS. El ADN fue extraído dos veces con fenol-cloroformo-isoamilalcohol y una vez con cloroformo-isoamilalcohol. Se precipitó con NaOAC y etanol absoluto a -20 °C durante toda la noche. Se centrifugó, se enjuagó con etanol (70%) y se volvió a centrifugar. Se tiró el sobrenadante y se dejó secar el ADN. Este último se resuspendió en solución amortiguadora de TE (Apéndice II). Esta técnica se realizó con las modificaciones propuestas por France y Kocher (1996); que consistieron en manejar volúmenes de soluciones mucho más pequeños que los reportados por la técnica.

5) Jones y Avise (1997): Esta es una técnica propuesta para larvas de especies marinas y no contempla la fijación de las larvas en formalina, por tal razón se realizaron primero los lavados y centrifugaciones propuestos por la técnica de Eckerman *et al.* (1997). Posteriormente las larvas fueron cortadas en fragmentos pequeños y se les adicionó solución amortiguadora TNES-Urea (Apéndice II) y proteinasa-K. Se llevó a incubación

(37 °C) por 30 min y luego a ebullición (95 °C) por 2 min. Las muestras fueron centrifugadas y el sobrenadante se utilizó para reacciones de amplificación (PCR).

6) Heller *et al.* (1992): Esta es una técnica de extracción de ADN por sonicación. Las larvas fueron lavadas con agua destilada, cortadas en fragmentos pequeños y puestas en solución amortiguadora (Apéndice II) con proteinasa-K (QIAGEN) y microperlas de vidrio "G9143" (Sigma), se sonicaron (15 min) a una temperatura de 50 °C, se llevaron a ebullición (10 min), se centrifugaron y el sobrenadante se utilizó para reacciones de amplificación por reacción en cadena polimerasa (PCR).

7) DNeasy Tissue Kit: Este es un producto comercial manufacturado por la compañía QIAGEN. Este protocolo recomienda lavar las muestras en solución de PBS (Apéndice II), para la eliminación de formalina previo a la extracción con el Kit. Cada larva se cortó en fragmentos pequeños, se le añadió solución amortiguadora ATL y proteinasa-K y se incubó a 55 °C (3 h). Después se le añadió solución amortiguadora AL y se incubó a 70 °C (10 min). Posteriormente se le adicionó etanol absoluto y se pasó a un tubo de minicolumna. Este tubo se centrifugó a 8000 rpm (1 min), se le adicionó solución amortiguadora AW1 y se centrifugó nuevamente. A continuación se le adicionó solución amortiguadora AW2 y se centrifugó a máxima velocidad (3 min). Para hacer la elución, se añadió solución amortiguadora AE, se incubó a temperatura ambiente (1 min) y se centrifugó a 8000 rpm.

8) Chase *et al.* (1998): Con esta técnica se utilizó el producto anterior siguiendo las instrucciones mencionadas, salvo algunas modificaciones en su uso como: un aumento en las cantidades utilizadas de solución amortiguadora (AL) y etanol (100%), y la elución en Tris-HCl (Apéndice II).

9) Eckerman *et al.* (1997): Las larvas fueron lavadas varias veces con agua destilada y sometidas a altas centrifugaciones (14,000 rpm) para eliminar la formalina. Posteriormente éstas fueron cortadas en fragmentos pequeños, se les agregó Chelex

(Biorad), se mezclaron y se llevaron a ebullición (20 min). Las muestras fueron centrifugadas y el sobrenadante se utilizó para reacciones de amplificación (PCR).

10) Coombs *et al.* (1999): En esta técnica las larvas fueron lavadas con agua destilada un par de veces, cortadas en fragmentos pequeños y llevadas a digestión en solución amortiguadora de TNES-Urea (Apéndice II) con proteinasa-K (QIAGEN), a 55 °C (3 h). Para la purificación se adicionó Chelex (Biorad) en cada muestra y se calentó a 99 °C (10 min). Posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm (15 min), se calentó a 45 °C y se agregó cloroformo. Se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm (15 min) y la fase superior fue removida y almacenada. Esta fase acuosa se utilizó para reacciones de amplificación (PCR).

6.2.2 Adultos de *Engraulis mordax* preservados en etanol (70%)

La extracción de ADN de 41 adultos de anchoveta se realizó con la técnica propuesta por Taggart *et al.* (1992), descrita en este capítulo. Esta técnica fue propuesta para peces salmónidos y fue la única técnica que se probó en adultos de *E. mordax* debido a que se obtuvieron resultados con esta. En cuanto al tamaño de muestras; aunque se contaba con 80 especímenes adultos, solo se extrajo ADN de calidad de 41 de ellos. Algunos investigadores como Bembo *et al.* (1995), han recomendado emplear tamaños de muestra tan grandes como 40 ó 50 peces para el análisis de RFLP.

6.3 Evaluación de concentración y calidad de ADN extraído

La concentración del ADN genómico extraído (en larvas y adultos) se evaluó con lecturas de densidad óptica a los 260 y 280 nm (DO_{260} , DO_{280}), en un espectrofotómetro (Beckman DU-600) y mediante el algoritmo de Warburg-Christian. La calidad del ADN genómico extraído se evaluó de la razón DO_{260}/DO_{280} . Se considera una preparación de

ADN limpia cuando la razón DO_{260}/DO_{280} es igual o mayor a 1.75. Si el valor de la razón es más bajo, esto indica que existe una contaminación por proteínas (Darbre, 1999).

La integridad del ADN genómico extraído se evaluó visualmente mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (condiciones eléctricas: 100 volts y 204 amperes), tiñéndose con bromuro de etidio (Sigma) o Sybr-gold (FMC) (Apéndice II). Los geles teñidos con bromuro de etidio se visualizaron con luz UV (Dinco & Rhenium), mientras que los teñidos con Sybr-gold se visualizaron con la ayuda de un transiluminador “Dark Reader” (Clare Chemical Research). Los geles teñidos con Sybr-gold se fotodocumentaron con una cámara fotográfica digital “Cyber-shot” (Sony) y los geles teñidos con bromuro de etidio a través de un dispositivo analizador de imagen (Gelpro 3.1).

6.4 Amplificación (PCR)

6.4.1 Amplificación de ADN extraído de adultos

El ADN genómico extraído de adultos se amplificó con iniciadores propuestos para las siguientes fracciones de ADN mitocondrial: NADH1(1,930 pb), 16s ARNr (618 pb), 12s ARNr (431 pb) y dos fragmentos de la región control; región control II (551 pb), y región control III (176 pb).

Por cada 2 μ l de ADN genómico (50-100 ng/ μ l) de cada muestra, se añadió la siguiente mezcla de reacción (Tabla 1). Se manejo un volumen total de 25 μ l por cada reacción de amplificación.

Tabla 1. Mezcla de reacción para la amplificación

Reactivos	Volúmenes
Solución amortiguadora para Taq con MgCl ₂ (10X)	2.5µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
dNTP's (10 mM de cada dNTP)	0.2 µl
Iniciadores (10µM) (c/u)	1.2µl
Agua desionizada	16.775 µl
Taq (5 u/µl)	0.125 µl

Las amplificaciones se llevaron a cabo mediante PCR en un termociclador Progene (Techne).

Para las fracciones NADH1, 16s ARNr y región control II se manejaron los siguientes parámetros termocíclicos:

1 ciclo: Desnaturalización inicial ————— 94 °C (2 min)
30 ciclos: Desnaturalización ————— 94 °C (1 min)
Temperatura de alineamiento ————— (Tabla 2) (1 min)
Extensión ————— 72 °C (1-2 min)
1 ciclo: Extensión final ————— 72 °C (4 min)

Para las fracciones 12s ARNr y región control III los parámetros termocíclicos fueron:

1 ciclo: Desnaturalización inicial ————— 94 °C (2 min)
30 ciclos: Desnaturalización ————— 94 °C (30-40 s)
Temperatura de alineamiento ————— (Tabla 2) (30-40 s)
Extensión ————— 72 °C (30-40 s)
1 ciclo: Extensión final ————— 72 °C (4 min)

Tabla 2. Secuencias de los iniciadores empleados, temperatura a la cual se alinean y artículo de procedencia.

Fracción	Iniciadores	Temperatura de alineamiento	Referencia
NADH1	F: 5'-ACCCCGCCTGTTTACCAAAAACAT-3' R: 5'-GGTATGAGCCCGATAGCTTA-3'	52 °C	Cronin <i>et al.</i> (1993)
16s ARNr	F: 5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3' R: 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'	53 °C	Palumbi <i>et al.</i> (1991)
región control II	F: 5'-ATTTCTGGCCTCTGGTTCCT-3' R: 5' -GCATCTTCAGTGCTATGCTTTG-3'	56 °C	1
12s ARNr	F: 5'-AAACTGGGATTAGATACCCAGTT-3' R: 5'-AAGAGCGACGGGCGATGTGT-3'	55 °C	2
región control III	F: 5'-ATTTCTGGCCTCTGGTTCCT-3' R: 5'-CCAAATGCCAAGTGAAAGGT-3'	57 °C	3

F; Derecho, R; Reversa

¹ Iniciadores diseñados para *E. mordax* mediante el uso del programa "Primer 3" (versión 0.2) (Rozen y Skaletsky, 2000) y en base a la secuencia del ADN mitocondrial de *E. japonicus* (Inoue *et al.*, 2001).

² Iniciador (12 s a) diseñado a partir de "Primer 3" (versión 0.2) (Rozen y Skaletsky, 2000).

³ Iniciadores diseñados a partir de la secuencia de la región control II de *E. mordax*, mediante el uso del programa "Primer 3" (versión 0.2) (Rozen y Skaletsky, 2000).

6.4.2 Amplificación de ADN extraído de larvas

El ADN genómico extraído de larvas se intentó amplificar con los mismos iniciadores utilizados en adultos. Las condiciones de amplificación utilizadas en larvas fueron las mismas a las estandarizadas en adultos.

Particularmente para la amplificación de ADN de larvas se propusieron las fracciones: 12s ARNr (431 pb) y región control III (176 pb) (Tabla 2), debido a que son fracciones de bajo peso molecular. Cabe señalar que la fracción región control III, es aproximadamente una tercera parte de la fracción región control II. Los iniciadores que amplifican para la región control III se propusieron debido a que amplifican la fracción de menor peso molecular, además de ser iniciadores específicos para *E. mordax*. Una forma de evitar amplificaciones falsas de fragmentos bacterianos es mediante la utilización de iniciadores específicos ó diseñados para la especie (Chase *et al.* 1998).

6.5 Secuencias

Una vez obtenidas las amplificaciones de las fracciones NADH-1, 16s ARNr y región control II en adultos, el producto de cada fracción (un espécimen por cada fracción) fue purificado con el producto “QIAquick Gel Extraction Kit” (QIAGEN) para posteriormente ser secuenciado. El producto de amplificación obtenido en larvas, únicamente con los iniciadores propuestos para la fracción 16s ARNr, también fue secuenciado.

Las secuencias se obtuvieron en un secuenciador automático ABI Prism 310, marcando con el Kit Big Dye (Perkin Elmer).

La secuencia de nucleótidos obtenida en larvas fue comparada a la secuencia de adultos y base de datos GENBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), mediante un análisis de homologías “BLAST” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Las secuencias obtenidas en adultos fueron comparadas, también a través de BLAST, con las secuencias ya existentes en el GENBANK de otras especies de engráulidos: *Engraulis japonicus* (No. de acceso en GENBANK: AB040676) y *Engraulis ringens* (No. de acceso en GENBANK: AY184229).

Una vez que las secuencias fueron cuidadosamente verificadas, se depositaron en el banco público de datos “GENBANK” que es manejado por el NCBI (National Center for Biotechnology Information) de los E.E.U.U. y que contiene secuencias de ADN de un gran número de especies.

6.6 Análisis con enzimas de restricción (RFLP)

El análisis de RFLP se llevó a cabo con los productos de amplificación obtenidos en 41 adultos de anchoveta. Para este análisis se decidió utilizar únicamente la fracción región control II (551pb).

Con la secuencia obtenida de la región control II (551 pb) y mediante el uso del programa “REB sites” (Vincze y Roberts, <http://tools.neb.com/REBSites/index.php3>) se determinaron seis enzimas de restricción adecuadas para cortar dicha fracción. De manera aleatoria en amplificaciones de la misma región de 10 especímenes se probaron 15 enzimas más, que totalizaron 21 enzimas de restricción (Promega, Sigma y NEB). Estas enzimas fueron: *Alu I*, *BamH I*, *Bcl I*, *Bgl II*, *EcoR I*, *Fok I*, *Hae III*, *Hind III*, *Hpy188 I*, *Mse I*, *Nco I*, *Nhe I*, *Nsi I*, *Pst I*, *Taq I*, *Rsa I*, *Sac I*, *Sau 3AI*, *Sau 96I*, *Xba I* y *Xmn I*.

La enzimas de restricción que digirieron exitosamente el producto de la amplificación de 41 especímenes y que se emplearon para el análisis de RFLP fueron: *Alu I*, *EcoR I*, *Fok I*, *Taq I*, *Sau 96I*, *Xba I* y *Xmn I*.

En el caso de las enzimas: *Alu I*, *EcoR I*, *Fok I*, *Taq I* y *Sau 96I*, por cada 10 µl del producto de PCR de cada espécimen, se añadió la siguiente mezcla de reacción (Tabla 3).

