



Posgrado en
Ciencias del Mar
y Limnología



**ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE
LA ANGIOSPERMA MARINA *THALASSIA TESTUDINUM*,
BANKS EX KÖNING, CON EL USO DE MICROSATÉLITES.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS DEL MAR
Y LIMNOLOGÍA**

PRESENTA:

JENT KORNELIS VAN DIJK

DIRECTORES DE TESIS:

DRA. BRIGITTA INE VAN TUSSENBROEK

DR. DANIEL PIÑERO DALMAU

COMITÉ TUTORAL:

DRA. MARÍA TERESA VALVERDE VALDÉS

DR. FEDERICO ALBERO ABREU GROBOIS

JURADO EXTENDIDO DE GRADO:

DR. LUIS EGUIARTE FRUNS

DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ GUZMÁN

DRA. MARGARITA GALLEGOS MARTÍNEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Botánica Marina de la Unidad Académica Puerto Morelos del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección de la Dra. Brigitta Ine van Tussenbroek Ribbink y la co-dirección del Dr. Daniel Piñero Dalmao.

El Comité Tutorial estuvo integrado por:

Dra. Brigitta Ine van Tussenbroek Ribbink

Dr. Daniel Piñero Dalmao

Dra. María Teresa Valverde Valdés

Dr. Federico Alberio Abreu Grobois

El Jurado Extendido de Examen de Doctorado fue integrado por:

Dr. Luis Eguiarte Fruns

Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán

Dra. Margarita Gallegos Martínez

Esta tesis fue realizada con una beca otorgada por la DGEP, con número de cuenta del becario: 501109163. Además, 6 meses de beca fueron otorgadas por el proyecto PAPIIT no. IN-213307.

El financiamiento del proyecto se logró con los proyectos PAPIIT no. IN-213803, IN-239304 y IN-213307 (DGAPA, UNAM).

Laboratorio de Botánica Marina, Unidad Académica Puerto Morelos

Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México

El trabajo presentado forma parte de una línea de trabajo interdisciplinario del Laboratorio de Botánica Marina de la Unidad Académica Puerto Morelos (UAPM), que pertenece al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICMyL) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), que esta enfocada a diversos aspectos de la reproducción sexual de los pastos marinos que son angiospermas marinas, y que se reproducen por flores, frutos y semillas en el medio marino. Uno de los objetivos de esta línea es el entender la función de la reproducción sexual a nivel poblacional y evolutivo. Históricamente, se desconocía el papel de la reproducción sexual, y el grupo de trabajo de este laboratorio se ha enfocado a revelar la importancia de la reproducción sexual, y se procura estudiar a la reproducción sexual de las distintas especies desde un enfoque ecológico, embriológico, histológico, químico y genético poblacional. Hasta la fecha la especie de principal enfoque ha sido *Thalassia testudinum* Banks ex König, por ser la dominante en el Atlántico tropical y subtropical. Los estudios realizados y por realizar con un enfoque genético tienen como objetivo estudiar la función y el funcionamiento de la reproducción sexual en la especie, la relación que ésta tiene con la clonalidad, y la importancia relativa de ambos tipos de proliferación poblacional sobre el crecimiento poblacional, la diversidad genética y genotípica de las poblaciones. Esta tesis se puede considerar como la parte inicial de la ecología molecular de *Thalassia testudinum*.

Permisos de Colecta

En el estudio actual se cumplió con los requisitos necesarios para realizar todas las colectas de campo. Se obtuvieron los Permisos de Pesca y Fomento de la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca de la Dirección General de Ordenamiento Pesquero y Acuícola No. 170203-613-03 (760), DGOPA/8420/150904/3039, DGOPA/8178/130904/2956, DGOPA/04459/120506/1809, DGOPA/16992/050106/0037, DGOPA/03018/090807/6635, DGOPA/05981/240707/2731.

También se cumplió con los requisitos para la colecta de pastos marinos en las poblaciones de Cuba. Numero de permiso 2/2005 del Ministerio de Ciencia Tecnología y Medio Ambiente Centro de Inspección y Control Ambiental CICA. Copia de los permisos se encuentran en el ANEXO 5.

Tesis doctoral de Jent Kornelis van Dijk:

Análisis de la variabilidad genética de la angiosperma marina *Thalassia testudinum*, banks ex könig, con el uso de microsatélites.

*A Daniella, mi compañera de la vida!
Por haber aguantado, y no perder la
confianza y paciencia de que terminaría
la tesis pronto..... Te quiero!
Un Besote.*

*A Mis papas,
Kees van Dijk y Henny Kuipers
por haberme motivado y dejarme hacer lo
que a mi me gusta hacer y por apoyarme de
tantas maneras a tan larga distancia.
Sin la educación que tuve, nunca hubiera
sido un biólogo marino y nunca hubiera
podido escribir esta tesis en español.*

*A mi hermanita Marieke, que me aguantó cuando
vivíamos juntos, y por supuesto por Diego que
nació durante el último año de mi tesis, y a mi
cuñado Ramon.*

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento muy especial para la Dra. Brigitta I. Van Tussenbroek (Brigit), por darme toda la confianza y el apoyo para abrir un nuevo campo de investigación dentro del laboratorio de Botánica Marina de la Unidad Académica Puerto Morelos y libertad de equivocarme de vez en cuando. Además, por haberme enseñado y entusiasmado sobre la biología de los pastos marinos, y todas las discusiones que tuvimos durante los 6½ años de mi estancia en el laboratorio.

A mi co-director de tesis Dr. Daniel Piñero Dalmau, por ser invaluable para la definición de mi tesis y darme el apoyo moral que, de vez en cuando, necesitaba y por enseñarme el camino cuando yo ya no lo veía.

A los miembros de mi comité tutorial; la Dra. Brigitta I. van Tussenbroek, el Dr. Daniel Piñero Dalmau, la Dra. M. Teresa Valverde Valdés y el Dr. F. Alberto Abreu Grobois, por hacer que los tutorales fueran momentos indispensables, con discusiones excelentes y constructivas para mejorar mi desempeño y el de mi tesis.

A los miembros del jurado de grado: el Dr. Luis Eguiarte Fruns, la Dra. Judith Marquez Guzmán, y la Dra. Margarita Gallegos Martínez, por revisar mi tesis y proporcionar correcciones esenciales del escrito.

Al Dr. Joop Ouborg, por el apoyo laboral e intelectual brindado para el desarrollo de los microsátélites y por la estancia en su laboratorio en la Universidad Radboud en Nijmegen, Países Bajos. *Aan Dr. Joop Ouborg voor al de steun die ik gehad heb tijdens de verrijking van mijn microsatielieten en het erg aangename verblijf in het lab in Nijmegen.*

A los técnicos académicos del laboratorio de Botánica Marina M. en C. Guadalupe Barba Santos y M. en C. Daniel Gasca Flores por todo el apoyo en el laboratorio y en el campo.

A la Dra. Michelle Waycott (y Ainsley) por el apoyo durante el desarrollo de los microsátélites y por la estancia en su laboratorio en la Universidad de James Cook, Townsville, Australia. Al M. en C. Ricardo Wong por su apoyo en los largos viajes de colecta por la península de Yucatán, también por estar conmigo en los congresos que atendimos. Al M. en C. Fráncico Ruiz Rentarías y M. en C. J. Edgar Escalante Mancera por el apoyo en las cuestiones de oceanografía y meteorología. Además, por las discusiones constructivas y divertidas que tuvimos! Y el CAFÉ?

A la M. en C. Karina Jiménez Duran, por haber realizado, durante su maestría, una parte esencial para el entendimiento de mi tesis.

A los compañeros del Laboratorio de Daniel Piñero: Alejandra, Rodolfo, Ana y Miroslava.

A los compañeros del laboratorio del Dr. Joop Ouborg: Ramses Rengeling, Hans de Jong, Arjen y Carolin.

A MSc. Eric Bricker y Dr. Joseph Zieman por haberme apoyado en mi estancia final en la Universidad de Virginia.

A Adrien Le Cossec (CEA, CICY) por haberme apoyado con los cálculos de distancias con GIS.

Al Dr. Rodolfo Silva Casarín del Instituto de Ingeniería de la UNAM y sus estudiantes, especialmente al M. en C. Gabriel Ruiz Martínez por haber apoyado en la generación de información para las publicaciones, contribuyendo con los datos de oleaje y la granulometría de sedimentos.

También agradezco al Dr. Ismael Mariño Tapia (CINVESTAV), por proporcionar los datos de corrientes del Golfo de México, sin compromisos.

A Lulú (Dra. Lourdes Segura Puertas) por haberse dado el tiempo de revisar mi tesis. ¡Muchas gracias!

Te extrañamos!!

Agradezco al apoyo de la CONANP y al Director del Parque Nacional Arrecife Alacranes, Rene Humberto Kantun Palma por el apoyo en el viaje de colecta a Alacranes, y al Director Robert Cudney Bueno por el apoyo en la colecta de la población de Parque Nacional Arrecifes de Cozumel.

Quiero agradecer a los colaboradores de las instituciones del Caribe y Golfo de México, la mayoría integradas en a CARICOMP por coleccionar las muestras internacionales: Dra. Joanna Pitt & Tim Noyes, Bermuda Biological Station for Research – Bermuda; Dr. Peter Gayle, Discovery Bay Marine Laboratory, Centre for Marine Sciences – Jamaica; Dr. Jorge Cortés & Vanessa Nielsen CIMAR (Centro de Investigación en Ciencias del Mar) - Costa Rica; Brian Leysner & Dr. Walter L. Bakhuis & Herbert Silonero, Carmabi Foundation – Curazao; Dr. Thomas Whelan, Texas A&M University – Lower Laguna Madre, Texas USA; Dr. Ken Dunton, Marine Science Institute, University of Texas at Austin, Red Fish Bay, USA; Tom Frankovich, Florida Bay Interagency Science Centre - Rabbit Key Basin, Craig Key, y Fiesta Key, USA; Dra. Catherine Bell, Department of Environment – Gran Cayman; Dra. Susan Bell, Department of Biology, University of South Florida – Tampa Bay USA; Dr. Rachel Collins & Biol. Gabriel Jácome, Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales, NAOS-STRI – Panamá; Dr. Ernesto Weil, Department of Marine Sciences, University of Puerto Rico – Puerto Rico; Javier Gutiérrez, Fundación La Salle de Ciencias Naturales, Estación de Investigaciones Marinas de Margarita – Venezuela; Dra. Rahanna Juman, Institute of Marine Affairs – Trinidad Tobago, Dr. Renata Goodridge, NRM-UWI – Barbados (por el intento); Dra. Karen Koltes (por el intento), Office of Insular Affairs – Belice; y a la M en C. Rosa Rodríguez UAPM, ICML, UNAM por haber ayudado contactarnos con los integrantes de esta organización.

Agradezco a la Dra. Beatriz Martínez-Daranas y Macario del Instituto de Oceanología en la Habana por el apoyo en nuestro viaje de colecto a Cuba. ¡Inolvidable!

Al M. en C. Alejandro Morales García y sus estudiantes por coleccionar las muestras de Veracruz.

Gracias también a los investigadores del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología particularmente los de la Unidad Académica Puerto Morelos por sus consejos y discusiones: Dra. Patricia Tomé Ortíz por el apoyo logístico y el uso de su laboratorio, Dr. Adolfo Gracia, Dra. Anastazia Banaszak, Dr. Eric Jordán Dahgren, Dr. Roberto Iglesias Prieto, Dra. Patricia Briones Fourzán, Dr. Enrique Lozano Álvarez, Dra. Judith Sanchez Rodríguez, y al Dr. Paul Blanchon.

Al Centro de Computo de la Unidad Académica Puerto Morelos y en especial a Gabriel Rosado por el soporte técnico.

A los papas de Dani, Maru y Miguel, por la hospitalidad. A Maru, Adrian, Ana Jose y Mariel!

A mis amigos de Puerto Morelos por haber hecha mi estancia tan agradable, divertida y llena de aventura. A Edgar que ya casi metió la boya, a Adrien por catar los vinos, a Melina qué buena Tartatatatin, a los 3 por los quesos, los vinos, los viajes y más. A Aimé por tantas cosas que mejor no las pongo todas.... A Mario por tener espina y tambien por los quesos y el champan!!!!. A Cesar Meiners Mandujano, bueno compañero! A Donald y Ania por dejarme construir la bodeguita. A Fernando Durand, mi futuro vecino. A Fer, el Negro, buen Tequila. A Gloria la venada... A Karla y Mauricio y el Redondo. A Raúl y Libia, que bonito es Bacalar, ¡La Pura vida! A Paco y Gris y claro Santiago y Sebastián. Julian Jaime el grumpy...Luzma, Nancy..

A los cuates del DF y alrededores: Tar y Lucía, ¡qué buena Mojiganga! A Nicolás y Rebeca (Ya no tan apenado). Al Tuinky Wonder y Eli, por las carcajadas...lástima que no nos vemos tanto. A los técnicos académicos de la Unidad; Fernando Negrete por los buenos buceos y Cecilia Barradas por la buena compañía. A mis compañeros estudiantes de la Unidad: Alejandro, Carlos, Cesar, Erica, Gabriela, Gloria (La Venada), Victor Hugo, Karina (Ensenada), Karina (DF), Lorenzo, Luis, Lupita, Manuela, Marisela, Tania, Xavier (El Pech). A Eutimio, Amauri, Amador, Moisés, Don Manuel, Don Francisco, Don Felipe, Ricardo.

Aan mijn vrienden uit Nederland die schreven of langs zijn gekomen: Jeroen Guikema en Margaretha, Jeroen Akkerman, Hans Verwoert, Lennart Akkerman, Mark Nieuwhof, Eric Munneke en Ernee Raspe, Martijn de Groot, Remment ter Hofstede, Bregje, Arne Heijenga en Trynke de Jong, Irene Heijink, Johan, Leendert Jan Mekking.