Tabla 3. Mezcla de reacción empleada para las enzimas: *Alu I*, *EcoR I*, *Fok I*, *Taq I* y *Sau 96I*.

Reactivos	Volúmenes
Solución amortiguadora de la enzima (10X)	2 µl
Agua desionizada	7µl
Enzima de restricción	1µl

En el caso de las enzimas: *Xba I* y *Xmn I*, por cada 10 µl del producto de PCR de cada espécimen, se añadió la siguiente mezcla de reacción (Tabla 4).

Tabla 4. Mezcla de reacción empleada para las enzimas: *Xba I* y *Xmn I*.

Reactivos	Volúmenes
Solución amortiguadora de la enzima (10X)	2 μ l
BSA	2 μ l
Agua desionizada	5 μ l
Enzima de restricción	1 μ l

La digestión con la mayoría de las enzimas se realizó a 37 °C (salvo el caso de *Taq I* a 65 °C) y con duración de 4-12 horas.

Los productos de PCR y las digestiones con las enzimas se corrieron en geles de agarosa al 1 y 2%, respectivamente, se tiñeron con bromuro de etidio (Sigma) ó Sybr-Gold (FMC) (Apéndice II), se visualizaron en un transiluminador de luz UV (Dinco & Rhenium) ó en uno de luz visible “Dark Reader” (Clare Chemical Research) y se registraron con un dispositivo analizador de imagen (Gelpro 3.1) ó con una cámara digital “Cyber-shot” (Sony), respectivamente como se mencionó con anterioridad. Los tamaños de los fragmentos fueron estimados por comparación de cada banda con marcadores con longitudes de fragmentos definidas: pUC18 digerido con *Dpn I* (Sigma), λ digerido con *Hind III* (Sigma) ó una escalera de 100 pares de bases (NEB).

Utilizando letras mayúsculas se denotaron los haplotipos referentes a los patrones de fragmentos generados por las enzimas en el siguiente orden: *Alu I*, *EcoR I*, *Fok I*, *Taq I*, *Sau 96I*, *Xba I* y *Xmn I*.

6.7 Estimadores de diversidad genética

Se obtuvo el nivel de *polimorfismo nucleotídico* (θ), definido como la proporción de sitios nucleotídicos que son esperados a ser polimórficos en determinada región del genoma de cualquier muestra. La forma de utilizar este estimador con datos de RFLP es considerando los nucleótidos de cada sitio de restricción. Para los sitios monomórficos

de restricción se consideraron todos los nucleótidos adyacentes y para los sitios polimórficos de restricción se consideró solo un nucleótido como polimórfico y los restantes como monomórficos. En otras palabras, cada sitio de restricción polimórfico se supone es resultado del polimorfismo en un nucleótido sencillo (Hartl y Clark, 1997).

El estimador θ es igual a la proporción de polimorfismo nucleotídico observado en la muestra, a menudo simbolizada como S , dividida por a_1 .

$$S = \text{nucleótidos polimórficos} / \text{nucleótidos totales} \quad \text{con} \quad a_1 = \sum_{i=1}^{n-1} 1/i$$

donde n es el tamaño de la muestra. El estimado de θ , por sitio nucleotídico, es por lo tanto:

$$\theta = S/a_1$$

La varianza de θ por sitio nucleotídico es dada por:

$$V(\theta) = \theta/ka_1 + a_2\theta^2/a_1^2$$

donde k es el número de nucleótidos en cada secuencia y a_2 es una función del número de alelos (n) en la muestra, nombrada

$$a_2 = \sum_{i=1}^{n-1} 1/i^2$$

Un segundo estimador para evaluar el nivel de polimorfismo en el ADN mitocondrial fue la *diversidad nucleotídica*, típicamente denotada como π , la cual es la proporción promedio de diferencias nucleotídicas entre todos los posibles pares de secuencias en la muestra.

En una muestra de n secuencias, el número de comparaciones pareadas está dada por:

$$n(n-1)/2$$

Las comparaciones pareadas fueron consideradas para cada nucleótido en turno y las diferencias fueron promediadas al último.

La varianza de π se estimó de la siguiente manera:

$$\text{Var}(\pi) = (b_1/k)\pi + b_2\pi^2$$

donde k es la longitud de las secuencias en nucleótidos y donde:

$$b_1 = (n+1)/3(n-1)$$

$$b_2 = 2(n^2+n+3)/9n(n-1)$$

donde n es el número de secuencias (Hartl y Clark, 1997).

La *diversidad de haplotipos* (h) se calculó mediante la ecuación de Nei:

$$h = 2n (1 - \sum X_i^2)/(2n - 1)$$

donde n es el tamaño de muestra, y X_i es la frecuencia del haplotipo en la muestra (Nei, 1987 en Tabata, 1997). Este último estimador de diversidad se obtuvo con la ayuda del software Arlequin ver. 2.000 (Schneider *et al.*, 2000).

7. RESULTADOS

7.1 Extracción de ADN de larvas de *Engraulis mordax*

Los resultados de las diez técnicas de extracción de ADN, que se probaron en larvas de anchoveta preservadas en formalina, se presentan en la Tabla 5.

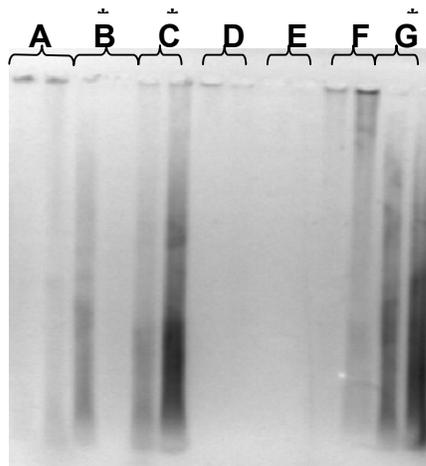
Tabla 5. Técnicas de extracción de ADN probadas en larvas de *E. mordax* preservadas en formalina.

Técnica	Resultados de la extracción
Taggart <i>et al.</i> , 1992	No se obtuvo
Heller <i>et al.</i> , 1992	No se obtuvo
Shedlock <i>et al.</i> , 1996	No se obtuvo
Eckerman <i>et al.</i> , 1997 (NP)	No se obtuvo
Jones y Avise, 1997	No se obtuvo
Shiozawa <i>et al.</i> , 1992	Se obtuvo
DNeasy Tissue Kit (Qiagen)	Se obtuvo
Chase <i>et al.</i> , 1998	Se obtuvo
Coombs <i>et al.</i> , 1999	No se obtuvo
Camarena - Rosales (NP) (a temperatura ambiente y a 4 °C)	Se obtuvo

NP; No publicada

Se obtuvieron extracciones de ADN con las técnicas de Shiozawa *et al.* (1992) modificada por France y Kocher (1996), "Dneasy tissue Kit" (QIAGEN), Chase *et al.* (1998) (Fig.3) y la técnica de hidratación realizada a 4 °C (Camarena-Rosales). Sin embargo, las extracciones obtenidas mostraron un ADN muy fragmentado (barrido) y de muy bajo peso molecular (Figs. 3 y 4).

La cantidad de ADN extraído de larvas procesadas individualmente difirió notablemente de las larvas procesadas en conjunto, apreciándose una mayor cantidad de ADN extraído al procesar más de una larva (Fig. 3).



- A. Shedlock *et al.*, 1996
- B. DNeasy Tissue Kit (Qiagen)
- C. Shiozawa *et al.*, 1998
- D. Heller *et al.*, 1992
- E. Eckerman *et al.*, 1997
- F. Coombs *et al.*, 1999
- G. Chase *et al.*, 1998

Figura 3. Extracción de ADN de larvas de *E. mordax*, a través de diferentes técnicas propuestas para tejidos fijados en formalina. En el gel cada técnica comprende dos pozos que corresponden a la extracción de una larva (izquierdo) y cuatro larvas en conjunto (derecho). Solo con tres de las técnicas señaladas (*) se obtuvieron resultados.

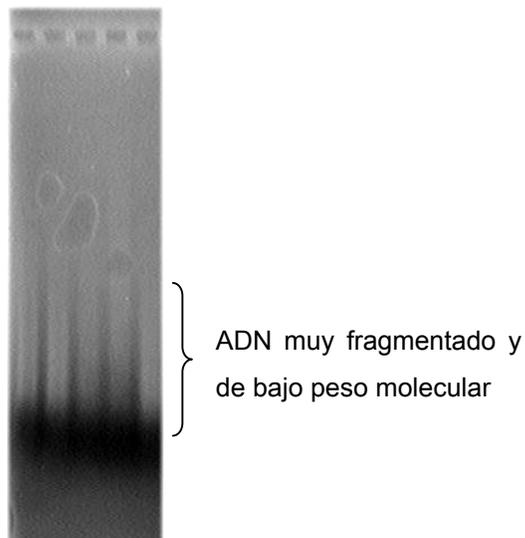


Figura 4. Extracción de ADN de larvas de *E. mordax*, mediante la técnica de hidratación realizada a 4 °C (Camarena-Rosales).

En particular con la técnica de hidratación (Camarena-Rosales) se obtuvieron dos resultados. Primero, cuando el proceso de eliminación de formalina “hidratación” se realizó a temperatura de 4 °C, los resultados de la extracción fueron similares a los obtenidos con las técnicas de Shiozawa *et al.* (1992), Dneasy Tissue Kit y Chase *et al.* (1998) (Fig. 4). Segundo, cuando el proceso de hidratación se realizó a temperatura ambiente, el resultado de la extracción fue un ADN de elevado peso molecular (Fig.5).

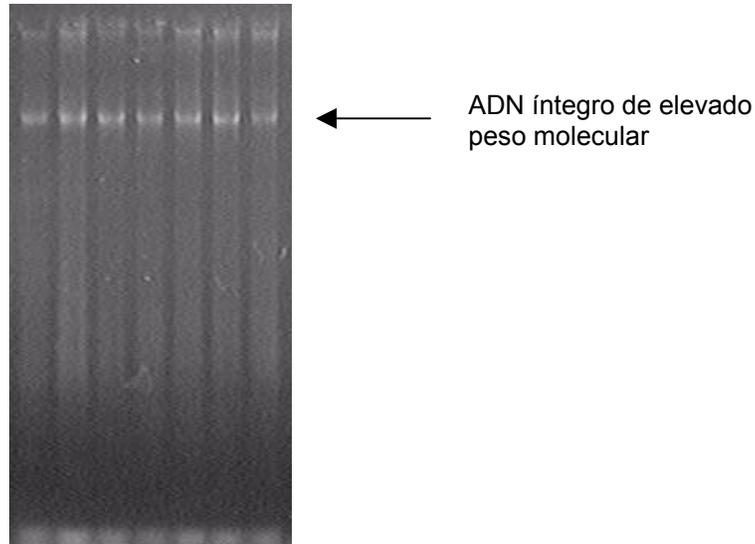


Figura 5. Extracción de ADN de larvas de *E. mordax*, mediante la técnica de hidratación (Camarena-Rosales), realizada a temperatura ambiente.

7.2 Amplificación de ADN extraído de larvas

Los resultados de la amplificación de ADN extraído de larvas, con iniciadores propuestos para diferentes fracciones de ADN mitocondrial, se presentan en la Tabla 6.

Como se puede ver en la Tabla 6, el ADN que se extrajo de larvas con las tres primeras técnicas no se pudo amplificar con ninguno de los iniciadores. Incluso los iniciadores que amplifican fracciones pequeñas de ADN mitocondrial (176 y 431 pb), no dieron buenos resultados (Fig. 6).

Tabla 6. Resultados de la amplificación de ADN extraído de larvas de *E. mordax* preservadas en formalina y un control (adulto preservado en etanol).

Técnica de extracción	Región amplificada				
	NADH1	16s ARNr	región control II	12s ARNr	región control III
	(1,930 pb)	(618 pb)	(551 pb)	(431 pb)	(176 pb)
Shiozawa <i>et al.</i> , 1992	-	-	-	-	-
DNeasy Tissue Kit	-	-	-	-	-
Chase <i>et al.</i> , 1998	-	-	-	-	-
Camarena-Rosales (a temp. amb. y a 4 °C)	-	+	-	-	-
Control	+	+	+	+	+

+; Se obtuvo

-; No se obtuvo

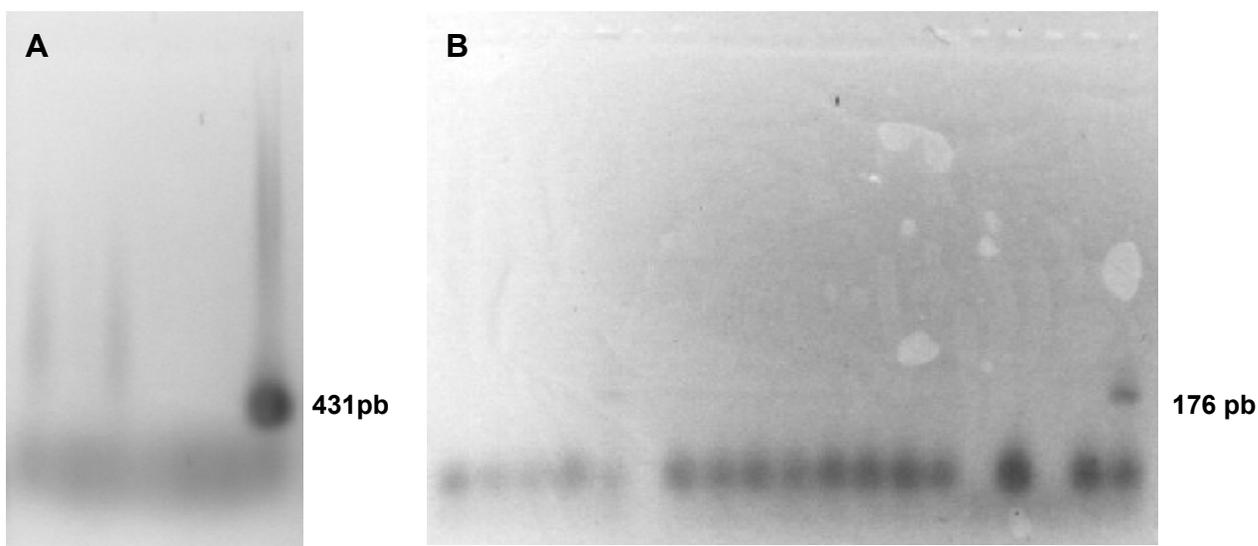


Figura 6. Amplificaciones de ADN de larvas de *E. mordax* extraído con diferentes técnicas. Los iniciadores probados amplifican las fracciones 12s ARNr (A) y región control III (B) en muestras controles ó ADN extraído de adultos (último pozo a la derecha).

El ADN extraído de larvas, empleando la técnica de hidratación (Camarena-Rosales) a temperatura ambiente ó a 4 °C, amplificó un fragmento de aproximadamente 650 pb utilizando los iniciadores propuestos para la fracción 16s ARNr, un fragmento más grande de lo esperado. Estos mismos iniciadores amplifican en adultos un fragmento de 618 pb (Fig. 7).

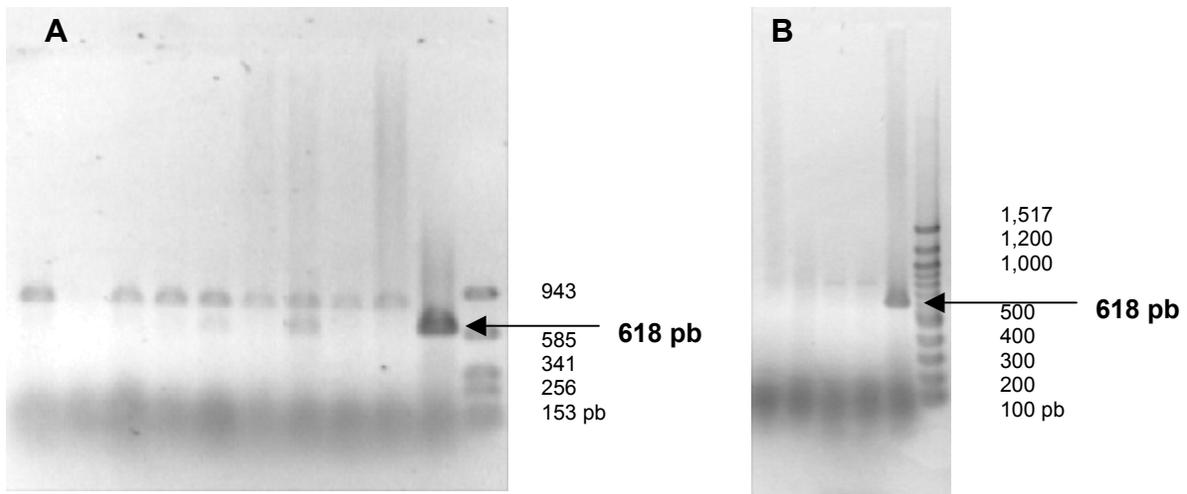


Figura 7. Amplificaciones de ADN extraído de larvas de *E. mordax* con la técnica de hidratación (Camarena-Rosales) realizada a temperatura ambiente (A) y a 4 °C (B). Estos resultados se obtuvieron con los iniciadores de la fracción 16s ARNr. Los dos últimos pozos (de izquierda a derecha), corresponden a un control y a un marcador de tamaño conocido, respectivamente.

7.3 Secuencia

El fragmento de 650 pb se secuenció (Tabla 7) para corroborar su correspondencia a la fracción 16s ARNr, sin embargo al compararse con la secuencia obtenida en adultos de *E. mordax* a través de un análisis de homologías (BLAST), resultó ser muy diferente. Utilizando el mismo análisis con la base de datos GENBANK la secuencia desconocida compartió un 90% ($E = 9e^{-60}$) y un 89% ($E = 5e^{-46}$) de parecido con los genes CB15 de la bacteria *Caulobacter crescentus* (No. de acceso en GENBANK: AE006010) y 23s ARNr de *Mesorhizobium huakuii* (No. de acceso en GENBANK: AY244366), respectivamente.

Tabla 7. Secuencia de nucleótidos de la fracción desconocida amplificada con los iniciadores propuestos para la fracción 16s ARNr.

Fracción (Tamaño)	Secuencia
Desconocida (642 pb)	<pre> mmnannaanatncnaanncnntnccccccccccccctccccccc cnccttttaggcnnncnnaaccncaggangacgtttanggnctgacgct gcccggtgctgcaaggttaaaggaggggtgcaagctctgaatgnnagc ccaggtcaaacngcggccgnaactataacggtcctaaggtagcgaattc cttgtcgggtaagtntctgacctgcaccaatggcctcaacgacttcnca ctgtctccagcatangctccancgaaatntnaatttccccngagaatgcn cnggttncctgcgcccacaaccgnaaagaccttatgaacctttntctgc acnttttntntnnggcgttanctaacaacattgctgtacgatanagg tngagacngntatngaaataaaggngcgnagtnccctncngnaacc nancnctanaaataccccacctttatttgcnaagcttnaacgttttaaccg cggncnngtcttccnggagcgggncacangggcnntgnacnngncaatn aacanttgggggngganntccatcncaaantngaganctgaangccncg nccacnnttgacttcaatagcaagctcnnananccttgctct </pre>

7.4 Extracción de ADN de adultos de *Engraulis mordax*

El ADN extraído de los adultos de anchoveta con la técnica fenol-cloroformo (Taggart *et al.*, 1992) mostró muy poca integridad, observándose un ADN fragmentado (Fig. 8). Sin embargo con este ADN se amplificaron diferentes fracciones de ADN mitocondrial.

7.5 Amplificación de ADN extraído de adultos

Con el ADN genómico de adultos se amplificaron cinco fracciones del ADN mitocondrial: NADH1, 16s ARNr, región control II (Fig. 9), 12s ARNr y región control III.



Figura 8. Extracción de ADN de adultos de *E. mordax* mediante la técnica de Taggart *et al.* (1992).

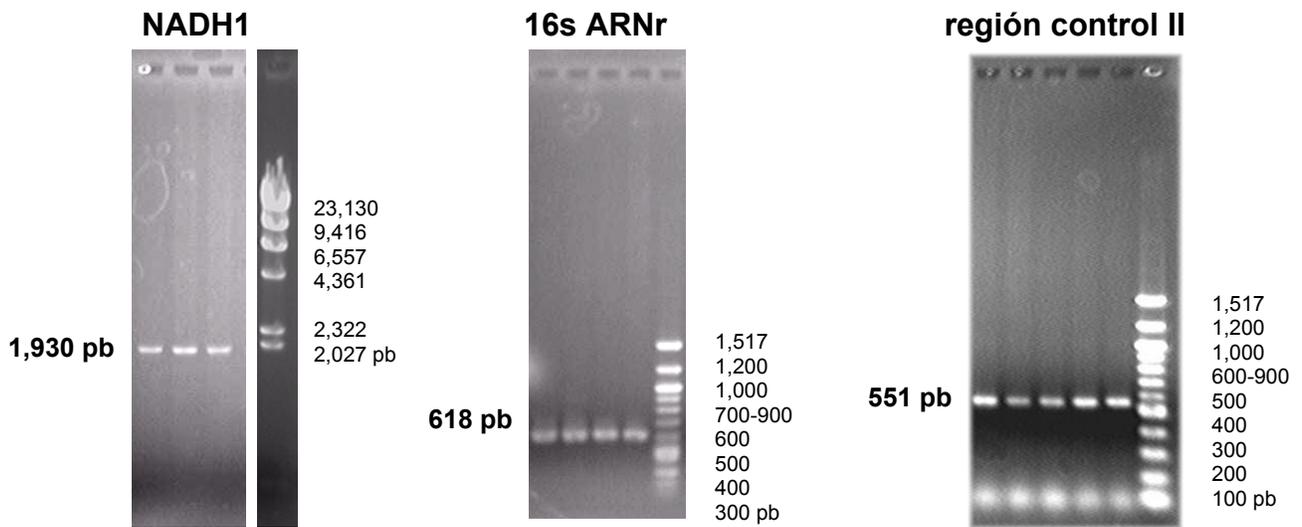


Figura 9. Amplificaciones de las fracciones: NADH1, 16s ARNr y región control II en adultos de *E. mordax*. El último pozo, de izquierda a derecha, corresponde a un marcador de tamaño conocido.

7.6 Secuencias

A pesar de que se obtuvieron amplificaciones de cinco fracciones, solo se secuenciaron los productos de: NADH1, 16s ARNr y región control II. Las fracciones región control III y 12s ARNr no se secuenciaron.

Se obtuvieron por primera vez las secuencias de las fracciones: 16s ARNr y región control II para *Engraulis mordax*, estas ya se encuentran disponibles en el “GENBANK” con sus respectivos números de acceso (Tabla 8). La secuencia de la fracción NADH1 no se reportó, debido a que no fue de buena calidad.

Tabla 8. Secuencias de las fracciones de ADN mitocondrial: 16s ARNr y región control II, amplificadas en adultos de *E. mordax* y números de acceso al GENBANK.

Fracción (Tamaño)	Secuencia		
16 s rRNA (535 pb)	taagaggtcccacctcgccctgtgactctaagtttaacggccgcggtatt	50	
	No. de Acceso:	ctaaccgtgcgaaggtagcgcgaatcaattgccttttaaatgaaggcctgt	100
	AY328468	atgaatggtataacgaggggtctgactgtctcttttttctagtcagttaaa	150
	ctgatctgtccgtgcagaagcggacattattatacaagacgagaagacc	200	
	tatggagcttttagacactagccaactgtgaatgagcgcactgaactataca	250	
	agtcttaaataccacagcctctggtaatgtagtcttaggttggggcgac	300	
	cacgggagaaaataaagctcccaagcagaccgggaaaacccttaagccca	350	
	gagttgcaactctaagccgcaaaaattttgactgaaatgatccgggtgaa	400	
	aaaccgattaacgaaccaagttaccctagggataacagcgcgaatcctctc	450	
	ccagagtcctatcgacgaggggggtttacgacctcgatggttgatcagga	500	
	catcctaattggtgcagccgctattaaggggttcggt	535	
	región control II (425 pb)	aattgcgcggttcgcgcataacgtaatgcatgcaacatcgatcctacttt	50
		No. de Acceso:	accacccatgccaaagcgttcactctaaggggcatttggtatTTTTTTTTTc
AY328469		ggcttactttcacttggcatttgacggggccttcctaattgtagttcca	150
taaggtgaacattttccttgcttgcgattttctagatggtcaataacttca		200	
tccacattcttacaagacttgcataagtgatctcaggagcataaaactacc		250	
gttctttactccttattcccctactattatgccctcccttcccttcaaaa		300	
aatttggtgTTTTTcgcgctaaacccccctacccccctacgaccagacaa		350	
gcctatTTTTTctgtcaaacccccgaaaccaggaaagaccggactggcgc		400	
attctagcaagtttcgTTTTgtgtgc		425	

A través de un análisis de homologías (BLAST), *E. mordax* demostró compartir con *Engraulis japonicus*, un 88% de la fracción NADH1 ($6e^{-63}$), un 96% de la fracción 16s ARNr ($E = 0.0$), y un 87% de la fracción de la región control II ($E = 6e^{-66}$). Con la especie *Engraulis rigens* la homología de la fracción de la región control II fue del 85% ($E = 6e^{-26}$).

7.7 Análisis de RFLP de la región control II en adultos

A pesar de que se logró la amplificación de cinco fracciones, solo se decidió utilizar la fracción región control II para el análisis de RFLP debido a que los iniciadores propuestos para la fracción NADH1 fueron inespecíficos en la mayoría de las muestras, los genes 16s ARNr y 12s ARNr son muy conservativos y la fracción región control III (176 pb) es una parte muy pequeña de la región control II.

De 21 enzimas de restricción que se probaron, solo once enzimas digirieron exitosamente la fracción región control II (551 pb). Sin embargo para el análisis de RFLP solo se emplearon siete debido a que la enzima *Hind III* reconocía el mismo sitio de corte de la enzima *Alu I* y por que las enzimas: *Mse I*, *Nsi I* y *Sau 3AI*, no estuvieron disponibles.

Los patrones de corte observados en la región control II con las enzimas de restricción: *EcoR I*, *Sau 96I*, *Taq I*, y *Xmn I*, fueron monomórficos en todos los especímenes. Con tres enzimas de restricción: *Alu I*, *Fok I* y *Xba I* se presentó más de un patrón de corte, aunque en muy pocos especímenes (Fig. 10).