ÍNDICE

RESUMEN	I
SUMMARY	IV
CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN	1
Los pastos marinos	1
<i>Thalassia testudinum</i>	6
Importancia de los pastos marinos	10
Los marcadores genéticos	14
Los microsatélites	16
Genética poblacional en los pastos marinos	17
Objetivos	23
General	23
Específicos	23
CAPITULO 2. AISLAMIENTO DE MICROSATÉLITES Y DESARROLLO DE LOS PRIMERS ESPECÍFICOS PARA <i>THALASSIA TESTUDINUM</i>	24
Antecedentes	24
Colecta de material	25
Aislamiento de los loci de microsatélites	25
Extracción de ADN	27
Digestión del ADN	27
Ligación del "Linker"	29
Amplificación de fragmentos flanqueados con el linker	30
Preparación de filtros	31
Hibridación de ADN de <i>T. testudinum</i> a filtros	32
Separación de ADN de filtros	33
Amplificación del ADN enriquecido	34
Clonación de bacterias	35
Selección de bacterias positivas	36
Preparación de filtros de nitrocelulosa	37
Hibridación con oligonucleótidos de microsatélites radioactivos	38
Detección de colonias positivas	39
Secuenciación del ADN vectorial con <i>T. testudinum</i>	40
Diseño de primers específicos para los microsatélites de <i>T. testudinum</i>	42
Optimización, amplificación y análisis de polimorfismo de los primers específicos para <i>T. testudinum</i>	43
CAPITULO 3. EVALUACIÓN DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA, CONECTIVIDAD Y ESTRUCTURA CLONAL DE POBLACIONES DE <i>THALASSIA TESTUDINUM</i> A LO LARGO DE LA COSTA DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN	48
Introducción	48
Métodos	54
Área de estudio	54
Genética poblacional	56
Colecta de material biológico	56
Extracción de ADN, amplificación y separación de fragmentos	58
Análisis de los datos	60
Parámetros básicos	60
Estructura poblacional	62
Estructura clonal	65
Resultados	66
ADN y parámetros básicos	66
Estructura poblacional	69
Aislamiento por Distancia	72

Dirección del flujo genético	74
Diversidad Clonal	75
Discusión	78
Sobre los Métodos empleados	78
Estructura genética y conectividad	80
Aislamiento por distancia y dispersión de propágulos	81
Flujo genético y corrientes marinas	83
Estructura genética	85
Clonalidad	87
Conclusión	90
CAPITULO 4. ESTRUCTURA GENÉTICA Y CONECTIVIDAD DE LAS POBLACIONES DE THALASSIA TESTUDINUM EN SU ÁREA DE DISTRIBUCIÓN	92
Introducción	92
Métodos	94
Área de estudio	94
Genética poblacional	96
Sitios de colecta	96
Extracción de ADN, amplificación y separación de fragmentos	99
Análisis de los datos	99
Estructura poblacional	100
Resultados	101
Variación genética	101
Estructura genética y conectividad	103
Discusión	109
Diversidad genética	109
Clonalidad	113
Aislamiento por distancia	116
Estructuración genética	118
Conclusión	121
CAPITULO 5. DISCUSIÓN GENERAL	122
Los microsatélites de <i>Thalassia</i> spp.	122
El muestreo de <i>Thalassia testudinum</i> para estudios de genética poblacional	126
Genética poblacional en los pastos marinos	128
Aplicaciones prácticas del presente estudio	130
Contribuciones del presente estudio	134
CAPITULO 6. RESULTADOS MÁS IMPORTANTES Y SUGERENCIAS	137
Los resultados más importantes del estudio genético poblacional de <i>Thalassia testudinum</i>	137
Sugerencias para futuros trabajos con <i>Thalassia testudinum</i>	139
LITERATURA CITADA	142
ANEXO 1. PROTOCOLO DE ENRIQUECIMIENTO DE MICROSATELLITES PARA LA ANGIOSPERMA MARINA <i>THALASSIA TESTUDINUM</i> Y EL DISEÑO DE PRIMERS ESPECÍFICOS	161
ANEXO 2. TINCIÓN CON NITRATO DE PLATA PARA GELES DE POLIACRILAMIDA	178
ANEXO 3. POBLACIONES RECOLECTADAS PARA ESTUDIO EN SU ÁREA DE DISTRIBUCIÓN COMPLETA, EL GRAN CARIBE Y EL GOLFO DE MÉXICO	180
ANEXO 4. PLAN DE MUESTREO PARA COLABORADORES DE CARICOMP	181
ANEXO 5. PERMISO DE COLECTA SAGRAPA	186

RESUMEN

Los pastos marinos son un grupo ecológico de plantas marinas que forman flores subacuáticas, y dominan las zonas costeras someras de todo el mundo (con excepción de la Antártica). La especie del presente estudio es *Thalassia testudinum* Banks ex König (familia Hydrocharitaceae), que se distribuye en el Gran Caribe y el Golfo de México; es el pasto marino dominante de las costas del Atlántico Mexicano. El crecimiento poblacional de esta especie es principalmente mediante la propagación vegetativa o clonal, una de las grandes dificultades con las plantas clonales, y específicamente con los pastos marinos, es que es muy difícil identificar a un individuo. Las conexiones físicas de la planta desaparecen con el tiempo, pero el genotipo como individuo genético sigue existiendo, haciéndola potencialmente inmortal, pero difícil de identificar físicamente. Sin embargo, la especie también se reproduce sexualmente, es decir produce flores y frutos, sin embargo, aún falta por descifrar el papel que juega la reproducción sexual en el mantenimiento y establecimiento de las poblaciones. El estudio actual se enfocó principalmente en evaluar la distribución de la diversidad genética de *T. testudinum* y revelar los niveles de conectividad genética entre las poblaciones. Además, el proyecto se enfocó en determinar los niveles de clonalidad y su diversidad genotípica en las poblaciones. Para el estudio se analizaron genéticamente, con el uso de microsatélites, 16 poblaciones de la costa Atlántica Mexicana y 20 poblaciones distribuidas por toda el área geográfica de la especie. Por medio de un protocolo de enriquecimiento del ADN genómico, se aislaron 11 microsatélites altamente polimórficos con sus respectivos pares de primers, seis de estos loci fueron optimizados y utilizados en los estudios siguientes.

La primera parte de este trabajo se enfocó a revelar la diversidad genética y genotípica de las poblaciones de México, desde Banco Chinchorro a Veracruz. Estas poblaciones fueron recolectadas

RESUMEN

bajo el mismo esquema jerárquico de muestreo que consistió de 36 ramets por población, a lo largo de un transecto de 227m de largo. Dado el alto nivel de clonalidad, el número de genets disminuyó a 4 y 29 genets por población. La varianza molecular resultó estar distribuida homogéneamente a lo largo de la costa de México, con una variación inter-poblacional de 9.8% (AMOVA). La estructuración poblacional determinada por medio de un árbol NJ (Neighbor Joining), fue poco definida, con valores bajos de asignación, pero el árbol mostró que, en la mayoría de los casos, las poblaciones cercanas estaban más asociadas que las lejanas. El análisis de estructuración Bayesiano reveló la existencia de tres agrupamientos, de los cuales dos, integrados por poblaciones del Caribe, no demostraron tener una clara distribución de poblaciones, el tercer agrupamiento consistió de las poblaciones del Golfo de México (desde Celestún a Veracruz). Una prueba de Mantel probó que había una relación positiva y significativa entre la distancia genética y la distancia geográfica, sin embargo con una relativamente baja correlación ($R^2 = 0.207$). Esto indicó que las poblaciones en las costas de México mostraron un aislamiento por distancia y se estimó una unidad panmictica de 350 km, resaltando la importancia de dispersión a larga distancia, probablemente por los frutos flotantes. Además de la diversidad genética, se determinó la diversidad genotípica, y esta especie fue altamente clonal y longeva. Las identidades de los genotipos revelaron genets de 226 m con una edad estimada de más 330 años. Esta última edad probablemente es una subestimación, ya que los clones se pudieron haber extendido más que el tamaño del transecto de muestreo.

La segunda parte de este trabajo abarcó un estudio de identidad genética a lo largo toda el área geográfica de la especie, integrando 20 poblaciones que consistieron de 30 ramets cada una (consintiendo de 2 grupos de 15 muestras, con una distancia mayor de 500 m). En este estudio se incluyeron seis poblaciones de México que tenían 36 ramets. Igual que en el estudio nacional la clonalidad disminuyó el número de genets. La varianza molecular fue homogénea, con un valor de variación inter-poblacional de 19.4%. Sin embargo, al eliminar las tres poblaciones más extremas

RESUMEN

(Trinidad Tabago, Laguna Madre y Bermuda) del análisis, el valor de diversidad inter-poblacional disminuyó a 14.4%. Un árbol NJ demostró que las poblaciones cercanas eran las más relacionadas, pero se observó un agrupamiento grande integrando las poblaciones del Norte de América, consistiendo de cuatro poblaciones. El análisis de asignación Bayesiana identificó 11 clusters integrados por poblaciones vecinas. El aislamiento por distancia fue ligeramente significativo, pero con un valor de significancia menor que en el estudio realizado con las poblaciones mexicanas ($R^2=0.207$, $p=0.023$), sin embargo si las tres poblaciones más extremas fueron descartadas, no existió una relación entre la distancia geográfica y la genética, indicando que la distancia geográfica no necesariamente definió la diferenciación genética, probablemente por la distribución en islas, y patrones caóticos de circulación oceanográfica.

La conclusión general fue, que *Thalassia testudinum* tiene una alta diversidad genética que es comparable con resultados de otras especies de pastos marinos, con un número alto de alelos (62) para los 6 microsatélites utilizados. Además, esta especie tiene una alta conectividad genética entre las poblaciones, probablemente causa de una dispersión principalmente costera, combinado con eventos escasos pero significativos de dispersión a muy grandes distancias (> 500 km). No fue posible relacionar la estructura genética con las corrientes dominantes de la zona, y se concluyó que el área de distribución es abierta sin barreras y que hay un flujo genético libre entre las poblaciones que tiene el potencial de estar conformadas por plantas muy longevas.

ABSTRACT

The seagrasses are an ecological group of marine angiosperms that have the ability of forming sub aquatic flowers. Seagrasses are worldly distributed, dominating in the shallow zones of the coasts. The species of interest in this study is *Thalassia testudinum* and is a marine angiosperm that is found in the Greater Caribbean and the Gulf of Mexico, and is generally the dominant seagrass species along the Mexican Atlantic coast. The species extends itself principally by vegetative propagation, but sexual reproduction by flowers has been reported frequently for this species. One of the principal difficulties with clonal plants, and particularly with seagrasses, is the almost impossible task of tracing its clonal growth. The physical connections between the plant segments are lost as plants get older, but the genetic individual (or genet) keeps existing, making them almost impossible to identify and virtually immortal. It is still unclear what the role of sexual reproduction plays for this primarily clonal species.

The study here presented was basically focused in evaluating the distribution of the genetic diversity of *T. testudinum*, and in determining the relationship between this diversity and the sexual and clonal reproduction. For this study, 16 populations of the Mexican Atlantic and 20 populations of the whole distribution area were analyzed with the use of microsatellite markers.

With the use of a microsatellite enrichment procedure, 11 polymorphic microsatellite markers were isolated from the genomic DNA of *T. testudinum*, with their corresponding primer pairs. Six of these microsatellites were optimized for PCR and used in the presented study.

The first part of this study was focused on revealing the genetic and genotypic diversity in 16 populations of Mexico. All populations, from Chinchorro to Veracruz were collected with the same hierarchical recollection scheme, consisting of a total of 36 samples each population. Due to the

RESUMEN

high incidence of clonality, the number of genets per population varied highly from 4 to 29 unique genets per population. Higher values of genetic diversity compared to previous studies were found for the same species. The study of molecular variance with an AMOVA resulted in a homogeneous distribution of genetic diversity over all Mexican populations, where the inter-population diversity was 9.8% and 90.2% of the diversity within the populations. The distribution of the populations in a Neighbor Joining Tree did not show a clear separation between populations, and generally neighboring populations were the ones that had highest bootstrap values. Analysis of populations with a Bayesian approach revealed that these 16 populations were divided into 3 panmictic clusters, but the distribution of the populations was not always clear, in particular in the Caribbean and the northern Yucatan, where two clusters were mixed. The third cluster was more defined, consisting of the populations of the Gulf of Mexico (from Celestún to Veracruz). An Isolation By Distance analyses (using a Mantel test) revealed that a significant positive relationship existed between genetic and geographic distance. Although correlation was not very high ($R^2 = 0.207$) a panmictic unit of 350 km was estimated with the present data, indicating that long distance dispersal is an important factor for this species. This is one of the first studies that compared the genetic dispersal to the real dispersal of propagules, and at least for Mexico, these results are comparable and coincide well.

The same collection scheme permitted to make some conclusions on the genotypic or clonal diversity, and this study revealed a high incidence of clonality within the populations. The genotypic identities revealed that the largest genets had at least a size of 226 m, which correspond to an age of more than 330 years. This can be considered as a sub estimation as the size of the genets was equal to the transect distance.

Thalassia testudinum was also analyzed at a total geographic distribution scale, and 20 populations dispersed in the Greater Caribbean and Gulf of Mexico were compared. Each population (except

RESUMEN

the Mexican ones) had a total of 30 samples each, and as in the Mexican study clonality had a great reducing impact on the number of genets of each population, and only a general survey of genetic diversity in the area was possible. As in the previous analysis the molecular variance was homogeneously distributed over all populations with a total inter-population genetic variation of 19.4% and with the majority of the diversity within the populations (80.6%), and if the three most extreme populations are eliminated from this analysis the inter-population genetic variation diminishes to 14.4%. The genetic structure was not very clearly defined, as the populations were generally very small in number of genets, and in the Neighbor Joining Tree the neighboring population were the ones that had highest bootstrap values, one clear cluster could be recognized, which was the North American cluster integrating four populations. The Isolation By distance analyses revealed that a slight positive significant relationship between genetic and geographic distance, but if the same three extreme populations were removed from the analysis, no relationship is revealed, indicating that far away population not necessarily are more differentiated.

The general conclusion of this study was that, genetic diversity determined with microsatellites as genetic markers for *Thalassia testudinum* was comparable to the results found for other studies in seagrasses, with a total of 63 alleles for the 6 loci used. Another important result is that genetic connectivity is high between populations and that the dispersal is principally along the coast, if possible. But the analysis on total distribution scale revealed that dispersal over very long distances is probably very important too, but not linearly related to distance and probably a very random process. It was not possible to relate the genetic structuring to the dominant oceanic current regimes, and the genetic structuring suggest that the Caribbean and the Gulf of Mexico are, open, highly connected systems and that gene flow is not restricted and very important for this species. The individuals in the populations can become very old, so the process of interchange of genes is probably a very slow one.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Los pastos marinos.

El grupo ecológico de los pastos marinos (o angiospermas marinas) comprende cinco familias (Zosteraceae, Cymodoceae, Posidoniaceae, Ruppiaceae, e Hydrocharitaceae) y es de origen polifilético (Figura 1.1). La diversidad específica de este grupo es baja, con aproximadamente 60 especies en 13 géneros (Den Hartog y Kuo 2006; Green y Short 2003; Den Hartog 1970), dependiendo del criterio taxonómico. Aunque existen pocas especies de pastos marinos, su distribución abarca todo el globo terráqueo, con excepción de la Antártida (Green y Short 2003).

Las cinco familias que integran al grupo de los pastos marinos son (Figura 1.1): 1. Zosteraceae que integra los géneros *Zostera*, *Heterozostera* y *Phyllospadix*. 2. Cymodoceaceae, que integra los géneros *Cymodoceaceae*, *Halodule*, *Syringodium*, *Thalassodendron* y *Amphibolis*. 3. Posidoniaceae, con un solo género: *Posidonia*. 4. Ruppiaceae, con un género *Ruppia*. 5. Hydrocharitaceae, con tres géneros: *Thalassia*, *Halophila* y *Enhalus*. Esta última familia además de contener pastos marinos, incluye 14 géneros de plantas acuáticas no marinas (Kuo y Den Hartog 2000). En el área de interés, el Caribe y Golfo de México, existen ocho especies de pastos marinos, de las cuales *Thalassia testudinum* (hierba tortuga), *Syringodium filiforme* (hierba manatí) y *Halodule wrightii* son las principales (Creed *et al.* 2003; Espinoza-Avalos 1996).

No se ha encontrado una explicación satisfactoria para la baja diversidad específica de las familias de pastos marinos, pero se han planteado dos hipótesis. La primera es que estas plantas, una vez adaptadas al ambiente marino (que requiere de adaptaciones especiales para la floración, la polinización, así como en lo referente a anatomía, fisiología y forma de crecimiento), encontraron un

ambiente relativamente estable con pocos competidores, y por lo tanto hubo una baja presión de selección que favoreciera la diversificación de las especies (Larkum y Den Hartog 1989). La otra hipótesis es que los pastos marinos son fanerógamas clonales que se extienden vegetativamente por elongación de los rizomas y no dependen necesariamente de la reproducción sexual para expandirse, lo cual puede traer como consecuencia una baja diversidad genética, y por lo tanto un bajo potencial evolutivo (Waycott y Les 2000; Les 1988). Actualmente se conocen aproximadamente 60 especies de pastos marinos, pero es muy probable que este número disminuya, ya que varias especies son fenotípicamente idénticas, y únicamente son distinguidas por su ubicación geográfica y pequeños detalles de morfología.