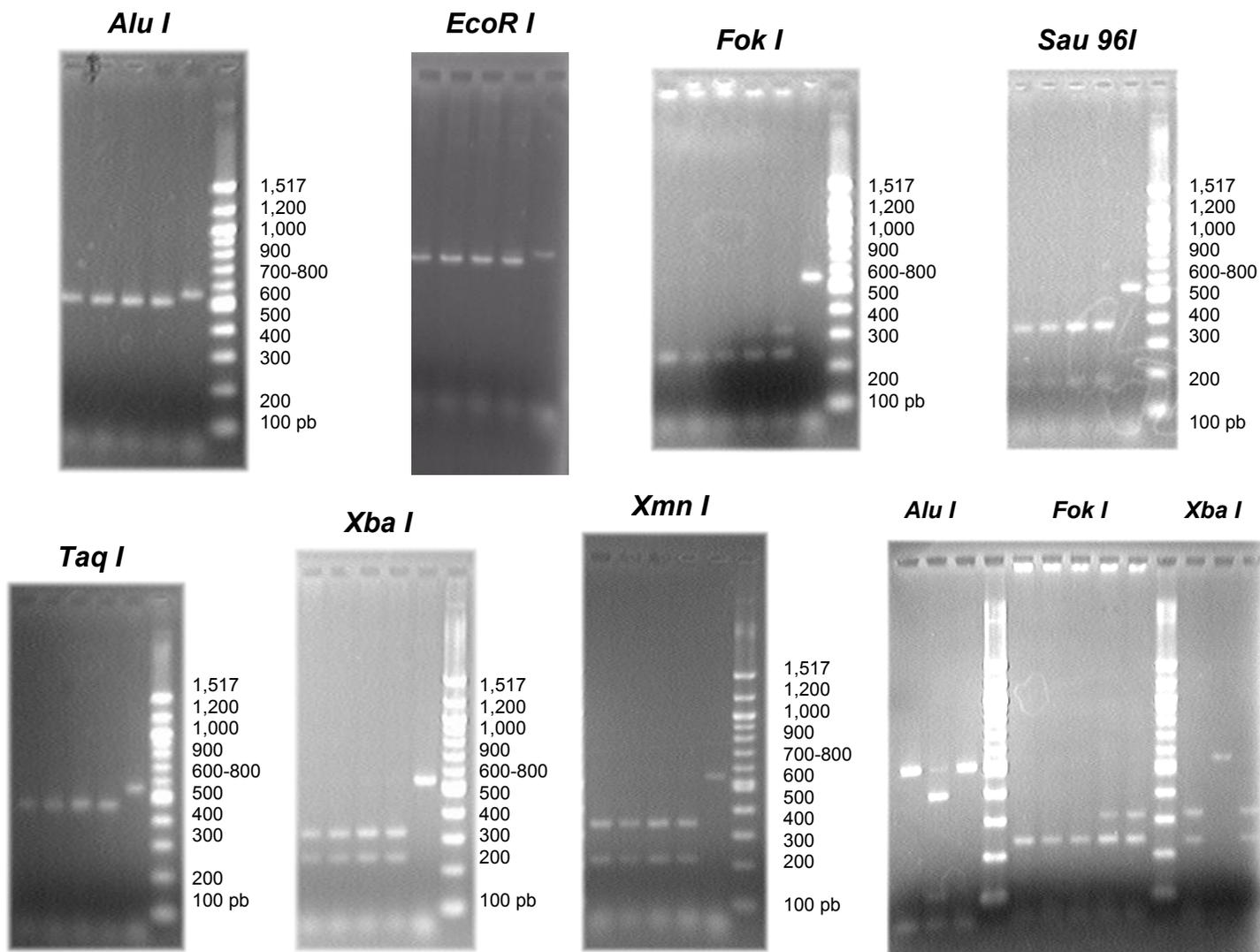


Figura 10. Patrones de corte de la región control II con las enzimas de restricción. Los primeros pozos de izquierda a derecha, corresponden a los productos de PCR digeridos con la enzima, el penúltimo pozo corresponde a un producto no digerido y el último pozo corresponde a un marcador de tamaño conocido.

Los haplotipos obtenidos para cada una de las siete enzimas que digirieron la región control II se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9. Haplotipos obtenidos a partir de la digestión de la región control II (551 pb) de *Engraulis mordax* con siete enzimas. Las letras A y B representan un haplotipo o patrón de corte para cada enzima. Las cantidades representan el tamaño (en pares de bases) de los fragmentos generados por los cortes.

<i>Alu I</i>		<i>EcoR I</i>	<i>Fok I</i>	
A	B	A	A	B
500	400	500	240	311
51	100	51	240	240
	51		71	
551	551	551	551	551

<i>Sau 96I</i>	<i>Taq I</i>	<i>Xba I</i>		<i>Xmn I</i>
A	A	A	B	A
380	490	315	551	341
171	61	236		210
551	551	551	551	551

Tabla 10. Frecuencia de haplotipos compuestos de la región control II obtenidos con siete enzimas de restricción (letras mayúsculas), en el siguiente orden: *Alu I*, *EcoR I*, *Fok I*, *Sau 96I*, *Taq I*, *Xba I* y *Xmn I*.

	Haplotipos Compuestos	Número de cada haplotipo en la muestra
1	AAAAAAA	37
2	BAAAAAA	1
3	AABAAAA	2
4	AAAAABA	1
		41

Como se puede apreciar en la Tabla 10, se identificaron cuatro haplotipos compuestos en la región control II de los adultos de anchoveta provenientes de la región central del Golfo de California.

7.8 Estimadores de diversidad genética

La diversidad de haplotipos encontrada en la fracción de la región control II fue muy baja en la muestra de adultos de *E. mordax*.

$$h = 0.1866 (+/- 0.0804)$$

El polimorfismo nucleotídico y la diversidad nucleotídica de igual forma fueron muy bajos

$$\theta = 0.02003 (+/- 0.01301)$$

$$\pi = 0.005505 (+/- 0.007883)$$

Estos resultados indican que la mayoría de los especímenes comparten un haplotipo compuesto común, el número de sustituciones en sitios nucleotídicos es muy bajo y la proporción promedio de diferencias nucleotídicas entre todos los posibles pares de secuencias en la muestra es muy baja.

8. DISCUSIÓN

Las colecciones de plancton, provenientes de cruceros oceanográficos de investigación, representan una reserva importante de información. Con especímenes de estas colecciones podrían realizarse estudios dirigidos a responder preguntas fundamentales acerca de evolución, filogenia y estructura genética poblacional (Chase *et al.*, 1998).

Aún existe controversia sobre sí el ADN de estos especímenes puede ser extraído y amplificado. Como bien se sabe la técnica de fijación tradicionalmente utilizada en muestras de ictioplancton emplea formalina (4%) neutralizada con borato de sodio. Por un lado se ha asumido que los efectos de la fijación en formalina deja inservibles a los especímenes para los análisis de ADN (France y Kocher 1996), y por otro la investigación en el campo de la medicina ha demostrado que el análisis genético de tejidos fijados en formalina es posible. Ante esta última aseveración, se exploró la posibilidad de extraer y amplificar exitosamente ADN de larvas de *Engraulis mordax* provenientes de un crucero oceanográfico.

Los resultados obtenidos de las extracciones de ADN de larvas de *E. mordax* preservadas en formalina, reflejan en primera instancia las limitaciones de este tipo de preservación para estudios genéticos.

A nivel molecular, el ADN en los organismos vivos se encuentra empaquetado en los cromosomas, en una estructura compacta con la ayuda de proteínas especializadas, histonas y proteínas cromosomales. Las histonas son las principales proteínas estructurales de los cromosomas eucarióticos y están cargadas positivamente por aminoácidos. La carga positiva les ayuda a tener enlaces estrechos con el ADN el cual esta cargado negativamente, de tal forma que la doble hélice de ADN enrolla a las histonas muchas veces en una estructura compacta (Ren *et al.*, 2000). Al fijar tejidos vivos en formalina, ésta penetra el tejido y causa el ligamiento cruzado de todas las proteínas en los cromosomas (Ren *et al.*, 2000). El ligamiento cruzado, se piensa, ocurre cuando los electrones no apareados del átomo de oxígeno del formaldehído (CH_2O)

forman enlaces de hidrógeno y reaccionan con las aminas primarias (-NH₂) (France y Kocher, 1996). Entre más prolongado sea el tiempo de fijación viene a ser más fuerte el ligamiento cruzado. La formalina entonces causa una matriz estable y tensa de tejido, preserva la estructura celular entera y previene que la doble hélice del ADN se libere del complejo (Chaw *et al.*, 1980; Chang y Loew, 1994 en Chatigny, 2000; Ren *et al.*, 2000). Esto físicamente endurece el tejido sin encogerlo o distorsionarlo (Fox *et al.*, 1985 en Chatigny, 2000); sin embargo la estructura molecular es alterada.

8.1 Extracción de ADN de larvas de *E. mordax*

Las técnicas de extracción propuestas por Shiozawa *et al.* (1992), “Dneasy tissue Kit” (QIAGEN), Chase *et al.* (1998) y la técnica de hidratación realizada a 4 °C (Camarena-Rosales), fueron las técnicas con las cuales se extrajo ADN de larvas fijadas y preservadas en formalina. Sin embargo las extracciones obtenidas con éstas técnicas mostraron un ADN muy fragmentado. Este resultado en primera estancia nos dice que el ligamiento cruzado no inhibe los procedimientos de extracción de ADN.

Los resultados obtenidos con las técnicas anteriormente mencionadas, se atribuyen principalmente a cuatro puntos que comparten en común: 1) eliminación de remanentes de formalina antes de la digestión para proteger la efectividad de la proteólisis (Shedlock *et al.*, 1996), 2) el uso de proteinasa-K de la compañía QIAGEN con la que se llevó a cabo la proteólisis completa y se aseguró la liberación de los ácidos nucleicos, 3) disminución en la pérdida de ADN durante la purificación orgánica (Chase *et al.*, 1998) y 4) el ADN extraído se resuspendió en volúmenes mínimos de solución amortiguadora para aumentar su concentración.

Con respecto al primer punto, la eliminación de remanentes de formalina se logró por la incubación de las muestras en volúmenes de solución amortiguadora (Shiozawa *et al.*, 1992), lavados previos en solución de PBS (Dneasy Tissue Kit y Chase *et al.*, 1998) ó por hidratación (Camarena-Rosales). Referente al segundo punto, la proteólisis completa se logró por el uso de proteinasa-K de la compañía QIAGEN en las cuatro técnicas. Para el tercer punto, la disminución en la pérdida de ADN durante la purificación orgánica se logró por disminución en los volúmenes de reacción (Shiozawa *et al.*, 1992 y Camarena-Rosales) ó por el uso de una membrana (Dneasy Tissue Kit) en la cual se retienen los ácidos nucleicos.

El punto en el que difieren particularmente las técnicas de Shiozawa *et al.* (1992) y Camarena-Rosales en comparación al uso de “Dneasy Tissue Kit” y Chase *et al.* (1998), es en la purificación. En las primeras se realizó con fenol-cloroformo y en las últimas mediante filtración con una membrana.

De manera particular, los resultados obtenidos con la técnica propuesta por Shiozawa *et al.* (1992) también se atribuyen a una digestión prolongada de varios días (Crisan y Matson, 1993 en France y Kocher, 1996), con cantidades adicionales de proteinasa-K.

El peculiar resultado de un ADN de elevado peso molecular obtenido con la técnica de Camarena-Rosales, realizada a temperatura ambiente, fue inusitado debido a que ningún trabajo ha reportado tales resultados. El origen de este ADN de elevado peso molecular se explica con los resultados de la amplificación y secuenciación subsecuentes, mismos que se detallan en la sección 8.2.

Con las técnicas restantes no se logró la extracción de ADN de larvas de *E. mordax*, a pesar de que algunas técnicas de extracción contemplan puntos muy importantes para lograr la extracción de ADN de tejidos fijados en formalina. Por mencionar algunos de estos puntos, con la técnica propuesta por Shedlock *et al.* (1996) se propone: 1) la incubación de las muestras en solución amortiguadora de pre-digestión con glicina para mejorar la extracción por acción de grupos aminos primarios y 2) el empleo de ditiotreitól

(DTT) durante la digestión para cortar enlaces ADN-proteína y así liberar a los ácidos nucleicos de los complejos formados por el ligamiento cruzado.

Los resultados negativos obtenidos con las técnicas de extracción propuestas por Taggart *et al.* (1992), Heller *et al.* (1992), Jones y Avise (1997) y Coombs *et al.* (1999) demuestran que la extracción no funciona sin un método previo y eficaz para la eliminación de remanentes de formalina. Los resultados obtenidos con éstas técnicas pueden explicarse por la poca o nula acción de la proteinasa-K. Según Shedlock *et al.* (1996) la proteólisis es enormemente inhibida en presencia de formalina, debido a que daña a la proteinasa-K.

Particularmente las técnicas propuestas por Heller *et al.* (1992) y Jones y Avise (1997) emplean periodos breves de digestión (15 y 30 min, respectivamente). Heller *et al.* (1992) emplea el método más rápido para la proteólisis (sonicación), que cualquier otra técnica. Si bien con estas dos técnicas el tiempo empleado para la extracción es menor en comparación a las otras, también se dio menor tiempo de acción de la proteinasa-K. El tiempo de acción de la proteinasa-K puede ser un factor muy importante si se considera la naturaleza insoluble de las proteínas fijadas en formalina (Shedlock *et al.*, 1996).

Otro factor importante es el método de purificación. En las técnicas propuestas por Heller *et al.* (1992) y Jones y Avise (1997), no se maneja un método de purificación (fenol-cloroformo) como tal. En la técnica propuesta por Coombs *et al.* (1999) se emplea la purificación con Chelex, posterior a la proteólisis. Sí en estas tres últimas técnicas se logró la proteólisis completa, debido a la ausencia de un método de purificación ó a la utilización de un método poco eficiente, el ADN extraído pudo ser de muy baja calidad. Según Ren *et al.* (2000), los remanentes de cualquier proteína de los cromosomas disminuyen severamente la calidad del ADN extraído.

Los resultados de la extracción obtenidos con la técnica propuesta por Eckerman *et al.* (1997) demostraron que la utilización de Chelex para la extracción no funcionó debido a

la ausencia de proteólisis, evitándose de esta manera la liberación del ADN previa a la acción del Chelex.

8.2 Amplificación de ADN extraído de larvas

El ADN extraído con las técnicas: Shiozawa *et al.* (1992), Dneasy Tissue Kit, Chase *et al.* (1998) y Camarena -Rosales (realizada a temperatura de 4 °C), se intentó amplificar con iniciadores estandarizados previamente con ADN extraído de adultos. Sin embargo, no se logró la amplificación de ADN mitocondrial de larvas de *E. mordax*. Estos resultados demostraron que la eficiencia de la amplificación se ve reducida por la fijación del tejido en formalina (Greer *et al.*, 1991 en Malmgren *et al.*, 1992) y que en muestras fijadas en formalina es difícil amplificar una fracción con iniciadores que trabajan muy bien en muestras frescas o congeladas (France y Kocher, 1996).

Primeramente se intentó amplificar el ADN extraído de larvas con iniciadores que amplificaban fragmentos de 551, 618 y 1,930 pb. Con estos iniciadores no se obtuvieron amplificaciones. Estos resultados en un principio se atribuyeron al hecho de que la doble hélice de ADN se encontraba rota en fragmentos muy pequeños y que los iniciadores utilizados amplificaban fragmentos mayores. De acuerdo con Shedlock *et al.* (1996), cuando se usa ADN extraído de tejido fijado en formalina, los fragmentos amplificados típicamente son de bajo peso molecular (100 – 200 pb). Algunos trabajos realizados con muestras fijadas en formalina han reportado éxito en la amplificación de fragmentos mitocondriales de 120 pb (Shiozawa *et al.*, 1992), 196 pb (Chase *et al.*, 1998) y 242 pb (Malmgren *et al.*, 1992). El estudio realizado por France y Kocher (1996), reportó la amplificación de fragmentos que oscilan entre 167 y 523 pb. Este último también reportó una marcada disminución en el porcentaje de muestras amplificadas a medida que el tamaño del fragmento amplificado era mayor.

Algunos autores como Ren *et al.* (2000) han recomendado, para muestras fijadas en formalina, utilizar un nuevo juego de iniciadores diseñados para amplificar un fragmento tan pequeño como 120 pb.

Ante tal recomendación, nuevamente se intentó amplificar el ADN extraído de larvas con iniciadores que amplificaban fragmentos de 176 y 431 pb. Con estos nuevos iniciadores tampoco se obtuvieron amplificaciones.

Estos resultados demostraron que, siguiendo los protocolos de extracción y amplificación mencionados en éste trabajo, la posibilidad de amplificar exitosamente ADN de larvas de *E. mordax* preservadas en formalina definitivamente es poco probable. Así mismo estos resultados pueden explicarse por el proceso curatorial al cual fueron sometidas las muestras. Este proceso curatorial consistió en la fijación y preservación de las larvas de *E. mordax* en formalina por un periodo de tres años. En todos los estudios en donde se logró la amplificación de ADN a partir de tejido sometido a formalina, las muestras siguieron otro proceso curatorial. Las muestras fueron fijadas en formalina (4 - 10%) por periodo de 24 h (en algunos casos 48 h) y posteriormente transferidas a alcohol (70 – 80%) para ser almacenadas (Shiozawa *et al.*, 1992, France y Kocher, 1996, Shedlock *et al.*, 1996, *et al.*, 1997, Wirgin *et al.*, 1997).

Los resultados obtenidos con larvas de *E. mordax* concuerdan con los reportados por France y Kocher (1996), quienes de igual forma, no amplificaron ADN extraído de especímenes que no fueron transferidos fuera de la formalina (con permanencia en ésta última de varios meses o años).

Algunos investigadores como Malmgren *et al.* (1992), incluso demostraron que para la asignación de genotipos de manera confiable podían utilizarse amplificaciones obtenidas de tejidos fijados en formalina por periodos menores a 24 h. Después de las 24 h de haber sometido un tejido a formalina, el producto de la amplificación disminuía dramáticamente y después de las 48 hrs ya no obtenían amplificaciones.

A pesar de que se ha señalado que la principal causa de los resultados obtenidos con las larvas de *E. mordax*, es la preservación por varios años en formalina, aún permanece incompleto el entendimiento de las interacciones de la formalina con el ADN. Se mencionó al principio de esta discusión que la fijación en formalina causa el ligamiento cruzado ADN–proteínas. Si la fijación es por un periodo prolongado la doble hélice del ADN se puede romper debido al fuerte efecto de ligamiento cruzado (Ren *et al.*, 2000). Si esto es cierto, el ligamiento cruzado podría ser la explicación de los resultados obtenidos con larvas de *E. mordax*, un ADN tan fragmentado que fue imposible de amplificar. Por otro lado también se mencionó que durante el ligamiento cruzado se formaban enlaces ADN-proteínas. Si durante la extracción de ADN tales enlaces no son eliminados en su totalidad, la amplificación se vería afectada. La existencia de cualquier remanente de proteínas disminuye en gran medida tanto la calidad como la cantidad del ADN a amplificar (Ren *et al.*, 2000). Esta sería otra posible explicación del por que no se logró la amplificación.

En el caso particular del fragmento amplificado a partir de ADN de larvas extraído con la técnica de Camarena-Rosales (realizada a temperatura ambiente), los resultados: 1) extracción de ADN de elevado peso molecular de tejido preservado en formalina (nunca antes reportado), 2) amplificación de un fragmento (650 pb) que no correspondía al esperado con los iniciadores 16s ARNr y 3) valores elevados de similitud de la secuencia obtenida con las correspondientes a bacterias, comprobaron la existencia de contaminación y proliferación bacteriana durante el proceso de hidratación realizado a temperatura ambiente. Esta misma técnica realizada a temperatura de 4 °C no produjo un ADN de elevado peso molecular en la extracción, pero si presentó el mismo producto de amplificación al utilizarse los mismos iniciadores. Estos resultados establecen que la técnica de hidratación es susceptible a contaminación bacteriana, aún cuando se realice a temperatura de 4 °C.

8.3 Extracción de ADN de adultos de *E. mordax*

El resultado general de la extracción de ADN genómico fragmentado, obtenido en adultos, puede explicarse por el método de preservación empleado al momento de la obtención de la muestra. Una vez capturados los especímenes adultos de *E. mordax*, estos fueron congelados por varios días antes de ser transferidos a etanol (70%). Durante este lapso de tiempo muy probablemente ocurrió la degradación parcial del ADN, misma que se atribuye a la acción de las enzimas y a las condiciones físicas (temperatura). Algunas de las formas de preservar el tejido y evitar la degradación del ADN son: congelándolo a muy bajas temperaturas (-80 °C) ó fijándolo en etanol (70%), inmediatamente después de obtener la muestra. Lo que se esperaría de un espécimen adecuadamente preservado, al momento de la extracción, es un ADN íntegro y de elevado peso molecular.

8.4 Amplificación de ADN de adultos de *E. mordax*

A pesar de la poca integridad de los extractos de ADN obtenidos en adultos, éstos sirvieron para la amplificación de tres fracciones de ADN mitocondrial de *E. mordax*, poniendo en claro que dichas extracciones son de mejor calidad a las obtenidas con larvas. Los resultados obtenidos en el presente estudio son similares a los obtenidos por Shiozawa *et al.* (1992), quienes observaron que las extracciones obtenidas de las muestras preservadas en alcohol etílico son superiores a las obtenidas de muestras preservadas en formalina. La comparación de los resultados obtenidos en adultos vs larvas resalta el efecto del fijador empleado. El etanol pertenece a los fijadores precipitadores. Estos fijadores preservan las sustancias celulares y moleculares, aunque la morfología se preserva en menor grado (Ren *et al.*, 2000).

8.5 Secuencias

Los valores elevados de similitud obtenidos entre las fracciones amplificadas de *E. mordax* (NADH1, 16s ARNr y región control II) y sus correspondientes fracciones reportadas para otros engráulidos (*E. japonicus* y *E. ringens*) comprobaron la identidad de las fracciones reportadas y descartaron la posibilidad de amplificaciones falsas por contaminación ó artificios del PCR.

8.6 Diversidad genética

El análisis de RFLP realizado en adultos de *E. mordax*, reveló a través de los estimadores empleados (h , θ y π) una diversidad genética baja. Tal resultado contrasta fuertemente con los obtenidos en otros estudios de peces y no se atribuye a la fracción, región control, de ADN mitocondrial utilizada. En otras especies de peces los valores de diversidad haplotípica, obtenidos a través de análisis RFLP de la misma región mitocondrial, son mucho mayores. En el marlin rayado se reportó una diversidad haplotípica de 0.82 (Graves y McDowell, 1994 en Tabata y Mizuta, 1997), en el atún aleta azul de 0.975 (Okamoto *et al.*, 1994 en Tabata y Mizuta, 1997), en el pez espada de 0.92-0.95 (Chou, 1994 en Tabata y Mizuta, 1997) y en *Pagrus major* de 0.892 (Tabata y Mizuta, 1997). Estos valores demuestran la alta variabilidad de la fracción región control dentro del ADN mitocondrial.

En otros trabajos con peces en donde se ha reportado una diversidad total muy alta, en algunos de sus sitios de muestreo existen valores de diversidad muy bajos. El trabajo realizado con secuencias de la región control del lenguado (*Solea vulgaris*), mostró en una de sus estaciones de muestreo el nivel más bajo de diversidad, un valor de diversidad de haplotipos de 0.271 (Guarniero *et al.*, 2002). Este valor, similar al obtenido en el presente estudio a través de RFLP, nos indica mediante un análisis más sensitivo (análisis de secuencias), que aún en la región control se pueden encontrar valores bajos de diversidad.

La baja diversidad genética observada en el presente estudio con solo una muestra de *E. mordax*, proveniente de la región central del Golfo de California, tampoco se puede atribuir al número de especímenes analizados. Estudios similares han analizado menor número de especímenes por estación de muestreo, reportando valores altos de diversidad. En el estudio realizado por Martin *et al.* (1992) emplearon 19 especímenes para su análisis de RFLP de la región control; Guarniero *et al.* (2002) emplearon un promedio de 23 especímenes por muestra para su análisis de secuencias de la misma región mitocondrial; Hauser *et al.* (1998) emplearon un número promedio de 20 especímenes por muestra para el análisis de RFLP de los genes ND5/6 y Bembo *et al.* (1995) emplearon 20 especímenes por muestra para el análisis de RFLP de los mismos genes. En este último estudio se hace la recomendación de emplear tamaños de muestra de 40 – 50 peces, tamaño de muestra similar al que se empleó en el presente estudio (41 especímenes). Además existe el dato de alta diversidad haplotípica para *E. mordax* con el análisis de tan solo 14 especímenes provenientes de la costa occidental de Norteamérica (Grant y Bowen, datos no publicados en Grant y Bowen, 1998).

La mayoría de los estudios realizados en pelágicos menores, mediante análisis de RFLP ó secuencias de fracciones mitocondriales, han reportado valores de diversidad haplotípica mayores a los encontrados el presente estudio. En *Sardinops ocellatus*, *S. neopilchardus*, *S. sagax*, *S. caeruleus* y *S. melanostictus* se reportaron diversidades haplotípicas de 1.00 (primeras cuatro especies) y 0.96 (última especie) con la fracción región control (Bowen y Grant, 1997 en Grant y Bowen, 1998), en *Limnothrissa miodon* se reportó una diversidad de 0.931 con la fracción NADH5/6 (Hauser *et al.*, 1998), en *Engraulis encrasicolus* se han reportado diversidades de 0.75 (Magoulas *et al.*, 1996 en Grant y Bowen, 1998), 0.88 (Bembo *et al.*, 1995), y 0.94 (Grant y Bowen, datos no publicados en Grant y Bowen, 1998) al analizar la molécula entera de ADN mitocondrial, fracción NADH5/6 y fracción citocromo b respectivamente; en *E. japonicus*, *E. australis* y en *E. mordax* (costa occidental de Norteamérica) se reportaron diversidades de 0.91, 0.90 y 0.88 respectivamente con la fracción citocromo b (Grant y Bowen, datos no publicados en Grant y Bowen, 1998).

En contraparte, han sido pocos los estudios realizados en pelágicos menores que han reportado una diversidad haplotípica baja. En *Sardina pilchardus*, se han reportado diversidades haplotípicas de 0.36 (Grant *et al.*, en prensa en Grant y Bowen, 1998); y de 0.41 en promedio (Tinti *et al.*, 2002) con la fracción citocromo b; en *Engraulis anchoita*, *E. ringens* y *E. capensis* se reportaron diversidades de 0.44, 0.41 y 0.21 respectivamente con la fracción citocromo b (Grant y Bowen, datos no publicados en Grant y Bowen, 1998).