La mayoría de las especies de

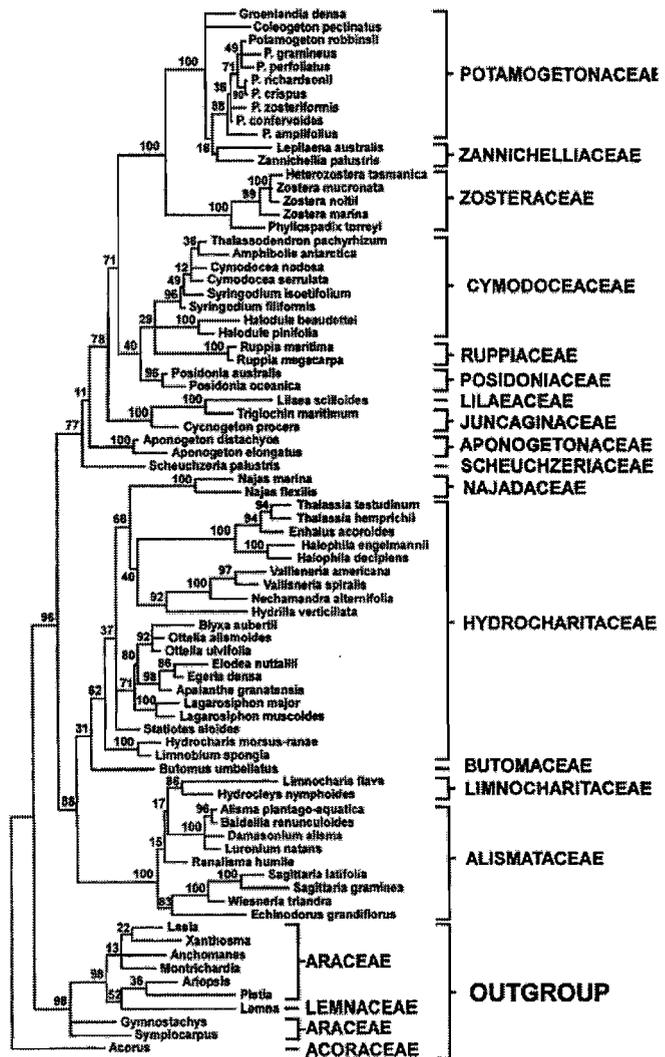


Figura 1.1 Distribución filogenética de 15 familias de Monocotiledóneas representantes de la subclase Alismatidea, incluyendo 22 especies de pastos marinos representando los 13 géneros de las 5 familias. Las familias que únicamente incluyen pastos marinos son Zosteraceae, Cymodoceaceae, Posidoniaceae, Ruppiaceae. Las Hydrocharitaceae integran especies marinas que son *Thalassia testudinum*, *T. hemprichii*, *Enhalus acoroides* y *Halophila* spp., y además integra varias especies no marinas. La topología está basada en la secuencia del gen del cloroplasto *rbcL*, en cada nodo el valor de bootstrap fue anotado. La longitud de las ramificaciones se representa por el número de sustituciones en la secuencia. Ilustración de Les *et al.* (1997).

pastos marinos, el 75%, son dioicas, 19% son monoicas y 6% son hermafroditas (Waycott y Sampson 1997; Den Hartog 1970). Esta relación es muy diferente a la de las plantas terrestres, donde únicamente el 4% es dioico y la mayoría es hermafrodita (Richards 1986). Se ha propuesto que la alta proporción de especies dioicas en los pastos marinos, en comparación con la generalidad de las fanerógamas (de las cuales la gran mayoría tienen flores hermafroditas (Barrett 2002; Waycott y Sampson 1997)), es una consecuencia de la polinización subacuática o la hidrofilia, y tiene como resultado una maximización del entrecruzamiento de genotipos (Cox y Humphries 1993; Cox 1983). Además, el dioicismo disminuye la probabilidad de endogamia, porque se excluye la autofecundación. Alternativamente, Cox y Humphries (1993) concluyeron que en la familia de las Cymodoceaceae, las especies se originaron de un mismo ancestro dioico. Ellos también hipotetizan que la separación de los sexos fue una evolución independiente en las familias Zosteraceae e Hydrocharitaceae y, por lo tanto, el dioicismo se puede considerar una adaptación al medio marino.

Los pastos marinos dominan muchos ecosistemas costeros someros con fondos blandos, donde juegan un papel ecológico muy importante (Den Hartog 1970). Son productores primarios importantes, generando material orgánico para los siguientes niveles tróficos, principalmente a través de la descomposición de detritus (Valentine y Duffy 2006; Cebrián y Duarte 2001). Otro aspecto importante de los pastos marinos es su función como estabilizadores de sedimentos y retenes de arena

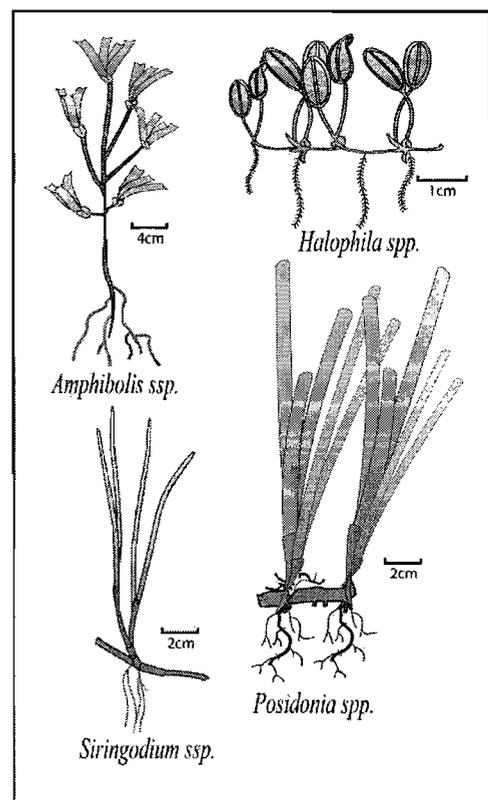


Figura 1.2 Ejemplos de las diferentes formas de crecimiento de los pastos marinos.

CAPITULO 1. Introducción.

por medio de su extenso sistema de raíces y rizomas, fungiendo como una protección para las playas y previniendo la erosión durante temporales, tormentas y huracanes. Además, sus hojas funcionan como agentes atenuantes del movimiento de agua y de esta manera contribuyen a un incremento de la transparencia del agua, ya que las partículas orgánicas son atrapadas en el sedimento y recicladas. Otra función reconocida de los pastos marinos es la de proveer áreas de crianza para juveniles de una gran cantidad de especies de peces y crustáceos, muchas de ellas de importancia comercial (Heck *et al.* 2003).

Los pastos marinos son plantas clonales que colonizan áreas nuevas o re-colonizan espacios abiertos en los pastizales (fondos marinos dominados por una o varias especies de pastos marinos) por medio de la expansión vegetativa de sus rizomas (Larkum y Den Hartog 1989; Zieman 1982). La supervivencia de las poblaciones puede darse exclusivamente por la propagación vegetativa, pero la reproducción sexual no es insignificante. La frecuencia de reproducción sexual varía considerablemente entre las especies y también entre las áreas geográficas (Den Hartog 1970). Un ejemplo es *Zostera marina*, para la cual la mayoría de sus poblaciones son perennes, pero existen poblaciones que son completamente anuales y la regeneración depende de la producción de semillas (Santamaría-Gallegos *et al.* 2000; Van Lent y Verschuure 1994; Keddy y Patriquin 1978). Un ejemplo más local es *Halophila decipiens*, que cada año presenta establecimiento de plántulas en sus poblaciones de las costas de Yucatán (Observación personal, Laboratorio Pastos Marinos, ICML UAPM), pero son perennes en Florida, EUA (Hammerstrom y Kenworthy 2003).

Un concepto dominante en la biología de la conservación es que las poblaciones con un alto grado de diversidad genética tienen una alta capacidad de persistencia y las que la tienen en menor grado están en mayor riesgo de extinción (Lande 1988), por lo que la reproducción sexual en los pastos marinos podría estar jugando un papel de mantener altos niveles de variabilidad genética dentro de las poblaciones por medio de la recombinación de genes. Además, juega un papel

importante en la dispersión espacial y temporal. La dispersión espacial consiste en el transporte de propágulos lo que permite colonizar nuevas áreas, y alejarse de los descendientes (Van der Pijl 1972). La dispersión temporal consiste en la formación de un banco de semillas que son viables durante uno o varios años. En los pastos marinos las especies que forman un banco de semillas son las que producen frutos con semillas con un pericarpio duro que permite un período de latencia, que es el caso de la mayoría de las especies (Orth *et al.* 2006b). Los bancos de semillas son de suma importancia para las especies que son anuales y/o colonizadoras, pues en el caso de que se presente una perturbación son las primeras en brotar y colonizar el área devastada (Inglis 2000; Pointer *et al.* 1989).

En el medio marino la dispersión superficial puede ser muy significativa, pero aún se sabe poco sobre este fenómeno en los pastos marinos. Además, la capacidad de sobrevivencia de las semillas no está muy bien documentada (Reusch 2002; Harwell y Orth 2002). En *Zostera marina* se ha observado que la dispersión máxima que alcanzan las semillas es de solo unos cuantos metros (Orth *et al.* 2006b; Ruckelshaus 1996; Orth *et al.* 1994), pero también se han observado otros mecanismos de dispersión a más larga distancia, como la deriva de fragmentos completos de la planta con estructuras reproductivas (Orth *et al.* 2006b; Reusch 2002; Den Hartog 1970). Para mayoría de los pastos marinos la colonización de áreas lejanas depende de la reproducción sexual, pero existen contadas especies que son capaces de dispersarse por medio de fragmentos vegetativos (Di Carlo *et al.* 2005; Kuo *et al.* 1987; Cambridge *et al.* 1983). Algunas especies carecen de latencia y producen semillas sin pericarpio duro, con sólo una membrana (Elmqvist y Cox 1996). Este es el caso de las dos especies de *Thalassia*, las cuales probablemente dependen de otra estrategia de dispersión (en el tiempo y espacio). Una de estas posibles estrategias es compensar la ausencia de dispersión en el tiempo por una dispersión masiva a larga distancia.

Un aspecto único en esta especie de pasto marino es que las semillas brotan dentro del fruto, lo que permite calificarlas como semillas vivíparas (o criptovivíparas, según Tomlinson (1986). *Thalassia* no es el único género en el que se presenta este hecho; también se ha reportado en *Posidonia* y *Amphibolis* que, junto con *Thalassia*, son especies longevas y muy clonales (Orth *et al.* 2006b). Chambers y MacMahon (1994) calificaron la dispersión espacial en dos categorías: la fase I es la dispersión primaria de los propágulos al dejar la planta parental (larga distancia), y la fase II es la dispersión secundaria de las semillas después de haber sido liberadas del fruto. Para *Thalassia* probablemente sólo la fase I es significativa, ya que las semillas se desplazan un máximo de 1-2 metros.

Thalassia testudinum.

El pasto marino de este estudio, *T. testudinum* Banks ex König, pertenece a la familia de las Hydrocharitaceae. Además de *T. testudinum*, el género *Thalassia* también incluye a la especie *T. hemprichii* (Ehrenb) Aschers, que se considera su especie gemela y se distribuye en los Océanos Pacífico e Indico (Den Hartog y Kuo 2006; Van Tussenbroek *et al.* 2006; Green y Short

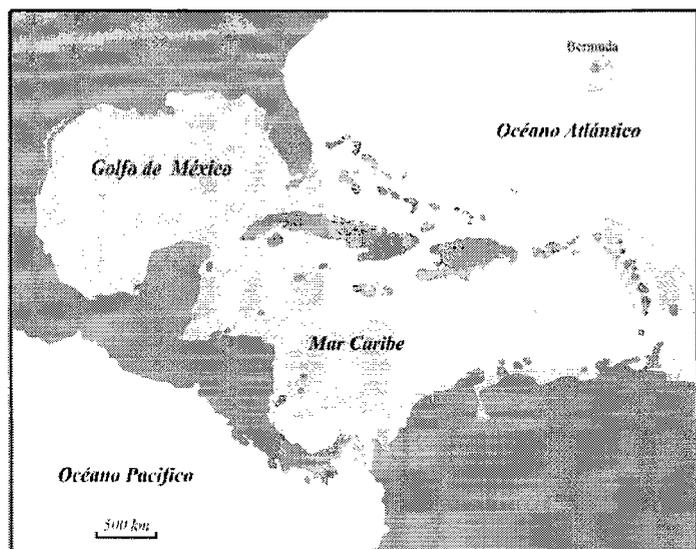


Figura 1.3 Distribución geográfica general de *Thalassia testudinum*.

2003). Ambas especies son especies sub-tropicales. Se considera que las dos se originaron del mismo ancestro en el Mar de Thetis y que se separaron hace más de 24 millones de años, por los

movimientos de deriva continental que formaron los actuales Océanos Atlántico Occidental y Pacífico Occidental (Van Tussenbroek *et al.* 2006).

Thalassia testudinum se distribuye en el Gran Caribe, Golfo de México y las Islas Bermudas (Green y Short 2003; Den Hartog 1970, Figura 1.3) y crece en áreas someras e intermareales (hasta 10-15 m de profundidad) a lo largo de las costas, habitando un amplio espectro de ambientes, como lagunas arrecifales calcáreas, costas lodosas y sistemas de manglares costeros. Las praderas generalmente no son mono-específicas, y *T. testudinum* comúnmente se encuentra acompañada de los pastos marinos *Syringodium filiforme* o *Halodule wrightii*, y de algas rizofíticas calcáreas como *Halimeda spp.* y *Udotea spp.* y no-calcáreas como *Caulerpa spp.*

Este pasto marino consiste de un rizoma horizontal con raíces y hojas escamosas en los nodos. Es una planta que se extiende lentamente y que forma ramificaciones (tallos cortos o rizomas verticales) perpendiculares al rizoma horizontal a intervalos regulares, los cuales sostienen los haces foliares (Figura 1.4); en estas ramificaciones también se forman las flores (Figura 1.5).

Thalassia testudinum es una planta clonal, pues está compuesta de módulos que potencialmente pueden crecer independientes. Éstos consisten de un tallo corto con un rizoma vertical y raíces; esta unidad se califica como un haz y se puede considerar como un ramet. Sin embargo, experimentos de trasplante han demostrado que son necesarios por lo menos dos haces unidos para que el ramet

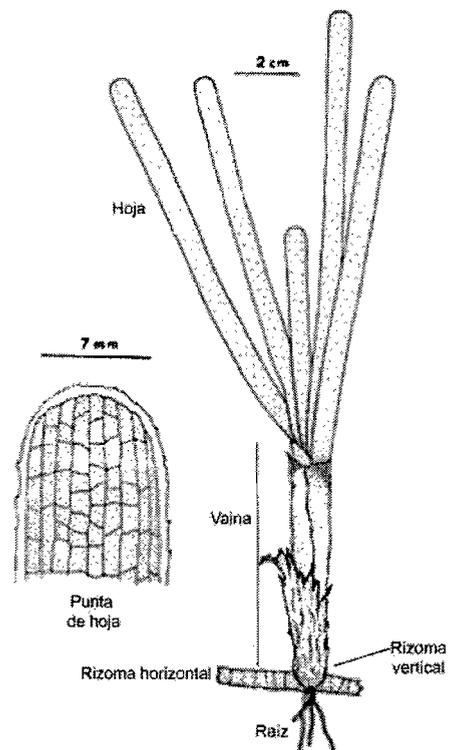


Figura 1.4 De Phillips, R.C. y E.G. Menez (1988) Esquema sencillo de un haz de *Thalassia testudinum*.

sobreviva (Tomasko *et al.* 1991). Los haces foliares generalmente tienen entre dos y seis hojas, cada una con una longitud de entre 10 y 60 cm (Green *et al.* 2003; Den Hartog 1970); éstos se forman desde el meristemo del rizoma vertical y tienen una tasa de crecimiento de 0.25 a 0.71 cm día⁻¹ por hoja (Van Tussenbroek 1995).

Thalassia testudinum es una planta dioica que consiste de genets masculinos y femeninos separados. La floración inicia en el mes de marzo y la antesis se lleva a cabo desde abril hasta agosto (Van Tussenbroek *et al.* 2006). Las flores se forman dentro de la vaina del grupo foliar y sobresalen del sustrato cuando llegan a su madurez, justo antes de la antesis, emergiendo unos centímetros arriba del sustrato (Cox y Tomlinson 1988). Las plantas femeninas forman, por inflorescencia, una y a veces dos flores con siete a ocho

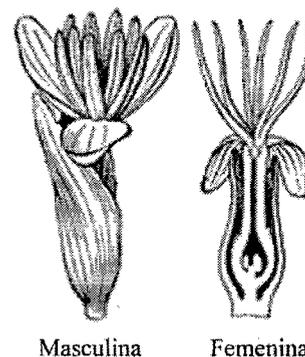


Figura 1.5 Esquema de una flor masculina y una flor femenina de *Thalassia testudinum*.

estigmas. En las plantas masculinas, una inflorescencia consiste de dos a tres (y a veces hasta cinco) flores con ocho estambres cada una (Figura 1.5). Según Cox y Tomlinson (1988) y Van Tussenbroek (2008), la antesis de las flores masculinas es durante la noche y la dehiscencia de las anteras ocurre a través de aperturas longitudinales a lo largo de éstas. El polen liberado es granular y está embebido en una masa mucilaginosa. Debido al movimiento del agua se forman largas cadenas de polen que se mueven como filamentos justo arriba del sedimento (tienen flotabilidad negativa). La distancia de dispersión del polen es muy corta, de solo unos metros (com. personal Dra. B.I. van Tussenbroek).

Se pueden distinguir tres niveles de transporte espacial de genes: 1) la dispersión del polen, 2) el transporte de los frutos flotantes por viento y marea, el cual se considera una dispersión a larga

distancia (dispersión fase I) y 3) el movimiento de las semillas en el fondo del mar, el cuales una dispersión local (dispersión fase II, Chambers y MacMahon 1994).

Los frutos tienen una forma globular, con un diámetro de aproximadamente de 20 - 25 mm y llegan a su madurez entre julio y octubre (Figura 1.6). Dentro de los frutos se encuentran por lo regular de 2 a 3 semillas (Figura 1.6, No.3), pero puede haber entre uno y seis (Van Tussenbroek *et al.* 2006). Las semillas son criptovivíparas (Tomlinson 1986) y

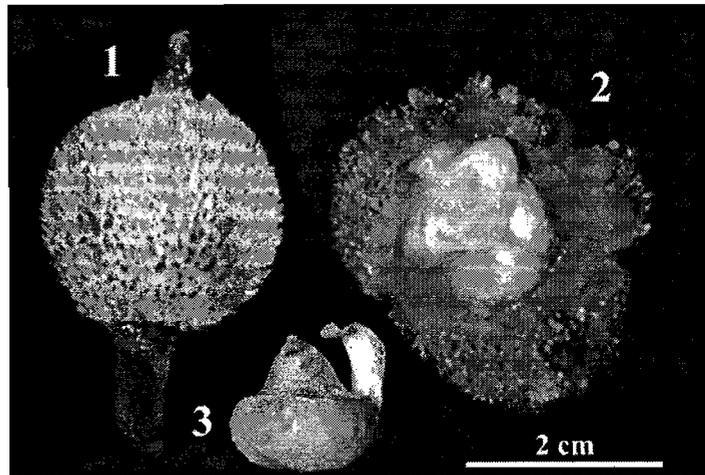


Figura 1.6 *Thalassia testudinum* 1. Fruto maduro (flota). 2. Fruto maduro abierto con 3 semillas en su interior. 3. Semilla criptovivípara (no flota).

brotan dentro del fruto sin perforar el pericarpio antes de ser liberadas. El fruto, al desprenderse del pedúnculo, flota en la superficie del agua y puede desplazarse a largas distancias. Sin embargo, más del 90% de los frutos abren mientras todavía están adheridos a la planta madre, liberando las semillas dentro de la pradera madre (Jiménez Durán 2004). Esto corresponde a la fase II de la dispersión, pero la distancia recorrida es casi insignificativa, ya que se mueven unos cuantos metros debido a que las semillas son negativamente boyantes. A veces las semillas logran flotar durante unas pocas horas (Kaldy y Dunton 1999). Los frutos flotantes son los propágulos de dispersión a larga distancia (dispersión fase I), y pueden flotar hasta por 10 días (Jiménez Durán 2004; Kaldy y Dunton 1999). La distancia máxima de transporte del fruto va de 15 km a ~100 km. Para *T. hemprichii* se conocen datos resultados similares, con un transporte estimado de 73.5 km con 7.2 días de flotación máxima (Lacap *et al.* 2002). Esto sugiere que debe existir un alto nivel de flujo genético entre las poblaciones.

Aunque *T. testudinum* produce muchos frutos, relativamente pocos llegan a establecerse (Van Tussenbroek *et al.* 2006; Kaldy y Dunton 1999), sin embargo, se observan con frecuencia juveniles no anclados menores de un año (Van Tussenbroek *et al.* 2006; Kaldy *et al.* 1999; Williams y Adey 1983; Lewis y Phillips 1980). Hasta el momento no se ha definido con claridad cuál es la función de la reproducción sexual de esta especie. Van Tussenbroek *et al.* (2006) plantearon, que la reproducción en *T. testudinum* debe ser de gran importancia para el mantenimiento de la diversidad genética local de las praderas y que la dispersión de los frutos flotantes es una estrategia para la colonización de áreas lejanas.



Figura 1.7 Pradera de *Thalassia testudinum* junto con *Syringodium filiforme*.

Importancia de los pastos marinos.

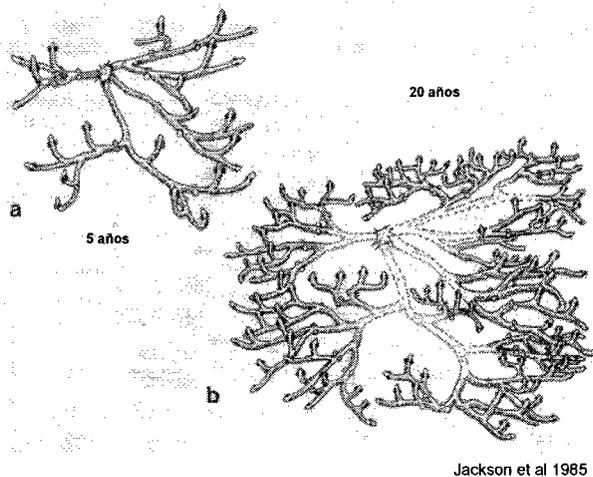
Las praderas de pasto marino en el mundo han perdido una superficie de 33,000 km² en los últimos 20 años (Walker *et al.* 2006; Green y Short 2003) debido a un gran número de factores, entre los cuales los más importantes son el incremento en la disponibilidad de nutrientes, en la afluencia de sedimentos, la presencia de especies invasoras, la incidencia de alteraciones hidrodinámicas y la pesca comercial (Orth *et al.* 2006a). La pérdida de estos sistemas tiene consecuencias que no involucran sólo a los pastos marinos en si mismos, sino que causan la pérdida de un gran número de especies que dependen de éstos (Kenworthy *et al.* 2006). Muchas especies de algas e invertebrados

crecen sobre las hojas de las plantas o buscan su refugio entre ellas; además, son el alimento directo de un gran número de especies como las tortugas marinas, los peces loro, y los manatíes, por mencionar algunos. Además de ser un bio-facilitador, los pastizales son sistemas de suma importancia para la protección de las costas, lo cual es una de las aportaciones más importantes de estas plantas para el ser humano. Conservar estos sistemas es de vital importancia, por lo que la información sobre la ecología de comunidades y la fisiología de estas plantas es abundante. Sin embargo la información sobre los individuos genéticos y su clonalidad apenas se está empezando a abordar para unas cuantas especies. Información sobre la estructuración genética local y general, el flujo genético, la diversidad genética y clonal, las edades de los genets y la distribución de ésta en las poblaciones naturales, es de gran utilidad para el desarrollo de planes adecuados de manejo y conservación. Además, puede dar una estimación de la tasa de cruzamiento sexual y el impacto que este tiene sobre los niveles de variabilidad genética. Estas variables, que pueden obtenerse únicamente con técnicas moleculares, facilitarían la justificación de, por ejemplo, el tamaño y la ubicación de los polígonos de las áreas marinas protegidas, o en el caso de un proyecto de restauración, si es importante el origen y el tamaño de los trasplantes.

Una de las costas más vulnerables de México es la de la Riviera Maya en Quintana Roo, que ha sufrido un elevado impacto antropogénico en los últimos años debido al crecimiento explosivo de desarrollos humanos, principalmente turísticos. Estos cambios representan una nueva presión y combinados con las perturbaciones naturales, pueden tener un efecto que sobrepase los límites de tolerancia de la especie. Además, la zona es de alto riesgo de huracanes. Recientemente el de mayor impacto fue el huracán Wilma que azotó por más de 60 horas (del 20 al 22 de octubre del 2005) las costas norteñas del Caribe mexicano. La importancia de estos pastizales (áreas dominadas por pastos marinos) y la de los arrecifes se demostró claramente con este evento, pues las costas que carecían de estos sistemas naturales fueron erosionadas en mayor o menor medida.

Los pastos marinos han sido sistemas “olvidados” durante mucho tiempo y su estudio intensivo inició en los años setenta. En ese entonces, las perspectivas de las investigaciones fueron principalmente enfocadas a elucidar la relación planta-factores abióticos, con un énfasis en la importancia ecológica de los pastos marinos para los ecosistemas costeros (Larkun y Den Hartog 1989; McRoy y Helfferich 1977). La investigación sobre estos temas recibió un impulso muy grande durante las últimas décadas y la conciencia sobre la importancia ecológica y económica de los pastos marinos se incrementó, cuando una enfermedad - “wasting disease” - fragmentó grandes pastizales en las costas europeas y la costa Atlántica templada de Norte América (Den Hartog 1987). Para *Thalassia testudinum*, que es una planta que ha sido bien estudiada, los temas de análisis se han centrado principalmente sobre aspectos fisiológicos y ecológicos (Enríques *et al.* 2001; Van Tussenbroek *et al.* 2000; Herzka y Dunton 1997; Van Tussenbroek 1996; Van Tussenbroek *et al.* 1996; Merino *et al.* 1995; Cox y Tomlinson 1988; Durako y Moffler 1985). Los estudios de genética poblacional de los pastos marinos son más recientes aún, y se han realizado algunos en *T. testudinum*, enfocados principalmente a analizar la estructura genética local y regional (Larkin *et al.* 2006; Waycott y Barnes 2001; Davis *et al.* 1999; Kirsten *et al.* 1998; Schlueter y Guttman 1998). Las técnicas utilizadas en estos estudios (Tabla 1.1) no permitían la caracterización de los genets en las poblaciones, y son muy laboriosas o costosas. Por otro lado, actualmente las técnicas genéticas moleculares se han convertido en una herramienta cotidiana en los laboratorios, con la capacidad de procesar grandes números de muestras. Para el estudio de la dinámica poblacional de los pastos marinos y de las plantas clonales en general, son indispensables marcadores genéticos con una alta diversidad. Esto se debe a que el seguimiento del desarrollo desde sus semillas *in situ* es muy difícil de realizar, y no es posible observar la propagación vegetativa (subterránea) físicamente, y es donde los marcadores genéticos vendrían en juego para establecer los genotipos de los diferentes genets (Ouborg *et al.* 1999).

La unidad genética o grupo de individuos fisiológicamente independientes pero genéticamente idénticos se conoce el genet, e integra todo el tejido que fue formado por medio de propagación clonal a partir de un único cigoto. El ramet, por su parte, es el módulo o conjunto de módulos capaz de sobrevivir independientemente (Lincoln *et al.* 1998; Harper 1990). Los pastos marinos tienen la capacidad de formar genets de gran tamaño, como lo demostró Reusch *et al.* (1999a) para *Zostera marina* en el Mar Báltico. Con el tiempo los genets van aumentando de tamaño, pero al mismo tiempo van perdiendo los contactos físicos entre sus partes por la desintegración de los tejidos de los rizomas horizontales (Reusch y Chapman 1995, Figura 1.8). Esa desintegración generalmente es producto del envejecimiento del rizoma horizontal. Los espacios creados por la mortalidad parcial del genet son recolonizados por elongación de los rizomas de otros individuos, o del mismo genet. La propagación vegetativa tiene como consecuencia que un genet pueda ser muy grande y casi inmortal, si las condiciones lo permiten. El resultado de esta forma de crecimiento es la virtual imposibilidad de identificar visualmente a un genet *in situ*, siendo la única alternativa el uso de marcadores genéticos para poder distinguir unos genets de otros.



Jackson et al 1985
Figura 1.8 De Jackson *et al.* (1985). Ejemplo genérico de una planta terrestre clonal que pierde sus conexiones físicas en el transcurso de los años.

Los marcadores genéticos.

El análisis de la diversidad genética y la relación entre poblaciones y especies ha sido de gran importancia en las últimas décadas para un gran número de disciplinas de la biología y la medicina (Weissing *et al.* 2005). En el transcurso del tiempo se han desarrollado un gran número de técnicas moleculares que han aportado una mayor resolución para el análisis de la diversidad genética, lo que ha sido una herramienta invaluable para disciplinas como la embriología, la ecología, la morfología y la fisiología. Un marcador genético se basa en la probabilidad de detectar el polimorfismo del ADN o de las proteínas generadas por él. La presencia de estos polimorfismos permite realizar comparaciones a nivel molecular, y hacer interpretaciones sobre la filogenia, la taxonomía y la genética poblacional basadas en cambios de las secuencias del ADN. Un marcador molecular adecuado para el análisis de la variabilidad genética de una población debe tener las siguientes características; 1. debe ser moderadamente a altamente polimórfico; 2. debe ser co-dominante (en donde se reconocen los homo- y heterocigotos); 3. debe tener alelos únicos no ambiguos; 4. debe tener una alta frecuencia en el genoma; 5. debe tener una distribución homogénea en el genoma; 6. debe ser neutral; 7. ser de fácil acceso y reproducción; 8. contar con un protocolo sencillo de visualización, 9. transferible entre laboratorios, 10. de bajo costo, diseño y reproducción (Weissing *et al.* 2005).

No existe ningún marcador que cumpla con todas las características arriba mencionadas, y la selección del marcador a utilizar en cada caso depende de la especie, el objetivo y el presupuesto que se tenga. Uno de los primeros marcadores utilizados fueron los polimorfismos de productos del ADN (i.e. proteínas), siendo de los más conocidos son las alozimas. Las alozimas son variaciones pequeñas de una misma enzima, y su polimorfismo se distingue por diferencias en las cargas eléctricas, los tamaños de las proteínas, y su estructura terciaria. Para esta técnica, se separan extractos de un organismo por la acción de un campo eléctrico en geles de almidón, y el producto se

hace visible a través de activar la reacción enzimática y la visualización de los compuestos que sintetizan. Otras técnicas se enfocan directamente a la secuencia del ADN y las mutaciones que se llevaron a cabo en el transcurso del tiempo. En estos casos los polimorfismos consisten principalmente en cambios de bases o inserciones / deleciones o "in-dels".

Las técnicas de análisis molecular han avanzado mucho con el descubrimiento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) o mejor conocida como PCR (Polimerase Chain Reaction) introducida por el Dr. Kary Mullis en 1983. Con esta técnica, los fragmentos de ADN se pudieron reproducir infinitamente. A partir de su uso, se ha generado un gran número de marcadores genómicos nuevos. La ventaja de los marcadores basados en PCR es que no todas las técnicas requieren secuenciar los productos, pues muchas de ellas se basan en la ausencia o presencia de bandas o en los tamaños los productos generados.

No todos los productos de PCR son un marcador genético. Es esencial que los fragmentos de ADN contengan una variación en su secuencia. Los fragmentos con polimorfismos se visualizan por medio de la separación en un gel, por la acción de una carga eléctrica, y los alelos se definen por su tamaño. Existen dos tipos de marcadores, los dominantes y los co-dominantes. Los marcadores dominantes son marcadores que no distinguen hetero- u homo-cigosidad. Ejemplos de marcadores dominantes son los RAPDs (PCR con primers que amplifican al azar), los RFLPs (polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción), la identificación de polimorfismos ISSR, y la mayoría de los AFLPs (polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados). Por otro lado un marcador co-dominante visualiza dos alelos por muestra (si el individuo es diploide), y es posible hacer interpretaciones sobre el intercambio de genes, ya que se deben de comportar de manera mendeliana. El poder discriminar entre heterocigosidad y homocigosidad permite hacer conclusiones mucho más profundas sobre el estado de una población o entre poblaciones, ya que es posible evaluar si existe endogamia o si la población pasó por un cuello de botella, así como analizar si la población se

CAPITULO 1. Introducción.

encuentre en equilibrio de Hardy-Weinberg (Goldstein y Schlötterer 1999; Jarne y Lagoda 1996). Los marcadores co-dominantes más conocidos son las alozimas que generalmente no presentan una alta diversidad, y los microsatélites, o SSRs (Simple Sequence Repeats), que se caracterizan por ser altamente polimórficos. Los microsatélites son los marcadores más básicos de los existentes en este momento ya que constantemente se están desarrollando nuevos marcadores (como se puede ver en la revista *Molecular Ecology Notes* recientemente modificada a *Molecular Ecology Resources*). Generalmente, en un ensayo se utilizan varios marcadores diferentes, dominantes o co-dominantes, para poder distinguir con un nivel de significancia entre los individuos o las poblaciones. El número de marcadores utilizados depende del objetivo del estudio.