La baja diversidad genética (h y π) encontrada en el presente estudio es parecida a la reportada para *Sardina pilchardus*, *Engraulis anchoita*, *E. ringens* y *E. capensis*. En estas especies, al igual que en *E. mordax* del presente estudio, tal diversidad es caracterizada por niveles de diversidad nucleotídica (π) de bajos a moderados y filogenias en forma de estrella; consistiendo de un haplotipo común compartido por la mayoría de las muestras y pocos haplotipos variantes distinguidos por mutaciones (Grant y Bowen 1998; Tinti *et al.*, 2002). De acuerdo con Grant y Bowen (1998), las características anteriormente mencionadas, indican que está implícita la dinámica poblacional dentro de la región, incluyendo severas fluctuaciones poblacionales, fuerte selección natural sobre haplotipos ó extinciones y recolonizaciones sobre una escala local (estructura metapoblacional dentro de la región). Estos eventos se encuentran evidenciados por marcadas fluctuaciones en abundancia de huevos y larvas de *E. mordax*, a través de varios años, en la región central del Golfo de California (Green-Ruiz y Hinojosa-Corona, 1997; Sánchez-Velasco *et al.*, 2000).

La dinámica poblacional asociada al clima puede ayudar a entender los bajos niveles de diversidad genética. Los cambios climáticos y oceanográficos que producen cambios rápidos en la temperatura superficial de amplias regiones y en las intensidades de surgencias, influyen directamente sobre la abundancia del zooplancton en áreas de crianza larvaria y regulan la abundancia de la biomasa desovante. Durante las fluctuaciones de abundancia zooplantónica las poblaciones adultas presentarán declives; es bien sabido que todas las poblaciones regionales de sardinias y anchovetas tienen historias similares de declives y recuperaciones parciales (Lluch-Belda *et al.* 1989 en

Grant y Bowen 1998). En poblaciones en declive existirá una fuerte selección natural sobre los haplotipos y se acelerará la pérdida de linajes (Grant y Bowen 1998). Los linajes remanentes posteriormente llevarán a cabo la recuperación de la población y la recolonización de la región.

La baja diversidad genética obtenida en el presente estudio con la única muestra de adultos de *E. mordax* puede atribuirse a un reducido tamaño poblacional efectivo (N_f). El cardumen del cual provino la muestra probablemente es el producto de pocos apareamientos que resultaron exitosos debido a su condición biológica y a que se vieron favorecidos por factores ambientales ó “ventanas de oportunidad” (Hedgecock *et al.*, 1994), desde sus primeras etapas de vida hasta el momento en que fueron capturados. Estos especímenes están indicando la presencia de muy pocos linajes maternos, dentro del cardumen capturado, que fueron producto del azar. Evidencia de tal reclutamiento azaroso en peces marinos viene de la observación de diferencias genéticas entre cardúmenes individuales de anchovetas de California (Hedgecock, 1994 en Grant y Bowen 1998).

De manera peculiar la baja diversidad genética obtenida en la muestra de adultos de *E. mordax*, en el presente estudio, contrasta con los niveles de diversidad genética reportados por Hedgecock *et al.* (1989) y Grant y Bowen (1998). Hedgecock *et al.* (1989), utilizando alozimas, registran niveles substanciales de diversidad genética en *E. mordax* para la Costa Occidental de la Península de Baja California. Grant y Bowen (1998), empleando 14 especímenes para un análisis de secuencias con la fracción citocromo b (521 pb), reportaron una diversidad haplotípica alta ($h=0.88$) para California. Ante tales evidencias existe la posibilidad de que exista un aislamiento reproductivo o ausencia de flujo génico entre las subpoblaciones de *E. mordax* de la Costa Occidental de la Península de Baja California y el Golfo de California. Si bien los estimadores de diversidad genética (h y π) en el presente estudio fueron obtenidos a partir de solo una muestra, los valores de tales estimadores contrastan enormemente con los reportados por Hedgecock *et al.* (1989) y Grant y Bowen (1998).

En otras especies de peces como en la perca rayada (*Morone saxatilis*), la ausencia de un genotipo único del Golfo de México en poblaciones del Atlántico Sureste se atribuyó a un reciente aislamiento reproductivo, asociado a la existencia de una barrera termal que impide la migración de *M. saxatilis* a través del estrecho de Florida (Wirgin *et al.*, 1997). En la chopo verde *Girella nigricans* (Terry *et al.*, 2000) mediante análisis de secuencias de la región control (344 pb), se demostró el aislamiento entre poblaciones de la Costa Occidental de la Península de Baja California y el Golfo de California. El flujo genético entre las dos regiones a través de Cabo San Lucas, fue extremadamente bajo. Este aislamiento se atribuyó al importante papel que pueden jugar las corrientes y barreras oceanográficas sobre la dispersión de esta especie, y en consecuencia sobre sus niveles de flujo genético. Terry *et al.* (2000), plantearon dos posibles escenarios para explicar el origen de la disyunción poblacional (Costa del Pacífico-Golfo):

(1) Brusca (1973) en (Terry *et al.*, 2000) propuso que esta disyunción se debió al calentamiento postglacial de las aguas que rodeaban la punta de la península, lo cual restringió el movimiento de especies de peces “templadas” a aguas más al norte. Los eventos glaciales pudieron resultar en múltiples invasiones y separaciones en el Golfo de California por la accesibilidad a rodear la región de Cabo San Lucas cuando la temperatura del agua fue muy fría. Esta hipótesis puede predecir una separación entre poblaciones de aproximadamente de 10,000 años.

(2) Durham y Alison (1960) en (Terry *et al.*, 2000) propusieron que hace aproximadamente 1 millón de años la península de Baja California estaba restringida a una pequeña área en el norte y la región sur de Baja California estaba compuesta por varias Islas. Especies templadas de peces pudieron haberse movido libremente dentro y fuera del área que ahora es el Golfo de California, hasta que las rutas marinas a través de la Península de Baja California se cerraron. Esta última hipótesis es la más aceptada por Terry y colaboradores, por que la tasa de mutación del ADN mitocondrial concuerda más (en cuanto al tiempo) con una divergencia temprana entre estas dos regiones que con la hipótesis de un periodo glacial.

Cabe señalar que las diferencias encontradas entre la diversidad genética del presente estudio y las reportadas por Hedgecock *et al.* (1989) y Grant y Bowen (1998), también

podrían atribuirse a la estructura genética de la población de *Engraulis mordax*, a lo largo de su amplia distribución geográfica. En la anchoveta europea *E. encrasicolus* ha sido reportada una considerable estructuración genética que ha sido atribuida a la existencia de barreras hidrográficas y geológicas que restringen la migración, particularmente en la cuenca Este del Mediterráneo (Bembo *et al.*, 1995, 1996a, 1996b; Magoulas *et al.*, 1996 en Hon-Tsen *et al.*, 2002). Sin embargo en cualquiera de los estudios realizados por los autores anteriormente citados, los datos no dan soporte a la restricción severa de flujo genético, aún cuando se han identificado diferentes stocks en el Mar Adriático (Bembo *et al.*, 1996a en Hon-Tsen *et al.*, 2002). También existe un estudio con tres grupos de desove de *E. encrasicolus* en el Noroeste del Mediterráneo que indica una estructura panmíctica, probablemente debida a la influencia de fuerte flujo genético (Tudela *et al.*, 1999 en Hon-Tsen *et al.*, 2002). Al parecer probablemente las barreras geográficas y características hidrológicas en áreas que abarcan los grupos desovantes pueden jugar un papel clave en la estructuración de la población (Hon-Tsen *et al.*, 2002).

La limitación de este trabajo a una sola muestra de *E. mordax* de uno de los extremos de la distribución total no permite hacer mayores inferencias al respecto.

9. CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos con las técnicas de extracción de ADN a partir de larvas de *E. mordax*, probadas en el presente estudio, indican que a pesar de que estas técnicas han dado buenos resultados con especímenes fijados en formalina (24 - 48 h) y preservados en alcohol, no contemplan el efecto de preservación de un tejido en formalina a largo plazo.
2. Los resultados obtenidos en la amplificación de ADN extraído de larvas de *E. mordax*, plantean dos posibles causas: 1) la presencia de ADN extraído muy fragmentado por efecto de fuerte ligamiento cruzado ó 2) la existencia de remanentes de proteínas aún después del proceso de purificación.
3. Los resultados obtenidos con la técnica de hidratación (Camarena-Rosales) indican que la técnica es susceptible a contaminación bacteriana.
4. Los resultados obtenidos en la extracción y amplificación de ADN de adultos de *E. mordax*, resaltan el efecto del fijador empleado sobre los especímenes e indican que las extracciones obtenidas de las muestras preservadas en alcohol etílico son mejores a las obtenidas de muestras preservadas en formalina.
5. Las secuencias de ADN mitocondrial reportadas para adultos de *E. mordax*, son una herramienta útil que permiten la identificación de la especie, a partir de una muestra de tejido.
6. En estudios genético-poblacionales de *E. mordax* del Golfo de California, mediante el análisis de RFLP de la región control, las enzimas *Alu I*, *Fok I* y *Xba I* pueden considerarse diagnósticas debido al polimorfismo que despliegan.
7. Los estimadores derivados del análisis de RFLP de la muestra de adultos de *E. mordax*, provenientes de la región central del Golfo de California, indican unos de los

valores más bajos de diversidad genética tanto para la especie como para la fracción mitocondrial “región control” en comparación a otras especies de peces.

8. La baja diversidad genética encontrada en la muestra de adultos de *E. mordax* provenientes de la región central del Golfo de California, puede atribuirse a un reducido tamaño poblacional efectivo (N_f).

10. RECOMENDACIONES

1. Para trabajar directamente con el genoma de una especie, se recomienda utilizar especímenes recién capturados, congelados a muy bajas temperaturas (-80 °C) ó fijados y preservados en etanol (70%).
2. Para estudios de genética poblacional en larvas de peces provenientes de cruceros oceanográficos se recomienda la modificación del proceso curatorial tradicionalmente empleado. Una propuesta sería fijar las larvas de peces en formalina neutralizada (4%) y posteriormente preservarlas en etanol (70%).
3. Se recomienda evaluar el tiempo máximo de fijación en formalina después del cual los especímenes aún pueden ser utilizados para análisis molecular.
4. Se recomienda la realización de un estudio con este mismo marcador genético (ADN mitocondrial) que contemple una red de estaciones de muestreo a lo largo de la costa Occidental de la Península de Baja California así como dentro del Golfo de California, para establecer la estructura genético-poblacional de la especie en el Pacífico Nororiental de México.
5. En estudios posteriores de genética poblacional de *E. mordax* mediante análisis de la región control, se recomienda el uso de los iniciadores diseñados en este estudio bajo las condiciones termocíclicas establecidas.
6. En estudios posteriores de genética poblacional de *E. mordax* mediante RFLP de la región control, se recomienda el empleo de las enzimas *Alu I*, *Fok I* y *Xba I*, como enzimas diagnósticas.

LITERATURA CITADA

- Badan-Dangon, A., Koblinsky, C.J., Baumgartner, T. 1985. Spring and summer in the Gulf of California: Observations of surface thermal pattern. *Oceanology Acta* 8: 13-22.
- Bembo, D., Carvalho, G., Snow, M., Cingolani, N., Pitcher, T. 1996. Stock discrimination among European anchovies, *Engraulis encrasicolus*, by means of PCR–amplified mitochondrial DNA analysis. *Fishery Bulletin* 94: 31 – 40.
- Chase, M.R., Etter, R.J., Rex, M.A., Quattro J.M. 1998. Extraction and amplification of mitochondrial DNA from formalin-fixed deep-sea mollusks. *BioTechniques* 24: 243-247.
- Chatigny, E. M. 2000. The extraction of DNA from formalin-fixed, ethanol-preserved reptile and amphibian tissues. *Herpetological Review* 31: 86 – 87.
- Coombs, J.N., Gough, C.A., Primrose, J.N. 1999. Optimization of ADN and ARN extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Research* 27: e12.
- Cotero-Altamirano, E. 2000. Dinámica de la población de la anchoveta *Engraulis mordax* del Golfo de California. Tesis de Doctorado. CICESE. México. 121 p.
- Cronin, A.M., Spearman, J.W., Wilmot, R. L. 1993. Mitochondrial DNA variation in Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) and chum salmon (*O. keta*) detected by restriction enzyme analysis of polymerase chain reaction (PCR) products. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50: 708 –715.
- Darbre, P.D. 1999. *Basic Molecular Biology*. John Wiley & Sons. U.S.A. 193 p.
- Díaz–Jaimes, P., Uribe–Alcocer, M., Ayala–Duval, E. 1999. Variación electroforética entre las poblaciones Central y Sureña de la Anchoveta *Engraulis mordax* Girard 1854 (ENGRAULIDAE, PISCES) de Baja California, México. *Ciencias Marinas* 25: 579–595.
- Eckerman, C.M., Walsh E.J. 1997. Breaking the formalin barrier: Development of molecular techniques for genetics analysis of museum specimens. http://www.public.iastate.edu/~curteck/formalin/Eckerman_et_al.htm.