Los microsatélites.

Los estudios genéticos en plantas con el uso de microsatélites han dado un gran impulso en los estudios de la estructura genética de las poblaciones (Ouborg *et al.* 1999). Los microsatélites son secuencias de una longitud de dos a seis pares de bases de ADN que se repiten consecutivamente (Goldstein y Schlötterer 1999; Bruford y Wayne 1993). El número de repeticiones puede variar entre individuos y la combinación de alelos de varios loci de microsatélites establece un código casi único para cada individuo genético. El número de repeticiones por fragmento de ADN amplificado se detecta por medio de la separación de los fragmentos según su tamaño, en un gel, generalmente de poliacrilamida. Los microsatélites se heredan de manera mendeliana cuando provienen de ADN nuclear. Esto se debe a que la secuencia del marcador se encuentra en los dos cromosomas. Un cromosoma se hereda por parte de la madre y el otro por el padre. Un microsatélite representado como un locus (singular de loci) se visualiza por medio de la amplificación por PCR con el uso de cebadores o primers específicos. El fragmento de ADN amplificado (generalmente de entre 100 y 300 pares de bases) contiene la secuencia del microsatélite, y en el caso de que sea polimórfico, la

longitud del fragmento es variable debido a variaciones en el número de copias de la unidad repetida. Estas diferencias se expresan en el desplazamiento de bandas en el gel. Cada fragmento con diferente desplazamiento contiene un número diferente de repeticiones del microsatélite y se reconoce como un alelo (Goldstein y Schlötterer 1999).

La ventaja de los microsatélites sobre otros marcadores es su precisión, versatilidad, así como su herencia mendeliana. Los microsatélites como marcadores genéticos son específicos para cada especie, aunque pueden encontrarse también e incluso ser polimórficos en especies cercanas (Reusch 2000). Hasta el momento se han desarrollado microsatélites sólo para algunas especies de pastos marinos (Coyer 2004; Alberto *et al.* 2003a; Alberto *et al.* 2003b; Reusch 2000; Procaccini y Waycott 1998). El número de microsatélites utilizado para cada análisis depende de la resolución que se quiera obtener. En general, se considera que para un análisis inter-poblacional se pueden usar menos loci, o loci menos diversos, que cuando se analiza la estructura intra-poblacional, aunque esto no se puede considerar como una regla. Una de las razones de que los microsatélites sean tan populares, especialmente en la biología de especies clonales, es que se puede distinguir con gran certeza si los ramets pertenecen a uno o a varios genets, aún cuando estén separados por una gran distancia y no estén conectados físicamente.

Genética poblacional en pastos marinos.

Los pastos marinos, en comparación con otros grupos de plantas, tienen varios aspectos interesantes para realizar estudios poblacionales: 1) son las únicas angiospermas en el ambiente marino; 2) la mayoría de las especies son fáciles de localizar y de fácil acceso; 3) la estructura comunitaria es relativamente sencilla, reduciendo el número de interacciones con otras especies; y 4) son plantas clonales por excelencia, lo cual permite una comparación de las posibles consecuencias de la reproducción sexual vs. propagación vegetativa en organismos modulares.

Ciertos estudios han encontrado que la variabilidad genética de los pastos marinos varía mucho dependiendo de la especie y de su localización geográfica. En el Mediterráneo, las poblaciones de *Posidonia oceanica* se caracterizan por una baja diversidad genética (Tabla 1.1), en comparación con otras especies de pasto marino (Procaccini y Mazzella 1998; Procaccini y Waycott 1998; Procaccini *et al.* 1996). Esto posiblemente se debe a que el género *Posidonia* consiste de plantas monoicas con flores hermafroditas (Gobert *et al.* 2006; Den Hartog 1970), y sus poblaciones se mantiene principalmente por medio de propagación vegetativa (Gobert *et al.* 2006). Procaccini y Mazella (1998) encontraron que en el Golfo de Nápoles, Italia, la variabilidad genética de sus poblaciones estaba positivamente relacionada con la frecuencia de la reproducción sexual, sugiriendo que la baja diversidad genética era provocada por la falta de reproducción sexual. Los mismos autores también observaron que existía una diferenciación genética entre las poblaciones de aguas someras y profundas, que probablemente era ocasionada por una termoclina que determina que difiera la temporada de reproducción sexual entre ambos grupos. En otra región, al norte del Mar Adriático, la escasa diversidad también fue evidente, ya que se encontró un pastizal de *P. oceanica* de gran tamaño sin variación entre las muestras. No se pudo asegurar si este pastizal era un genet o no, ya que todos los microsatélites utilizados resultaron ser homocigotos (Ruggiero y Procaccini 2002), lo que puede ser el resultado de un alto grado de consanguinidad no identificable. Otra especie en la que se registro una baja variabilidad genética es *Amphibolis antarctica* (Waycott *et al.* 1996), para la cual no se encontró ningún polimorfismo en 13 poblaciones con el uso de alozimas.

No se puede generalizar que exista una baja diversidad genética para todos los pastos marinos. Por ejemplo, la especie monoica de mares templados *Zostera marina*, tiene una alta variabilidad genética comparada con las especies anteriormente mencionadas (Olsen *et al.* 2004; Reusch *et al.* 2000). Una de las razones que puede explicar este hecho es la alta frecuencia de su reproducción sexual, pues esta especie está entre las más activas sexualmente de los pastos marinos

en general. Los primeros estudios genéticos con esta especie mostraron que presenta una variabilidad genética limitada, utilizando alozimas (Williams y Orth 1998; Williams y Davis 1996) y RFLP's (Alberte *et al.* 1994; Fain *et al.* 1992). Sin embargo, con el desarrollo de microsatélites para esta especie se registró un grado de polimorfismo mucho mayor (Olsen *et al.* 2004; Reusch *et al.* 2000; Reusch *et al.* 1999b). Utilizando seis loci polimórficos y un total de 12 poblaciones de *Z. marina* del Mar de Norte, Mar Báltico y Nueva Escocia se encontró que la incidencia de organismos heterocigotos (aproximadamente 50% de total) fue diez veces mayor que la reportada en otros estudios genéticos (Reusch *et al.* 2000; Reusch *et al.* 1999b). La diferencia genotípica entre las poblaciones fue sorprendente; mientras que algunas poblaciones consistían de 40 genotipos diferentes, dos poblaciones fueron casi monoclonales. Las proporciones genotípicas de la mayoría de las poblaciones de *Z. marina* se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg (excepto las poblaciones monoclonales), indicando que existen tasas insignificantes de endogamia. En un trabajo anterior, Reusch *et al.* (1999a) ya habían mencionado que una de las poblaciones monoclonales ocupaba una extensión de 160 × 40 m, lo que corresponde a una edad de más de 1000 años, siendo una de las plantas más viejas registradas en el mundo.

Hasta el momento se han realizado varios trabajos genéticos con la especie de interés, *Thalassia testudinum*. Uno de los primeros trabajos utilizó electroforesis de alozimas, y logró identificar varios genotipos en poblaciones de los Cayos de Florida (EUA) (Schlueter y Guttman 1998). El trabajo de Kirsten *et al.* (1998), realizado en la misma área y en Jamaica, utilizó RAPD's como marcador y detectó una diversidad genética mucho más alta, la cual nunca antes había sido encontrada. Estos autores observaron que la mayor parte de la varianza molecular se encontraba dentro de las poblaciones, con 81% de la diversidad genotípica dentro y 19% entre las poblaciones. Además, encontraron que con el uso de estos marcadores las poblaciones se diferenciaron a una distancia de 2-3 km. Larkin *et al.* (2006) utilizó la misma técnica en dos poblaciones de la Laguna

Tabla 1.1 Resumen de las variables de genética poblacional de los trabajos representativos en 6 especies de pasto marinos. Debajo de la primera línea doble están representados tres estudios de mangles (no clonales), *Rhizophora mangle*, *Avicennia germinans* y *A. marina*. Debajo de la segunda línea doble se encuentra una selección de trabajos de plantas clonales terrestres y acuáticas. Estas son *Thypha latifolia* y *T. angustifolia* (acuáticas), *Butomus umbellatus* (acuática), *Fallopia japonica* (terrestre) y *Stenocereus eruca* (cactacea). Las variables presentadas son el tipo de marcador utilizado, el número de loci y alelos utilizados, el número de poblaciones y el número de muestras colectados por población, el intervalo de muestreo con superficie de muestreo si posible y el tipo de colecta. La escala de trabajo relativo al área de distribución geográfica. La diversidad clonal por población fue representada por R ($G-1/N-1$) o G/N y el promedio, la clonalidad general es representada por el número de muestras y genets. Como variables genéticas están representadas, la unidad panmictica calculada, la diversidad genética H_E promedio con su valor mínimo y máximo. También se anotaron los valores máximos y mínimos de diferenciación genética (F_{ST}) entre pares de poblaciones Y finalmente el valor de estructuración genética F_{ST} calculado por medio de una AMOVA.

Especie estudiada	Marcador	# loci / # alelos	# poblaciones / # muestras por población	Intervalo de muestreo por población	Escala	diversidad clonal	# ramets / # genets	Unidad # panmictica estimada	H_E por población (mín - max (<i>Prom</i>))	F_{ST} entre pares de poblaciones	AMOVA global	F_{ST}	Referencia
<i>Amphibolis antarctica</i>	Alozymas	9 / 14	13 / 5-48	AZ	R 1100 km	$R = 0.00$	199 / 1	-	-	-	-	-	Waycott <i>et al.</i> 1996
<i>Cymodocea nodosa</i>	Msats	9 / 83	2 / 220	xy (20 x 38 m)	R 1800 km	$R = 0.38 - 0.42 (0.21)$	440 / 95	-	0.519 - 0.583 (0.551)	-	-	-	Alberto <i>et al.</i> 2005
	Msats	8 / 45	10 / 35-39	xy (60 x 14 m)	R 15-300 km	$R = 0.59 - 0.94 (0.68)$	373 / 255	np	0.286 - 0.480 (0.406)	0.040 - 0.425	-	-	Alberto <i>et al.</i> 2006
<i>Halophila ovalis</i>	Inter-SSR	41 b	3 / 50	xy (50 x 50 m)	L 8-12 km	$R = 1.00$	150 / 150	-	0.26 - 0.34	0.10 - 0.35	0.284	-	McMahon 2005
<i>Posidonia oceanica</i>	Alozymas	5 / 15	22 / 9-70	AZ 5m (200x200m)	T 5300 km	$R = 0.00 - 0.90$	634	-	0.000 - 0.110 (0.039)	-	0.623 ²	-	Waycott <i>et al.</i> 1997
<i>Posidonia oceanica</i>	Msats	6 / 14	6 / 20	AZ 7m	R 750 km	$G/N = 0.30 - 0.70 (0.33)$	120 / 39	-	0.190 - 0.380 (0.265)	-	0.139	-	Provacchini y Murella 1998
	Msats	12 / <57	34 / ~40	AZ (80 x 20 m)	T 10-3500 km	$R = 0.00 - 1.00 (0.72)$	1210 / 875	np	0.13 - 0.53 (0.43)	0.04 - 0.71	0.188* 0.226*	-	Arnaud-Haond <i>et al.</i> 2007b
<i>Zostera marina</i>	Msats	6 / 67	12 / 25-97	AZ (20 x 40m)	T 12-10000 km	$R = 0.05 - 1.00 (0.74)$	545 / 371	np	0.31 - 0.61 (0.48)	0.007 - 0.529	0.29	-	Reusch <i>et al.</i> 2000
	Msats	9 / 232	49 / 25-100	AZ 1-1.5 m	T 10-10000 km	$R = 0.03 - 1.00 (0.70)$	< 2000 / 1400	150 km	0.150 - 0.688 (0.450)	~ 0.0 - 0.67	-	-	Olsen <i>et al.</i> 2004
	Msats	9 / <84	9 / 21-57	AZ 20-100 m	R 220-2300 km	$R = (1.00)$	328 / 328	-	0.48 - 0.68 (0.57)	0.04 - 0.38	0.159* 0.130*	-	Muñiz-Salazar <i>et al.</i> 2005
	Msats	8 / ~75	7 / 16-26	AZ 20-100 m	L 4-22 km	$R = (1.00)$	146 / 146	-	0.473 - 0.547 (0.520)	0.00 - 0.95	-	-	Muñiz-Salazar <i>et al.</i> 2006
<i>Zostera noltii</i>	Msats	9 / 195	33 / 45-50	1 m (60 x 20 m)	T 2-8000 km	$G/N = 0.02 - 1.00 (0.70)$	~1600 / 1118	100-150 km	0.167 - 0.675 (0.523)	0.0 - 0.800	-	-	Coyer <i>et al.</i> 2004
	Msats	9 / 106	8 / 30-50	AZ (60 x 20 m)	R 60-990 km	$R = 0.33 - 0.90 (0.63)$	372 / 233	-	0.442 - 0.630 (0.570)	0.079 - 0.260	-	-	Diekmann <i>et al.</i> 2005
<i>Thalassia testudinum</i>	Alozymas	5 / 13	18 / 24-35	AZ 2m	L 1-30 km	$R = 0.09 - 0.25 (0.05)$	468 / 23	-	0.009 - 0.046 (0.027)	-	0.050 ²	-	Schlueter y Guttman 1998
	RAPD	29 b	4 / 6-15	AZ 5m	R 2-1500 km	$R = 0.33 - 1.00 (0.76)$	38 / 29	-	-	0.094 - 0.318	0.190	-	Kirsten <i>et al.</i> 1998
	Inter-SSR	10 b	10 / 10	AZ (25 cm)	L 25 km ²	$R = (0.29)$	74 / 22	-	-	-	0.426	-	Davis <i>et al.</i> 1999
	AFLP	(260) 29 b	3 / 36	AZ 2m 100m ²	R 1-2700 km	$R = (0.94)$	51 / 48	-	(0.33)	0.01 - 0.13	0.054	-	Waycott y Barnes 2001
	RAPD	12 b	2 / 40	5 m (100 x 100m)	R 185 km	$R = (0.28)$	80 / 23	-	-	0.084	0.084	-	Larkin <i>et al.</i> 2006
<i>Rhizophora mangle</i>	Msats	3 / 17	5 / 16-21	50 m	R 500 km	-	92	-	0.601 - 0.723	0.00 - 0.163 *	0.054	-	Arbúlez-Cortés <i>et al.</i> 2007
	Alozymas	6 / 16	14 / 50	AZ 100m	R 50 - 5000 km	-	-	-	0.055 - 0.191 (0.123)	0.253 - 0.073*	0.287	-	Náñez-Farfán <i>et al.</i> 2002
<i>Avicennia germinans</i>	AFLP	349 b	14 / 10	50 m	T 100-10000 km	-	144	-	0.056 - 0.189	-	0.410	-	Dodd <i>et al.</i> 2002
<i>Avicennia marina</i>	Msats	3 / 70	14 / 10-20	-	T 500-10000 km	-	200	-	0.000 - 0.853 (0.407)	0.049 - 0.818	0.410	-	Maguire <i>et al.</i> 2000
<i>Thypha latifolia</i>	Msats	9 / 52	11 / 25-50	>1m	R 50 - 700 km	$G/N = 0.47 - 0.86 (0.61)$	311 / 197	-	0.18 - 0.45 (0.29)	0.06 - 0.41	0.246	-	Tsyusko <i>et al.</i> 2005
<i>Thypha angustifolia</i>	Msats	11 / 125	13 / 25-31	>1m	R 50 - 700 km	$G/N = 0.20 - 0.69 (0.40)$	348 / 138	np	0.23 - 0.65 (0.49)	0.07 - 0.35	0.248	-	Tsyusko <i>et al.</i> 2005
<i>Butomus umbellatus</i>	RAPD	14 b	10 / 30-50	-	R 1 - 2000 km	$R = 0.10 - 0.50 (0.17)$	192 / 34	-	-	-	-	-	Eckert <i>et al.</i> 2003
	-	12 b	42 / 2	-	R 1 - 2000 km	$R = 0.11 - 0.17 (0.14)$	84 / 15	-	-	-	-	-	Eckert <i>et al.</i> 2003
<i>Fallopia japonica</i>	Msats	7 / 21	3 / 21-23	2 - 5 m	R	$R = 0.20 - 0.66 (0.38)$	66 / 26	-	0.317 - 0.450 (0.366)	-	-	-	Grimsby <i>et al.</i> 2007
<i>Stenocereus eruca</i>	RAPD	(75) 57 b	4 / 30	30-40 m (1500 m)	R 50 - 200 km	$G/N = 0.80 - 0.87 (0.83)$	120 / 100	np	0.255 - 0.301 (0.277)	-	0.337	-	Clark-Tapia <i>et al.</i> 2005
			1 / 282	xy 10 x 60 m	L (60 m)	$G/N = (0.387)$	282 / 109	-	0.359	-	-	-	Clark-Tapia <i>et al.</i> 2005

* promedio de variación genética entre las poblaciones dentro de las 2 regiones asignadas.

² variación genética entre las 2 regiones asignadas.

³ Poblaciones del Decano Atlántico y Pacífico

np = no presente en las poblaciones y los marcadores utilizados.

Msats = Microsatélites

b = Bandas polimórficas

AZ = Al Azar

xy = con coordenadas

L = Local

R = Regional

T = Área geográfica total

$R = (G-1)/(N-1)$ diversidad clonal corregida

G/N diversidad clonal no corregida ($G = \#$ genets, $N = \#$ de muestras totales)

² = G_{ST}

** = promedio μ entre loci

Madre (EUA), registrando por lo general una baja diversidad genética. De las dos poblaciones analizadas, la población de Lower Laguna Madre (LLM) demostró tener una mayor diversidad que la de Red Fish Bay, lo que los autores atribuyeron a una mayor incidencia de reproducción sexual en la primera. A su vez Davis *et al.* (1999) utilizaron una técnica basada en microsatélites, llamada ISSR-PCR, o identificación de polimorfismos inter-SSR (Zietkiewicz *et al.* 1993) en la Bahía de Florida (EUA). Con el uso de este marcador dominante, estos autores detectaron que la variabilidad fue aún mayor que con las técnicas anteriormente utilizadas y descubrieron diferentes genotipos a distancias desde los 25 cm. Uno de los resultados más sobresalientes de este estudio fue que se confirmó que dentro de las praderas coexisten diferentes genets a pequeñas distancias. Esto ya se había visto en otras especies de pastos marinos, pero fue inesperada la escala espacial a la que se encontró esta alta diversidad clonal. Algo que no había sido registrado para esta especie, fue la relación positiva entre la distancia geográfica y la distancia genética, mejor conocida como aislamiento por distancia (Slatkin 1993). Esto sugiere una capacidad limitada de dispersión dentro de esta población.

Uno de los trabajos genéticos más recientes publicados sobre *T. testudinum* es el de Waycott y Barnes (2001), quienes utilizaron AFLPs como marcador. Estos autores compararon poblaciones de Panamá y Bermuda, entre las que se encontró una similitud muy alta (87% de las bandas polimórficas eran idénticas). Estas poblaciones están aproximadamente a 2700 km de distancia, por lo que no se esperaba encontrar un mismo genotipo en ambas. Esto se puede interpretar como una indicación de una alta migración de fragmentos vegetativos de *T. testudinum*, aunque también es probable que el nivel de diversidad del marcador no era suficientemente alto para detectar una diferencia. Esta similitud probablemente se puede atribuir a una baja diversidad genética de la especie y a una alta conectividad entre las poblaciones. Los autores sugieren el uso de marcadores co-dominantes con alto polimorfismo, como los microsatélites, para futuros trabajos. La mayoría de los estudios genéticos realizados hasta el momento con *T. testudinum* han sido de poblaciones de las

costas de Estados Unidos de América. El siguiente paso lógico a tomar sería determinar la diversidad genética en otras áreas, o mejor aún en toda el área de distribución de la especie, y de esta manera definir como están relacionadas las poblaciones de *T. testudinum*.

Las técnicas genéticas moleculares utilizadas hasta el momento no han detectado el nivel satisfactorio de polimorfismo para poder evaluar con detalle la estructuración genética de *Thalassia testudinum* a grandes escalas geográficas. El uso de microsatélites en otras especies de pasto marino han revelado que hay una diversidad significativa y desmintieron el supuesto de que los pastos marinos “por default” tienen una baja variabilidad genética. Con base en lo anterior, se sugiere el uso de microsatélites como marcador para el estudio genético poblacional de *Thalassia testudinum*. Esta técnica permite describir la estructura genética de la especie, por lo que pueden realizarse interpretaciones del flujo genético. Además, estos marcadores pueden dar una idea clara de la diversidad clonal dentro y entre las poblaciones, además de que permiten estimar las edades de los clones. Sin embargo es importante diseñar un muestreo intensivo que permita visualizar la distribución de la diversidad genética en toda el área de distribución. Este muestreo debe de ser a varias escalas espaciales, para poder hacer interpretaciones sobre los niveles de conectividad en el Caribe y el Golfo de México. Los resultados genéticos de *Thalassia testudinum* combinados con la información ya existente de su reproducción sexual y dispersión en el espacio, puede convertir a esta especie en un modelo con el cual comparar a otras, con respecto a su reproducción y dispersión marina.

Objetivos

General

Estudiar los patrones espaciales en la variabilidad genética de poblaciones del pasto marino *Thalassia testudinum* en el Atlántico occidental por medio de microsatélites para contribuir al conocimiento de la reproducción y los patrones de movilidad de esta especie.

Específicos

Desarrollo de microsatélites

- Adaptar protocolos establecidos para la localización de microsatélites para el pasto marino *Thalassia testudinum*.
- Desarrollar de 10 a 15 pares de primers (cebadores) para microsatélites polimórficos.

Genética de poblaciones a nivel geográfico (nacional):

- Evaluar el nivel de diferenciación genética entre las poblaciones de *Thalassia testudinum* de las costas atlánticas de México.
- Relacionar los datos genéticos con los datos de las corrientes marinas alrededor de la Península de Yucatán para analizar el posible efecto de éstas sobre la movilidad de los propágulos.
- Establecer la diversidad clonal de las poblaciones y estimar las edades de los genets por medio de la reconstrucción de sus tamaños.

Genética de poblaciones a nivel geográfico (internacional):

- Analizar la estructura genética de las poblaciones de *Thalassia testudinum* en toda su área de distribución.

CAPÍTULO 2

AISLAMIENTO DE MICROSATÉLITES Y DESARROLLO DE PRIMERS ESPECÍFICOS PARA *THALASSIA TESTUDINUM*.

Antecedentes

La angiosperma marina *Thalassia testudinum* es una planta clonal por excelencia que crece por medio de la extensión de rizomas horizontales y puede alcanzar un tamaño y una edad elevados. Por lo tanto, para estudios de genética poblacional con esta especie conviene utilizar, marcadores de alta definición como los microsatélites. En estudios pasados, se ha intentado evaluar la estructura genética de *T. testudinum* utilizando una variedad de técnicas genéticas moleculares (ver Capitulo 1). Los resultados indican que es frecuente encontrar individuos genéticamente diferentes a distancias espaciales relativamente cortas, y que a distancias mayores se observa una diferenciación genética baja, indicando una cierta homogeneidad entre las poblaciones. Waycott y Barnes (2001) encontraron una similitud genética extraordinaria entre las poblaciones de Panamá y Bermuda con el uso de AFLPs y sugirieron el uso de microsatélites como marcador para futuros trabajos. La desventaja de la mayoría de los marcadores utilizados anteriormente es que son dominantes y es imposible sacar conclusiones sobre su hetero- u homocigosidad. Tampoco ha sido posible evaluar con precisión los niveles de polimorfismo con estos marcadores, de tal manera que se pueda distinguir un genet de otro.

Los microsatélites son marcadores altamente específicos y para cada especie es necesario diseñarlos por separado, lo que alarga y hace más costoso el proceso de genotipificación, lo que generalmente se utiliza como una de las razones principales para no utilizar estos marcadores. Hay

que mencionar, que es posible que algunos loci de microsatélite sean polimórficos en otras especies, pero generalmente muy cercanas. Hasta el momento no se han aislado microsatélites para *T. testudinum*, y la disponibilidad de una cantidad razonable de microsatélites polimórficos (entre 8 y 12), permitiría determinar con mayor precisión las estrategias reproductivas de esta especie.

Colecta de material

Se colectó material biológico fresco frente a la Unidad Académica Puerto Morelos, del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM (N 20.840462° W 086.878450°, WGS-84). Se colectó un total de cinco haces de *Thalassia testudinum* en el pastizal en la zona costera y se trasladaron al laboratorio para llevar a cabo la extracción de ADN. La extracción requiere de tejido fresco, con una gran cantidad de núcleos, los cuales se encuentran en la parte interna de la vaina de los haces; en esta sección se localiza tejido blanco en donde se encuentra el meristemo intercalar de las hojas.

Aislamiento de los loci de microsatélites

El protocolo para el aislamiento de los microsatélites se detalla en el Anexo 1. Este protocolo está basado en la técnica descrita por Karagyozov *et al.* (1993), modificada por Arens *et al.* (2000; 2004). Los métodos y los resultados serán presentados juntos siguiendo.

Se realizaron dos enriquecimientos consecutivos. El primer enriquecimiento fue exitoso en un tiempo menor del esperado, y para obtener más microsatélites se decidió realizar el protocolo por segunda vez.

En la Figura 2.0 se encuentra un diagrama de flujo con todos los pasos que involucró el enriquecimiento.

CAPITULO 2. Aislamiento de microsátélites y desarrollo de primers específicos para *Thalassia testudinum*.

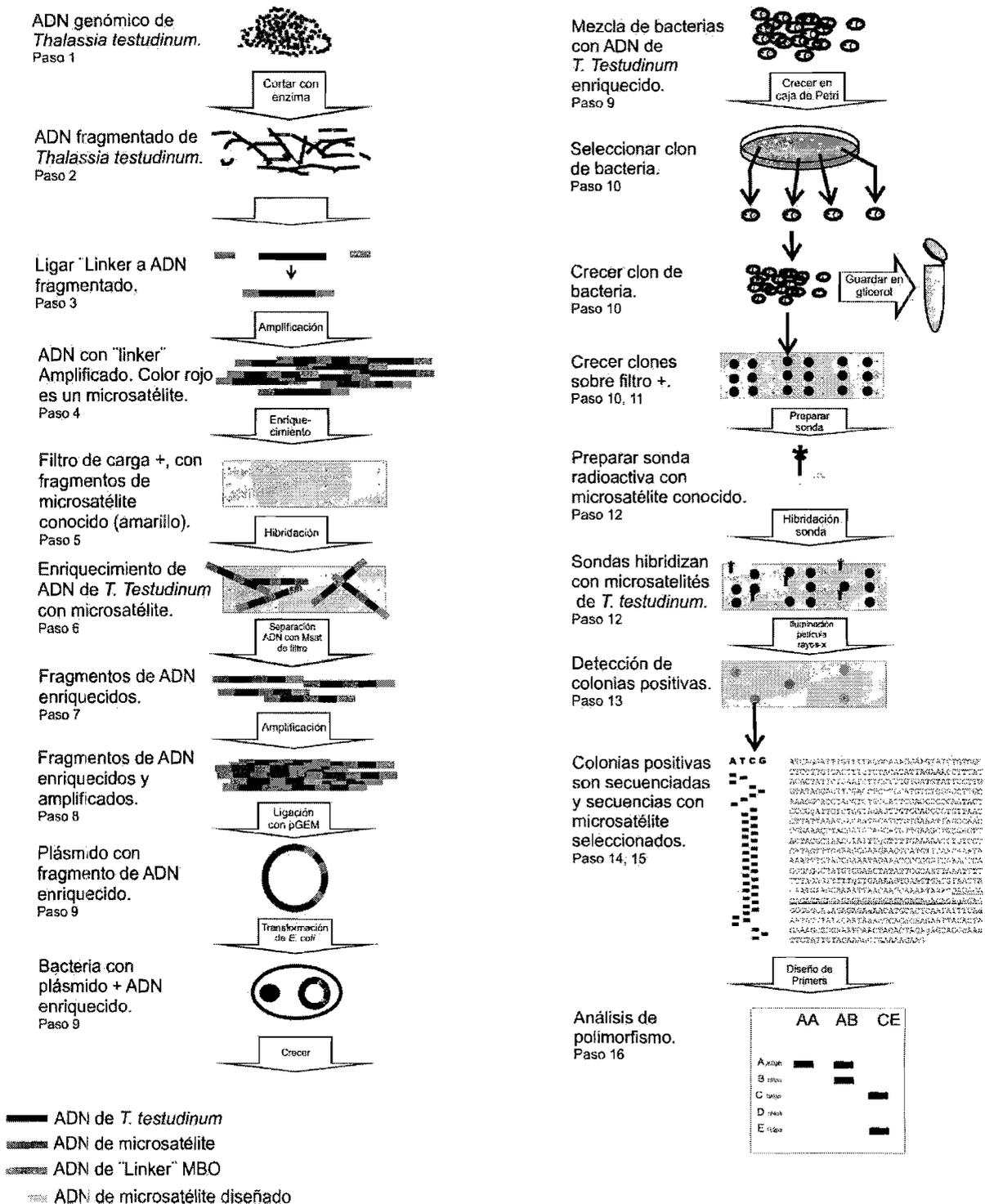


Figura 2.0 Diagrama de flujo de los diferentes pasos que involucró el proceso de enriquecimiento de microsátélites de *Thalassia testudinum*. El número de cada paso coincide con los números de los pasos de este capítulo.

1. Extracción de ADN

Se extrajo el ADN de los cinco haces de *Thalassia testudinum* por medio de columnas de QIAGEN (Plant DNeasy Mini Kit). El ADN liofilizado se transportó a la Universidad Radboud de Nijmegen, Holanda (Departamento de Ecología, bajo la supervisión del Dr. Joop Ouborg), en donde se realizó el proceso de enriquecimiento y aislamiento de los microsatélites. Previamente, se determinó la calidad y cantidad del ADN con el uso de un espectrofotómetro mediante la relación de A260 / A280 nm, debido a que se requería por lo menos de 15 µg de ADN de excelente calidad para poder llevar a cabo el proceso completo de aislamiento de los microsatélites.

Se seleccionaron dos de las cinco extracciones para llevar a cabo los siguientes pasos del enriquecimiento: la muestra 440 (Puerto Morelos, UAPM, ICMYL, UNAM) de la cual se obtuvieron 45 µg de ADN, y la muestra 441 ((Puerto Morelos, UAPM, ICMYL, UNAM) de la cual se obtuvieron 33.8 µg de ADN.

El ADN de las dos muestras se precipitó con EtOH (96%) + 10 % NaAC (pH 5.2, 3.0 M) y se diluyó en 50 µl de H₂O estéril desmineralizada (MilliQ). Durante este tratamiento generalmente se pierde una parte del ADN, por lo que se combinó el ADN de las muestras y se distribuyó en tres alícuotas de aproximadamente 15 µg de ADN cada una, suficiente para realizar tres enriquecimientos. Este ADN se utilizó para los enriquecimientos 1 y 2.

2. Digestión del ADN

En este paso se le añadió una enzima de digestión al ADN para fragmentarlo con el propósito de obtener fragmentos de ADN con un tamaño de entre 300 y 1200 pares de bases (pb).

Se realizó una prueba de digestión con una pequeña cantidad de la muestra de ADN 440₁ utilizando varias enzimas con el objeto de determinar cuál enzima sería la adecuada para realizar una digestión completa del ADN genómico de *Thalassia testudinum*.

Se digirió una alícuota de 2 µl de ADN con las siguientes enzimas a sus respectivas temperaturas: MBOI (37°C), ALU/RSA (37°C), BgLI (37°C) y MSEI (65°C). Como se puede observar en la Figura 2.1, el mejor resultado se obtuvo con la enzima MBOI; se puede observar también que la enzima BgLI no llevó a cabo ninguna fragmentación.