- Escudero–Díaz, M. 1984. Estudio de la pesquería de la anchoveta (*Engraulis mordax*) en aguas mexicanas. Tesis de maestría en ciencias. UNAM. México. 93 p.
- Ferguson, M., Danzmann, R. 1998. Role of genetic markers in fisheries and aquaculture: useful tools or stamp collecting?. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55: 1553–1563.
- France, S.C., Kocher, T.D. 1996. DNA sequencing of formalin-fixed crustaceans from archival research collections. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 5: 304-313.
- Grant, S. W., Bowen B. W. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from Sardines and Anchovies and lessons for conservation. *The American Genetic Association* 89: 415-426.
- García-Franco, W., Sánchez-Ruiz, F. 2002. Análisis de la pesquería de pelágicos menores para la Costa Occidental de B.C., durante la temporada del 2001. INP-SAGARPA.
- Green–Ruiz, Y., Hinojosa–Corona, A. 1997. Study of spawning area of the Northern anchovy in the Gulf of California from 1990 to 1994, using satellite images of sea surface temperatures. *Journal of Plankton Research* 8: 957–968.
- Gross, R., Kühn, R., Baars, M., Schröder., Stein, H., Rottmann, O. 2001. Genetic differentiation of European grayling populations across the Main, Danube and Elbe drainages in Bavaria. *Journal of Fish Biology* 58: 264-280.
- Guarniero, I., Franzellitti, S., Ungaro, N., Tommasini, C., Piccinetti, C, Tinti, F. 2002. Control region haplotype variation in the central Mediterranean common sole indicates geographical isolation and population structuring in Italian stocks. *Journal of Fish Biology* 60: 1459 – 1474.
- Hammann, M. G., Baumgartner, R.T., Badan-Dangon, A. 1988. Coupling of the pacific sardine (*Sardinops sagax caerulea*) life cycle with the Gulf of California pelagic environment. *CalCOFI Reports* 29: 102 – 109.
- Hammann, M. G., Cisneros, M.A. 1989. Range extension and commercial capture of the northern anchovy, *Engraulis mordax* Girard, in the Gulf of California, México. *California Fish and Game* 75: 49-53.

- Hansen, M., Loeschcke, V. 1996. Genetic differentiation among danish brown trout populations, as detected by RFLP analysis of PCR amplified mitochondrial DNA segments. *Journal of Fish Biology* 48: 422–436.
- Hartl, D. L., Clark, G.C. 1997. *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates. Third Edition. Canada. 542 p.
- Hauser, L., Carvalho, G.R., Pitcher, T.J. 1998. Genetic population structure in the lake Tanganyika sardine *Limnothrissa miodon*. *Journal of Fish Biology* 53 (Supplement A): 413-429.
- Hedgecock, D., Hutchinson, E., Li, G., Frederick, L., Sly, Nelson, K. 1989. Genetic and morphometric variation in the pacific sardine, *Sardinops sagax caerulea*: comparisons and contrasts with historical data and with variability in the Northern Anchovy, *Engraulis mordax*. *Fishery Bulletin* 7: 653 – 671.
- Hedgecock, D. 1994. Temporal and spatial genetic structure of marine animal populations in the California current. *CalCOFI Reports* 35: 73–81.
- Hedgecock, D., Hutchinson, E., Li, G., Sly, F., Nelson, K. 1994. The central stock of northern anchovy (*Engraulis mordax*) is not a randomly mating population. *CalCOFI Reports* 35: 125 – 136.
- Heller, J.M., Robinson, A. R., Bugart, J. L., TenEyck, J. C., Wilke, W.W. 1992. DNA extraction by sonication: A comparison of fresh, frozen, and paraffin-embedded tissues extracted for use in Polymerase Chain Reaction assays. *Modern Pathology*. 5: 203 – 206.
- Holmgren–Urba, D., Baumgartner, T. R. 1993. A 250-year history of pelagic fish abundances from the anaerobic sediments of the central Gulf of California. *CalCOFI Reports* 34: 60 – 68.
- Hon-Tsen Y., Yann-Jium L., Shiao-Wei, H., Tai-Sheng, C. 2002. Genetic analysis of the populations of Japanese Anchovy (Engraulidae: *Engraulis japonicus*) using microsatellite DNA. *Marine Biotechnology* 4: 471-479.
- Inoue, J.G., Miya, M., Tsukamoto, K., Nishida, M. 2001. Complete mitochondrial DNA sequence of the Japanese Anchovy *Engraulis japonicus*. *Fisheries Science* 67: 828-835.

- Jones, A.G., Avise, J.C. 1997. Microsatellite analysis of maternity and the mating system in the Gulf pipefish *Syngnathus scovelli*, a species with male pregnancy and sex-role reversal. *Molecular Ecology* 6: 203-213.
- King, T. L., Spindle, A.P., Eackles, M. S., Lubinski, B. A., Schill, W.B. 2000. Mitochondrial DNA diversity in North American and European Atlantic salmon with emphasis on the Downeast rivers of Maine. *Journal of Fish Biology* 57: 614 – 630.
- Laikre, L., Järvi, T., Johansson, L., Palm, S., Rubin, J-F., Glimäster, C., Landergrens, P., Ryman, N. 2002. Spatial and temporal population structure of sea trout at the Island of Gotland, Sweden, delineated from mitochondrial DNA. *Journal of Fish Biology* 60: 49 – 71.
- Lehman, N.M., Prender, E., Morin, P.A., Crease, T.J., Lynch, M. 1995. A hierarchical molecular phylogeny within the genus *Daphnia*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 4: 395-407.
- Malmgren, C., Gustavsson, I., Hurte I., Saldeen, T., Gyllensten, U. 1992. Reliable typing of DNA amplified from formalin-fixed tissue biopsies. *PCR Methods and Applications* by Cold Spring Harbor Laboratory Press 2: 175 – 176.
- Martin, P. A., Humphreys, R., Palumbi, S. 1992. Population genetic structure of the Armorhead, *Pseudopentaceros wheeleri*, in the North Pacific ocean: application of the polymerase chain reaction to fisheries problems. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 49: 2386 – 2391.
- McPherson, J. M., Møller, S.G. 2000. PCR. Cromwell Press. U.S.A. 276 p.
- Morán, P., Pendás, A., García-Vázquez, E. 1996. Mitochondrial DNA variation in wild and hatchery brown trout (*Salmo trutta* L.) populations from Spain. *Aquaculture* 141: 59–65.
- Moser, G.H. (ed.) (1996) *The Early Stages of Fishes in the California Current Region*, CalCOFI Atlas No. 33, NOAA-NMFS-SFSC. Allen Press, Inc., Lawrence, Kansas.
- Palumbi, S.R., Martin, P.A., Macmillan, W.O., Romano, S., Stice, L., Grabowsky, G. 1991. *The Simple Fool's Guide to PCR*. 2nd ed. University of Hawaii, Honolulu, HI. 47 p.

- Pedrín–Osuna, A., Granados–Gallegos, M., Cota Villavicencio, A. 1992. Tasas de explotación y mortalidad por pesca de la anchoveta norteña (*Engraulis mordax*), para el período de 1974 a 1989. *Ciencias Marinas* 18: 97 - 113.
- Ren, Z.P., Sallstrom, J., Sundstrom, C., Nister, M., Olsson, Y. 2000. Recovering DNA and optimizing PCR conditions from microdissected formalin-fixed and paraffin-embedded materials. *Pathobiology* 68:215 –217.
- Roden, I. G. 1958. Oceanographic and meteorological aspects of the Gulf of California. *Pacific Science*. 1: 21 – 45.
- Rozen, S., Skaletsky, H. J. 2000. Primer 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener, S. (eds.). *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, U.S.A. 365-386 p.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sánchez-Velasco, L., Shirasago, B., Cisneros-Mata, M.A., Avalos-García, C. 2000. Spatial distribution of small pelagic fish larvae in the Gulf of California and its relation to the El Niño 1997-1998. *Journal of Plankton Research* 22: 1-8.
- Shedlock, A. M., Haygood, M.G., Pietsch, T.W., Bentzen, P. 1996. Enhanced DNA extraction and PCR amplification of mitochondrial genes from formalin-fixed museum specimens. *BioTechniques* 22: 394-400.
- Schneider, S., Roessli, D., Excoffier, L. 2000. Arlequin ver. 2.000. A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva Switzerland.
- Shiozawa, D. K., Kudo, J., Evans, R.P., Woodward, S. R., Williams, R. N. 1992. DNA extraction from preserved Trout tissues. *Great Basin Naturalist* 52: 29-34.
- Smith, P.E., Richardson, S.L. 1979. Técnicas modelo para prospección de huevos y larvas de peces pelágicos. FAO. Doc. Tec. Pesca. No. 175. 107 p.
- Tabata, K., Mizuta, A. 1997. RFLP analysis of mtDNA D-loop region in Red Sea Bream *Pagrus major* population from four locations of Western Japan. *Fisheries Science* 63: 211–217.

- Taggart, J.B., Hynes, R.A., Prodhon, P.A., Ferguson, A. 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. *Journal of Fish Biology* 40: 963-965.
- Terry, A., Bucciarelli, G., Bernardi, G. G. 2000. Restricted gene flow and incipient speciation in disjunct Pacific ocean and Sea of Cortez populations of a reef fish species, *Girella nigricans*. *Evolution* 54: 652-659.
- Tessier, N., Bernatchez, L., Presa, P., Angers, B. 1995. Gene diversity analysis of mitochondrial DNA, microsatellites and allozymes in landlocked Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology* 47 (Supplement A): 156 – 163.
- Tinti, F., Di Nunno, C., Guarniero, I., Talenti, M., Tommasini, S., Fabbri, E., Piccinetti C. 2002. Mitochondrial DNA sequence variation suggest the lack of genetic heterogeneity in the Adriatic and Ionian stocks of *Sardina pilchardus*. *Marine Biotechnology* 4: 163 – 172.
- Tudela, S., García-Marín, J.L., Pla, C. 1999. Genetic structure of European anchovy, *Engraulis encrasicolus* L., in the North-west Mediterranean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 234: 95 – 109.
- Vigilant, L., Stoneking, M., Harpending, H., Hawkes, K., Wilson, A.C. 1991. African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science* 253: 1503 – 1507.
- Vrooman, A.M., Paloma, A.P., Zweifel, R.J. 1981. Electrophoretic, morphometric and meristic studies of subpopulations of northern anchovy, *Engraulis mordax*. *California Fish and Game* 67: 39-51.
- Whitehead, J.P. Nelson, G.J., Wongratana, T. 1988. FAO. Species Catalogue. Clupeoid fishes of the world (Suborder Clupeoidei), An annotated and illustrated catalogue of the Herrings, Sardines, Pilchards, Sprats, Shads, Anchovies and Wolf-herrings Part 2. Engraulidae. FAO Fish. Synop. 125 Vol. 7: 305-579 p.
- Wirgin, I., Maceda, L., Stabile, S., Mesing, C. 1997. An evaluation of introgression of Atlantic coast striped bass mitochondrial DNA in a Gulf of Mexico population using formalin-preserved museum collections. *Molecular Ecology* 6: 907-916.

APÉNDICE I



APÉNDICE II

Taggart *et al.* (1992)

Solución amortiguadora TNES-Urea:

Tris-HCl	10 mM (pH 7.5)
NaCl.....	1.5 M
EDTA.2Na	10 mM (pH 7.5)
SDS.....	0.5%
Urea.....	4 M

fenol-cloroformo-isoamilalcohol.....	25:24:1
cloroformo-isoamilalcohol.....	24:1
NaOAC.....	3 M

Solución amortiguadora TE (pH 7.6):

Tris-HCl.....	10 mM
EDTA.....	1 mM

Heller *et al.* (1992):

Solución amortiguadora:

KCl.....	50 mM
Tris-HCl.....	10 mM (pH 8.3)
MgCl ₂	1.5 mM
Tween 20.....	0.5 %

Shedlock *et al.* (1996):

Solución GTE:

Glicina.....	100 mM
Tris-HCl.....	10 mM (pH 8.0)
EDTA.....	1 mM

Solución amortiguadora de extracción:

SDS.....1 %
Tris-HCl.....25 mM (pH 7.5)
EDTA.....100 mM

Dithiothreitol (DTT).....1 M
fenol-cloroformo-isoamilalcohol.....25:24:1
cloroformo-isoamilalcohol.....24:1
NaOAC.....3 M

Solución amortiguadora TE (pH 7.6):

Tris-HCl.....10 mM
EDTA.....1 mM

Eckerman *et al.* (1997):

Chelex.....5%

Jones y Avise (1997):

Solución amortiguadora TNES-Urea:

Tris-HCl10 mM (pH 7.5)
NaCl.....1.5 M
EDTA.2Na10 mM (pH 7.5)
SDS.....0.5%
Urea.....4 M

Shiozawa *et al.* (1992):

Solución amortiguadora TE9 (pH 9.0):

Tris.....500 mM
EDTA.....20 mM
NaCl.....10 mM

SDS.....20%
 fenol-cloroformo-isoamilalcohol.....25:24:1
 cloroformo-isoamilalcohol.....24:1
 NaOAC.....3 M

Solución amortiguadora TE (pH 7.6):

Tris-HCl.....10 mM
 EDTA.....1 mM

DNeasy Tissue Kit:

Solución Stock PBS (100mM)

Na₂HPO₄ (anhidro).....12.2 g
 NaH₂PO₄·H₂O.....2.2 g
 NaCl.....85.0 g
 H₂O.....c.b.p.1 l

PBS 10 mM (pH 7.2)

Solución Stock PBS10 %

Chase *et al.* (1998):

Tris-HCl.....10 mM (pH 8.0)

Coombs *et al.* (1999):

Solución amortiguadora TNES-Urea:

Tris-HCl10 mM (pH 7.5)
 NaCl.....1.5 M
 EDTA.2Na10 mM (pH 7.5)
 SDS.....0.5%
 Urea.....4 M
 Chelex.....5%

Camarena-Rosales (2002) (com. pers.):

Etanol.....	100 %
Etanol.....	80 %
Etanol.....	60.%
Etanol.....	40 %
Etanol.....	20 %

Sambrook *et al.*, 1989:

Bromuro de etidio.....	1X
Sybr-gold.....	1X

GLOSARIO

ENSO. Del ingles El Niño southern Oscillation. El Niño es una corriente cálida que aparece frente a Perú típicamente en la época de navidad y que permanece durante varios meses.