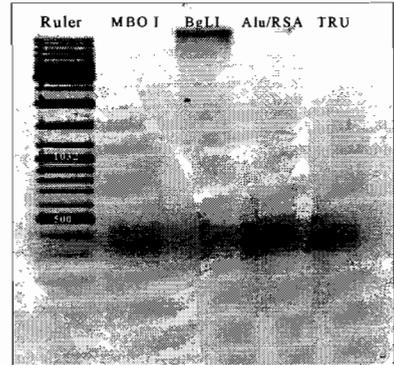


Figura 2.1: Resultados de la digestión de prueba del ADN de *T. testudinum* (muestra 440₁). Las enzimas utilizadas fueron MBOI, ALU/RSA, BgLI, y MSEI. El mejor resultado se obtuvo con la enzima MBOI.

Se realizó una digestión total del ADN de las muestras 440₁₋₃ con la enzima MBOI durante una noche en baño María a 37°C. Para determinar si el ADN se había fragmentado por completo, se corrió una muestra de cada reacción sobre un gel de agarosa al 1% (Figura 2.2). El ADN

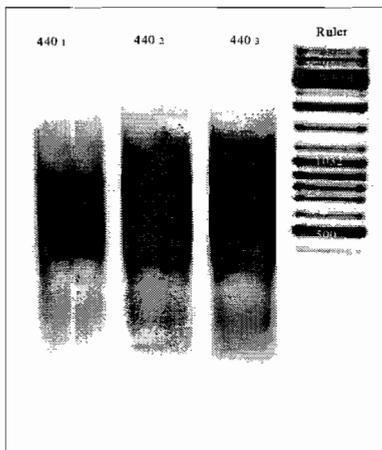


Figura 2.2: Digestión total de ADN (440_{1,2,3}) con la enzima MBOI. La muestra 440₂ fue usada para el enriquecimiento 1, y la muestra 440₃ para el enriquecimiento número 2.

fragmentado se purificó con una extracción de Fenol : Cloroformo : Alcohol iso-Amílico (25:24:1), seguida por una precipitación de 10% NaAc y EtOH. El ADN se diluyó en 100 µl de H₂O MilliQ (agua estéril desmineralizada). Se seleccionó el ADN de la muestra 440₂ para realizar el primer enriquecimiento y el ADN de la muestra 440₃ para el segundo enriquecimiento.

Para poder llevar a cabo los siguientes pasos del proceso, se realizó una selección de los fragmentos de ADN de un tamaño entre 300 y 1200 pares de bases. El ADN digerido se

corrió en un gel de agarosa al 1.5 % (2 horas a 50 V). Se usaron varios pozos por reacción (aprox. 30 µl por pozo). Se seleccionó el ADN de acuerdo a su tamaño y se cortó el gel con un bisturí estéril en los tamaños definidos con antelación utilizando como referencia la regla molecular de ADN-100 pb (Gene-Ruler, de Fermentas). Los fragmentos de agarosa con el ADN seleccionado se colocaron en una membrana de diálisis con 1 ml de amortiguador 0.5x TBE. La membrana se selló herméticamente y se colocó en un recipiente con amortiguador (1x TBE) para correr geles. La fuente de poder se encendió al máximo (150 V) durante 10 minutos. Este proceso sirvió para extraer el ADN de los fragmentos de gel. El amortiguador con el ADN se recolectó y el fragmento de agarosa se descartó. El líquido con los fragmentos de ADN de 300 a 1200 pb se depositó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se purificó el ADN por medio de una extracción de Fenol : Cloroformo : Alcohol iso-Amílico (25:24:1) seguido por una precipitación con 10% NaAc y EtOH. Finalmente se diluyó el ADN purificado en 40 µl de H₂O MilliQ.

Los siguientes pasos del enriquecimiento se realizaron dos veces por separado y serán llamados enriquecimiento 1 y 2. Los procesos fueron idénticos en ambos procesos.

3. Ligación del “Linker”

A los fragmentos de ADN seleccionados se le adhirió a ambos lados un fragmento de ADN con una secuencia conocida. A este fragmento de ADN de secuencia conocida se le conoce como un “linker” y tiene como función dar la posibilidad de amplificar, por medio de PCR utilizando primers estándar, los fragmentos seleccionados de ADN de *Thalassia testudinum* cuya secuencia se desconoce. Los linkers utilizados en este proceso fueron MBO I-F y MBO I-R que son secuencias

parcialmente complementarias, las cuales fueron sintetizadas comercialmente. Estas secuencias son las siguientes:

MBO I-F (5' – ACT CGA TTC TCA ACC CGA AAG TAT AGA TCC CA – 3')

MBO I-R (3' – CT AAG AGT TGG GCT TTC ATA TCT AGG GTC TAG – 5')

En un tubo Eppendorf se depositó 1,75 µl de MBO I-F (500 ng/µl) y 1,75 µl de MBO I-R (500 ng/µl) junto con 46,5 µl de H₂O MilliQ. El tubo con los fragmentos de ADN se colocó en un baño María a 90°C por 3 minutos, seguido por una aclimatización a temperatura ambiente (20°C). El ADN fragmentado de *T. testudinum* junto con el “linker” se ligaron con la enzima T4 Ligase en un tubo durante una noche a temperatura ambiente, en la oscuridad.

4. Amplificación de fragmentos flanqueados con el linker

Se amplificaron los fragmentos con linker por medio de PCR utilizando un primer únicamente. Este primer fue el oligonucleótido MBO I-F, y únicamente se utilizó uno ya que las secuencias de MBO I-F y R son complementarias. Se realizaron 8 ciclos de amplificación para obtener la cantidad de ADN necesaria para el siguiente paso. Los productos de amplificación se revisaron en un gel de agarosa para verificar que no hubiera habido una selección específica de ADN durante el PCR, lo que se hubiera expresado en la presencia de bandas nítidas de ADN, en lugar de un barrido continuo de ADN dentro los límites de

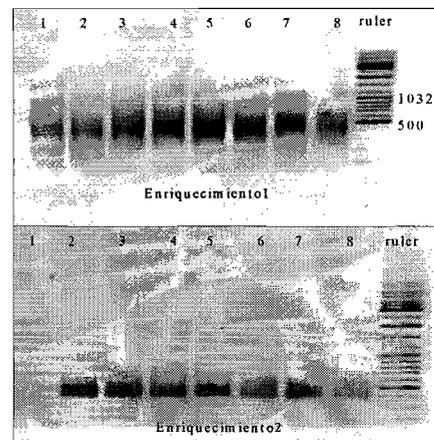


Figura 2.3: Resultados de la amplificación de fragmentos de *T. testudinum* flanqueados con linker utilizando el primer MBO I-F. La imagen superior corresponde al enriquecimiento 1 y la de inferior la del enriquecimiento 2.

tamaño seleccionados. Como se puede observar en la Figura 2.3, el enriquecimiento 1 dió como resultado un gradiente sin bandas dentro de los límites establecidos para las ocho amplificaciones realizadas. El enriquecimiento 2 fue menos gradual, pero también fue aceptable. El ADN amplificado se precipitó y se disolvió en 100 µl de H₂O MilliQ. Los productos se almacenaron a 4°C en espera del siguiente paso.

5. Preparación de filtros

Para detectar los fragmentos de ADN de *Thalassia testudinum* que contenían secuencias de microsatélites se realizó una hibridación de los fragmentos de ADN amplificados con filtros de nitrocelulosa (Nytran Super Charge (N+ Hybond Filter) cubiertos con oligonucleótidos con secuencias conocidas de microsatélites. Estos oligonucleótidos se ligaron a los filtros cargados positivamente por medio de una hibridación. Las secuencias de los oligonucleótidos con las cuales se realizó el enriquecimiento fueron: (1) GA₁₂, (2) GT₁₂, (3) AGT₉, (4) TGA₉, (5) TGT₁₀ y (6) TCT₁₀, que son secuencias de microsatélites con alta probabilidad de encontrarse en los genomas. Además, se prepararon dos filtros con una mezcla de secuencias de oligonucleótidos menos comunes, siendo un filtro de tri-microsatélites: (7) GAG₈, GTG₈, CGT₈, GCC₇, GCT₈ y TAA₁₂; y otro de tetra-microsatélites: (8) TGTT₈, GTAT₈, GATA₈, GACA₈, GGAT₇ y TCTT₈.

Se cortaron 80 discos de filtro de Ø 5 mm con una navaja circular, preparando 10 filtros de cada uno de los ocho tratamientos. Los filtros en forma de disco se marcaron con un código único para reconocer los tratamientos en los siguientes pasos. Sobre cada filtro se agregaron 10 µl de solución de oligonucleótidos de microsatélite (150 ng ADN/µl) y en el caso de los filtros mixtos, 2µl (25ng ADN/µl) de cada oligonucleótido seleccionado. Los filtros tienen una carga positiva, lo que tiene como consecuencia que el ADN (de carga negativa) se adhiera a ellos; el exceso del ADN

se eliminó con H₂O MilliQ. Para evitar que el ADN con las secuencias de microsátélites se separe de los filtros, éstos se hornearon por dos horas a una temperatura de 80°C, y se consideraron como los enriquecedores de microsátélites seleccionados. El ADN con secuencias complementarias tendrá una alta afinidad por estos filtros, mientras que el ADN sin estas secuencias no. Los filtros se prepararon para la hibridación con el ADN de *T. testudinum*. Todos los filtros fueron pre-hibridados juntos en un tubo durante una noche a 37°C, a lo que le siguió un enjuague con 1% SDS, cada tratamiento por separado. Los tubos se colocaron en agua en ebullición por 10 minutos y finalmente se almacenaron a -20°C. Los filtros se pueden de esta manera por tiempo indefinido.

6. Hibridación de ADN de *T. testudinum* a filtros

Para cada uno de los tipos de enriquecimiento (tratamiento 1-8) se seleccionó un tubo con filtro del paso anterior, al cual se le agregaron 600µl de amortiguador de hibridación y se colocó en una incubadora por 10 minutos a 37°C. A cada tubo se le agregaron 3 µl (app. 10µg) de primer MBOI-F (500 nM) y esta mezcla se incubó durante una hora (pre-hibridación). El exceso de primer sirvió para evitar que el ADN de *T. testudinum* con linker formara polímeros largos de ADN. Éstos se forman debido a que los extremos de los fragmentos de ADN son complementarios, lo que permite que se unan las puntas y forme cadenas. El primer bloqueó los extremos y así evitó pérdidas del ADN genómico de *T. testudinum*. El ADN obtenido en el paso cuatro, aproximadamente 10-20 µg, se desnaturizó durante 10 minutos a 96°C y se colocó en hielo para mantener el ADN en cadenas sencillas. A cada tubo con filtro se le agregaron 12,4 µl de este ADN y la mezcla se incubó durante dos días a 37°C con una velocidad de rotación de 200 rpm.

7. Separación de ADN de filtros

Al terminar la hibridación, el ADN no específico (no complementario al tratamiento), se enjuagó de los filtros por medio de una solución de 1.5 x SSC + 1% SDS. Este paso se realizó en un tubo con todos los filtros juntos y 10 ml de amortiguador. El tratamiento fue de 20 min. a 62°C. Los filtros con ADN enriquecido se colocaron en tubos separados y se enjuagaron con diferentes soluciones para recolectar el ADN hibridizado de interés. Los filtros se trataron con tres soluciones diferentes: A) 500 µl 0.5 x SSC + 1% SDS; B) 500 µl 0.2 x SSC + 1% SDS; y C) 500 µl 0.1 x SSC + 1% SDS. Las soluciones con ADN de cada tratamiento se recolectaron en diferentes tubos. Las soluciones constituyen una secuencia que va disminuyendo en concentración de SSC, de tal manera que se va disolviendo el ADN con mayor probabilidad de contener microsátélites hasta el último tratamiento. Los tratamientos duraron 30 minutos a 62°C cada uno. Al final de este proceso se recolectó el ADN enriquecido de los tres tubos de cada tipo de tratamiento, para dar un total de 24 tubos. Los filtros se almacenaron a -20°C como medida de precaución, en caso de que uno de los pasos hubiera fallado. El ADN enriquecido de los 24 tubos se precipitó con 1 µl de glicógeno, 100µl de cloruro de litio (10M) y 600 µl de isopropanol durante una noche a -20°C. Después de centrifugar las soluciones, los pelets secos se disolvieron en 20 µl de H₂O MilliQ y se almacenaron a -20°C para ser utilizados en los siguientes pasos.

En los pasos 5, 6 y 7 es difícil verificar que los procesos se están desarrollando de acuerdo a lo esperado, puesto que durante estos pasos no es posible visualizar por medio de geles u otras técnicas si el ADN está presente o no. Estos son los pasos más críticos del enriquecimiento, pues existen varios puntos en los que el ADN se puede perder. Además es difícil detectar la causa del fallo para

evitar el problema en el futuro. Durante los dos enriquecimientos realizados no hubo problemas significativos, lo que se expresa con una amplificación correcta del ADN en los próximos pasos.

8. Amplificación del ADN enriquecido.

Por cada tipo de tratamiento se preparó un tubo con 5 µl de solución proveniente de cada uno de los tres tubos obtenidos en el paso anterior. Con este ADN se realizó un PCR utilizando el primer MBOI-F-corto (5' – CA ACC CGA AAG TAT AGA TCC CA – 3'). En este caso se utilizó un primer más corto (i.e. el mismo que en los pasos anteriores, pero con 10 bases menos) para facilitar la amplificación. Este paso se repitió varias veces durante el primer enriquecimiento, ya que en los intentos iniciales no se obtuvo producto. Después de tres intentos de amplificación en los que se modificaron las concentraciones de MgCl₂ y del primer, la amplificación fue exitosa. Los productos obtenidos se separaron en un gel de agarosa al 1% (Figura 2.4). Lo más importante durante esta amplificación fue que no hubiera una selección específica de fragmentos ADN de un mismo tamaño y probablemente de un mismo origen, lo que se comprueba al obtener un gradiente de ADN sin bandas en el gel de agarosa, dentro de los límites de tamaño molecular establecidos (indicando que el ADN amplificado es de múltiples regiones del genoma).

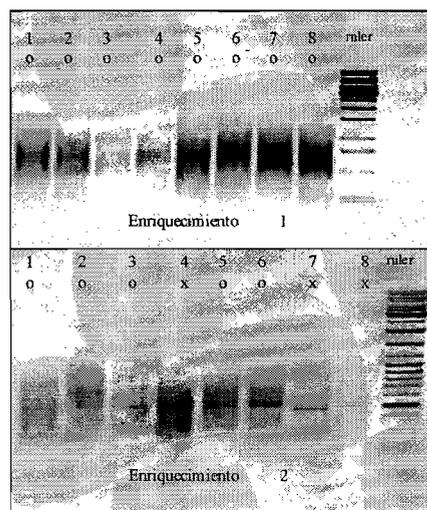


Figura 2.4: Los productos de PCR con el ADN del enriquecimiento 1 y 2, utilizando el Primer MBO I-F-corto. El carril 1 corresponde al tratamiento 1 el segundo a tratamiento 2, etc.. Los ADNs amplificados marcados con un o fueron utilizados en los pasos siguientes, los que tienen una x se descartaron por tener bandas muy pronunciadas.

9. Clonación de bacterias

El anterior fue el paso más crítico del enriquecimiento, a partir del cual se obtuvo ADN con pocas bandas para los dos enriquecimientos y los ocho tratamientos. A partir de este punto todos los procesos fueron más sencillos, ya que corresponden a protocolos moleculares estándar.

Durante este paso, los fragmentos de ADN amplificados de los ocho tratamientos se ligaron al ADN de plásmidos para ser introducidos en bacterias competentes de *Escherichia coli* (paso de transformación). El propósito de este paso es poder obtener ADN de *Thalassia testudinum* con microsátélites en cantidades casi infinitas, para poder secuenciar los fragmentos en los pasos siguientes.