Electroforesis. Es el movimiento de las moléculas – usualmente proteínas ó ácidos nucleicos – a través de un gel en respuesta a un campo eléctrico. Las moléculas de diferentes tamaños y cargas se mueven a diferentes tasas de migración.

Enzima de restricción. Son aquellas enzimas que cortan al ADN en sitios particulares. Cada tipo de enzima de restricción corta a la doble hélice del ADN en todos los sitios en los cuales exista una secuencia particular de nucleótidos llamada **sitio de restricción** de la enzima.

Frente. El término “frente” fue utilizado como fue sugerido por Cromwell y Reid (1956) en Roden (1958); estrecha banda a lo largo de la superficie del océano en la cual la densidad cambia abruptamente. El término “frente de temperatura” y “frente de salinidad” serán utilizados para describir el frente de densidad, el cual solo puede ser determinado adecuadamente a través de las mediciones de temperatura y salinidad.

Haplotipo. Es una combinación única de marcadores genéticos presentes en un cromosoma ó en el ADN mitocondrial.

Iniciadores. Son secuencias de oligonucleótidos que se alinean en la región a ser amplificada. Estos son empleados para la elongación de la cadena por la ADN polimerasa.

Iniciadores universales. Son los iniciadores que amplifican una sección dada de ADN en una amplio intervalo de taxa.

Población. En genética poblacional, la palabra población no usualmente se refiere a la especie entera; esta se refiere en cambio a un grupo de organismos de la misma especie viviendo dentro de un área geográfica suficientemente restringida y cualquier miembro puede potencialmente aparearse con otro miembro. El término población en genética poblacional hace referencia a las poblaciones locales. Algunas veces estas últimas también son referidas como poblaciones mendelianas ó subpoblaciones.

Larva. Estadio que inicia después de la absorción del saco vitelino, diferente en forma y pigmentación a los estadios juvenil ó adulto. Debe existir una transformación o metamorfosis antes de asumir características de juvenil ó adulto.

Reacción en cadena polimerasa (PCR). Proceso que utiliza los componentes básicos de la compleja maquinaria de replicación para hacer copias de fragmentos de ADN. Una molécula de ADN es copiada, en un sistema amortiguador, por una ADN polimerasa que utiliza desoxinucleótidos como bloques de construcción para la nueva hebra. La región del ADN a ser copiada es definida por los iniciadores oligonucleótidos de secuencia específica.

El PCR procede en tres pasos distintos gobernados por la temperatura:

- Primero; Las hebras del ADN son separadas por calor, lo cual causa rompimiento de los enlaces de hidrógeno entre los pares de bases de las hebras de ADN, proceso conocido como **desnaturalización**.
- La siguiente reacción es enfriar hasta la temperatura de **alineamiento** para permitir que los iniciadores oligonucleótidos encuentren sus secuencias complementarias sobre las hebras del ADN.
- Finalmente la reacción es calentada a una temperatura óptima para que la ADN polimerasa comience a adicionar los desoxinucleótidos al grupo 3'-OH de los iniciadores (polimerización), proceso conocido como **extensión**.

Si el PCR es llevado a cabo con un 100% de eficiencia entonces 20 ciclos producirían un millón de copias de la fracción de ADN original.

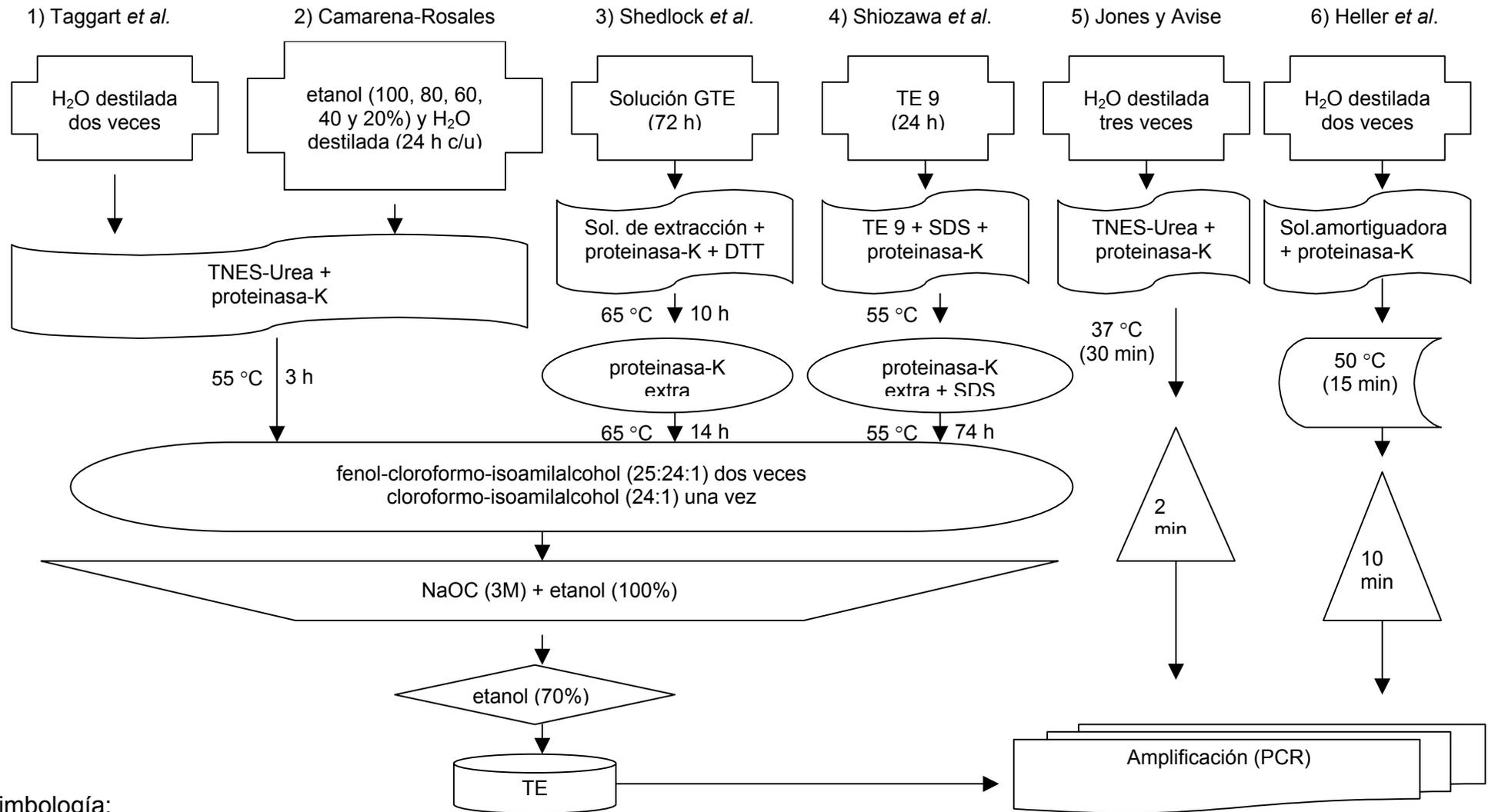
RFLP. Polimorfismo en la longitud del fragmento de restricción. Esta es una diferencia en la longitud de un fragmento de restricción que se encuentra segregado en las poblaciones naturales. Debido a que los RFLP's se encuentran en todo el genoma se asume que tienen principal importancia en la genética.

Stock. Es una población que actualmente se pesca y se somete a un manejo. Así la palabra stock únicamente es definida en relación a la actividad humana, esta misma no pretende describir una unidad natural de organización biológica. Todo el manejo de las pesquerías esta basado implícitamente sobre el concepto de stock. El stock es simplemente aquella entidad de la cual se realizan las capturas, y los problemas de definición a menudo son una cuestión de escala geográfica apropiada.

En cuestiones de genética poblacional un stock es una población de organismos que (idealmente) comparten una poza génica común, que es suficientemente discreta (y nominalmente identificable) para garantizar la consideración de un sistema autoperpetuante que puede ser manejado.

Subpoblación. Es un grupo de peces que se entrecruzan entre sí de manera más o menos azarosa y en menor medida con los peces de otras subpoblaciones. Las subpoblaciones son unidades de organización biológica definidas por vínculos de apareamiento. Debido a que un stock de peces, reconocido por la pesquería y su manejo, puede comprender más de una subpoblación, una base biológica para el manejo de tal mezcla de stocks demanda la identificación de las subpoblaciones señaladas.

Temperatura de alineamiento. Es la temperatura a la cual la mitad de los iniciadores se alinean a la región a amplificar.



Simbología:

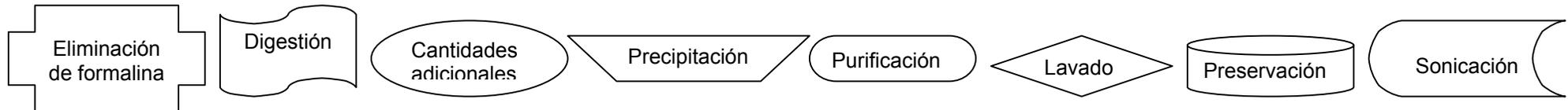
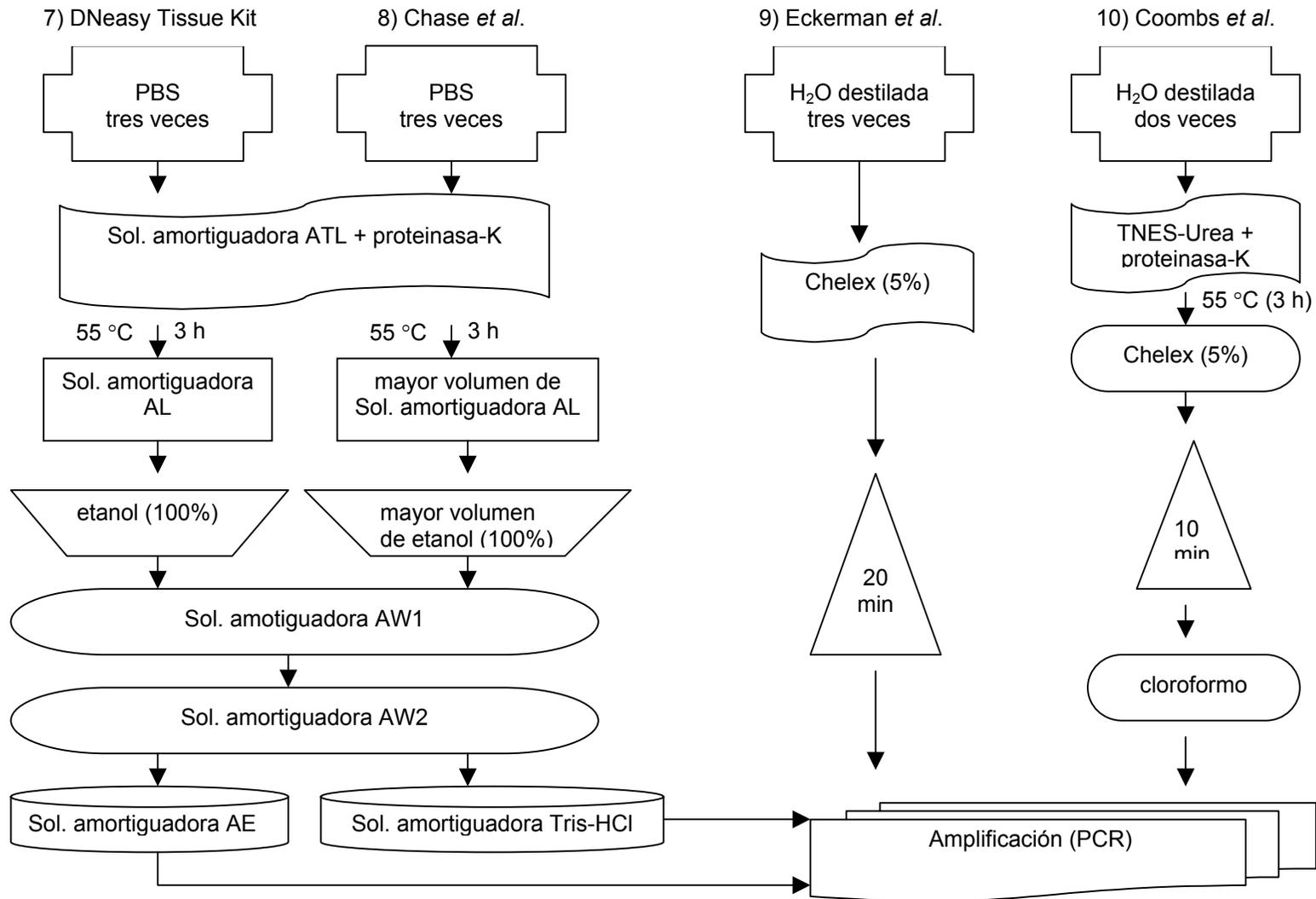
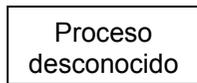


Figura 2. Continuación



Simbología:



Ebullición