Para realizar el ligamento con el plásmido “pGEM-T easy vector” (de Promega) se utilizaron 3 µl de ADN enriquecido de *T. testudinum*. Los pasos siguientes se realizaron según el manual de Promega. La reacción se incubó por una noche a 4°C. En un laboratorio especializado en el manejo de organismos genéticamente modificados, las bacterias competentes (*E. coli*) se transformaron con los plásmidos recombinantes con fragmentos de ADN de *T. testudinum* enriquecido. Las bacterias se hicieron permeables a los plásmidos por medio de un choque térmico de 50 segundos a 42°C. Las bacterias transformadas fueron cultivadas en 900 µl de medio LB sin antibióticos durante 1,5 horas a 37°C en una estufa agitadora (a 200rpm), permitiendo que crecieran y que se adaptaran al nuevo ambiente, antes de ponerse en cultivo en un medio con antibióticos. Al terminar la aclimatización las soluciones con bacterias se dividieron en tres cajas de Petri con agarosa conteniendo LB, antibióticos (ampicilina (+amp)), X-gal e IPTG. Se inoculó un total de 24 cajas (tres repeticiones de cada tratamiento), las cuales se cultivaron durante una noche a 37°C. Al siguiente día las cajas se refrigeraron a 4°C, para evitar que las colonias de bacterias siguieran

creciendo. Además, la refrigeración aumenta el contraste entre las colonias azules y blancas (ver siguiente paso, para detalles sobre este punto)

10. Selección de bacterias positivas

En el paso anterior las bacterias se cultivaron en un medio específico para bacterias transformadas. Únicamente las bacterias que contienen el plásmido pueden crecer en este medio, pues el plásmido contiene un gen que hace a la bacteria resistente a la ampicilina. En las cajas de Petri se desarrollaron dos tipos de colonias: las azules y las blancas, dependiendo de si hubo éxito en el ligamento o no. Las colonias de color azul contenían un plásmido, pero el ligamento entre el ADN de *T. testudinum* y el plásmido no fue exitosa (plásmido vacío). Por otro lado, las colonias blancas eran las que sí contenían un plásmido con ADN de *T.*

testudinum enriquecido. Para los dos enriquecimientos realizados el ~99% de las colonias de bacterias resultaron ser blancas, lo que significó que el ligamento y la transformación fueron exitosos. Cada caja de Petri contenía aproximadamente 200-300 colonias útiles para el siguiente paso. Se seleccionó un total de ~600 colonias de cada uno de los ocho tratamientos. Este paso se realizó dos veces, lo que dio un total de ~1200 colonias por tratamiento. Las bacterias eran probables portadoras de un microsátélite de *T. testudinum*. Se seleccionaron las colonias con bacterias blancas y utilizando un palillo estéril con cuya punta se tocó cada colonia, se inoculó un microtubo con 200 µl de medio LB (+amp) y glicerol. El mismo palillo se utilizó para inocular, por

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
C	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
D	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
E	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
F	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
G	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
H	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96

Figura 2.5: Ejemplo de un filtro de nitrocelulosa con gradilla. En cada caja de Petri se colocaron dos filtros, cada número coincide con una bacteria en un microtubo.

medio del trazado de una raya, un filtro de nitrocelulosa con una gradilla (Figura 2.5). Esta gradilla es un esquema que corresponde a la placa de microtubos (96 por placa).

Las placas de microtubos con medio LB y glicerol sirvieron como un stock de bacterias seleccionadas, para ser cultivadas en el futuro si fuese necesario. Antes de inocularlos, los filtros se pusieron en una caja de Petri con agar y medio LB (+amp). El propósito de cultivar las bacterias sobre un filtro fue dar la posibilidad de realizar posteriormente la extracción del ADN a partir de los mismos filtros, adhiriendo el ADN a éstos en la ubicación correspondiente, según la localización de los microtubos. Las placas con microtubos y las cajas de Petri con filtro se incubaron por una noche a 37°C. La mayoría de las bacterias seleccionadas crecieron y formaron colonias de tamaño adecuado para la extracción de ADN. Las placas y las cajas de Petri se almacenaron a 5°C en un refrigerador.

11. Preparación de filtros de nitrocelulosa

Durante este paso el ADN de las colonias cultivadas sobre los filtros de nitrocelulosa se extrajo y se fijó sobre el mismo filtro. Inicialmente se colocaron los filtros con las colonias en la parte superior sobre varias capas de papel Whatman saturado con solución desnaturalizante. El papel Whatman se utilizó para que las soluciones llegaran a las bacterias y así evitar que las mismas se diseminaran sobre los filtros. La desnaturalización duró 5 minutos. La solución rompe las membranas de las bacterias y libera el ADN. Posteriormente se llevó a cabo un paso similar, pero utilizando el amortiguador neutralizante como solución. Finalmente, los filtros con el ADN adherido se lavaron durante 10 minutos en una solución de 2X SSC (1 a 2 litros por lavado) en un vaso de precipitado de 2 litros. Los restos de las bacterias se disolvieron en este amortiguador por medio de agitación

severa de los filtros. Por último, éstos se secaron a temperatura ambiente, a lo cual siguió una incubación a 80°C durante 2 horas para fijar permanentemente el ADN al filtro.

12. Hibridación con oligonucleótidos de microsatélites radioactivos

Durante este paso los oligonucleótidos con secuencias de microsatélites se ligaron con una sonda radioactiva para hibridarse con los filtros del paso anterior. Los oligonucleótidos fueron los mismos que se utilizaron en los ocho tratamientos del paso 5. No todas las bacterias positivas seleccionadas contenían ADN de *T. testudinum* con un microsatélite y por medio de este paso se seleccionaron las colonias que si contenían la secuencia o algo similar. Esto se puede considerar como un segundo paso de enriquecimiento. El manejo de las sondas se realizó en un laboratorio adaptado para trabajo con sustancias radiactivas (el cual formaba parte de la misma unidad de la Universidad de Radbout, Nijmegen, Holanda).

Se inició con la preparación de las ocho soluciones. Los oligonucleótidos con secuencia de microsatélites se ligaron a un nucleótido radioactivo (ATP, γ -P32) por medio de la enzima T4 polinucleótido-kinasa. Antes de hibridar los filtros del paso 11 con estos oligonucleótidos radiactivos, se revisó la actividad de los mismos. Los filtros con ADN bacterial se pre-hibridaron durante una hora a 65°C en una incubadora. Cada uno de los ocho tratamientos se hibrido por separado. Al terminar la pre-hibridación, se agregaron las soluciones con los microsatélites radioactivos (filtros con tratamiento GA₁₂ con sondas de GA₁₂ radiactivo, etc.). Para realizar la hibridación los tubos se incubaron por 3 horas a 65°C en una incubadora con rotor horizontal. Al terminar, los filtros se enjuagaron durante 15 minutos en una solución de 6X SSC. Los filtros húmedos se colocaron sobre una placa de reflexión (un tipo de plástico que se utiliza para exponer radiografías), ubicando cada tipo de tratamiento sobre una placa diferente. Se envolvieron en

plástico las placas con los filtros y, en un cuarto oscuro, se introdujeron en una caja oscura con película radiográfica. Se guardaron las ocho cajas en un ultra-congelador a -80°C durante una noche, tiempo durante el cual se expusieron las placas radiográficas a la radiación proveniente de las colonias.

13. Detección de colonias positivas

Se revelaron las radiografías en una reveladora automática. El tiempo de exposición se ajustó para los diferentes tratamientos, para evitar la sobre-exposición o falta de exposición. Las colonias de bacterias que contenían un plásmido con ADN de *T. testudinum* con un microsatélite o secuencia parecida, se reconocen por ser más oscuras (Figura

2.6). Esto se debe que los oligonucleótidos radiactivos eran complementarios a los microsatélites que se encontraban dentro del plásmido. Las colonias oscuras que crecieron sobre el filtro correspondían a las bacterias que habían sido seleccionadas y guardadas en las placas de microtubos del paso 10. Éstas se seleccionaron y se cultivaron para posteriormente secuenciarlas. Se inocularon tubos con 4.5 ml de medio LB (+amp) con las bacterias seleccionadas, y se incubaron durante una noche en una estufa a 37°C con agitadora (a 200rpm). Se centrifugaron los tubos que mostraron un crecimiento

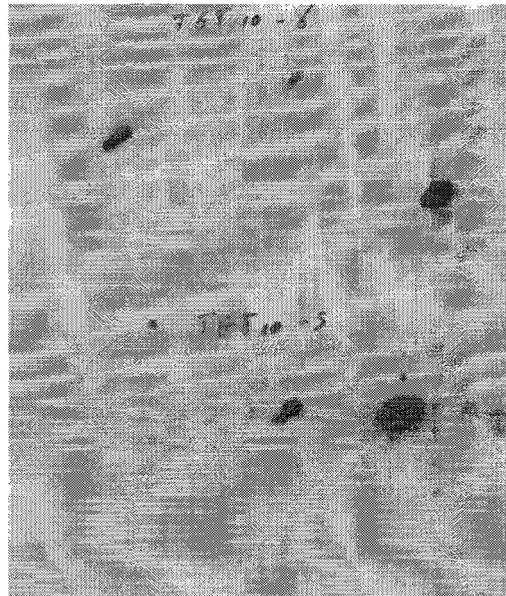


Figura 2.6: Radiografía de dos filtros con colonias conteniendo un plásmido con ADN *T. testudinum*. Las colonias que contienen un microsatélite (TGT₁₀) son más oscuras que las demás. Estas fueron seleccionadas para ser secuenciadas.

de bacterias (en los que el medio LB se veía opaco) para la extracción del ADN, utilizando el kit Miniprep de QIAGEN. Finalmente se obtuvo una dilución de 50 µl de ADN (de bacterias, plásmidos y de *Thalassia testudinum* enriquecido) disuelto en H₂O MilliQ.

Al final del primer enriquecimiento se obtuvo un total de 149 colonias positivas (bacterias que probablemente contenían un microsatélite) y al final del segundo se obtuvo un total de 106 colonias positivas, para dar un total final de 255 colonias.

14. Secuenciación del ADN vectorial con T. testudinum

Antes de iniciar el proceso de secuenciación, se determinó la cantidad y calidad del ADN extraído. En general, todas las extracciones dieron un buen resultado, pero algunas bacterias no crecieron bien y no se obtuvo suficiente material para ser secuenciado. El ADN se disolvió en 40 ng/µl, la concentración óptima para secuenciar ADN de un tamaño de hasta 1200 pares de bases. La reacción de secuenciación se realizó con un Kit comercial, SequiTherm EXEL II-L Sequencing Kit (Epicenter Technologies), y la separación de los fragmentos se llevó a cabo con un secuenciador automático marca LI-COR modelo Li-cor 4000L, en un gel de poliacrilamida en placas de vidrio de 66 cm de largo. Este tipo de secuenciación separa los fragmentos de cada base en un carril separado, lo que significa que las imágenes de cada reacción consisten de cuatro carriles (Figura 2.7). La ventaja de este tipo de secuenciador es que permite reconocer los microsatélites fácilmente. Los geles de secuenciación consistieron de poliacrilamida desnaturalizante de 3.7% y de un grosor de 0.25 mm. Los primers utilizados para iniciar las reacciones de PCR fueron M13-forward y M13-reverse, que son primers universales, los cuales son complementarios a un segmento del ADN vectorial. La reacción inicia en el ADN del plásmido y se dirige en dirección del fragmento insertado de *T. testudinum*. Así, el ADN desconocido puede ser secuenciado sin necesidad de

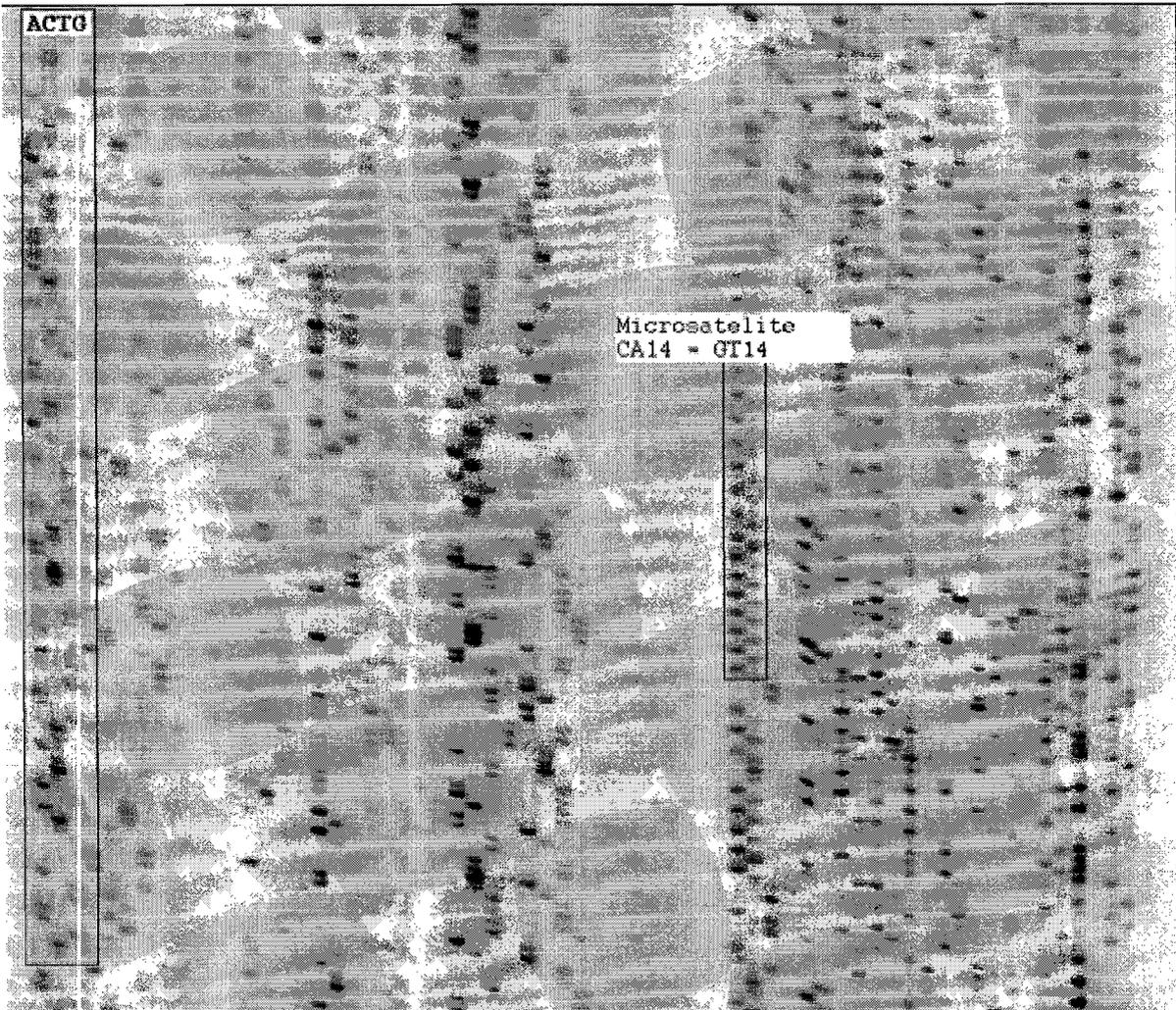


Figura 2.7: Ejemplo de un gel de secuenciación. Del lado derecho se observan cuatro carriles, cada uno correspondiente a un tipo de base. Cada gel consiste de 16 secuencias (4x16=64 carriles). En el centro se puede observar un ejemplo de un microsatélite, CA₁₄, que fue obtenido por medio del enriquecimiento de la repetición GT. Se reveló secuencia complementaria, lo que es consecuencia de la amplificación por PCR.

contar con primers específicos. Se inició la secuenciación de todas las muestras con el primer M13-forward. Las secuencias eran legibles hasta aproximadamente 800 pares de bases, lo que permitió determinar la secuencia completa utilizando las dos secuencias en direcciones opuestas. Se secuenció con éxito un total de 254 colonias.

15. Diseño de primers específicos para los microsátélites de *T. testudinum*

Las secuencias encontradas se clasificaron en tres grupos diferentes: 1) secuencias sin microsátélite; 2) secuencias con microsátélites cortos; y 3) secuencias con microsátélites útiles, potencialmente polimórficos. Se consideró como un microsátélite potencialmente útil a aquel que contuviera más de 10 repeticiones, en caso de ser di-microsátélites, y más de ocho repeticiones en caso de ser tri- o tetra-microsátélites. Además de este requisito, los microsátélites debían estar flanqueados de por lo menos 20 pb libres a ambos lados con el fin de diseñar un primer. Se seleccionaron microsátélites con este número mínimo de repeticiones para tener una probabilidad relativamente alta de encontrar

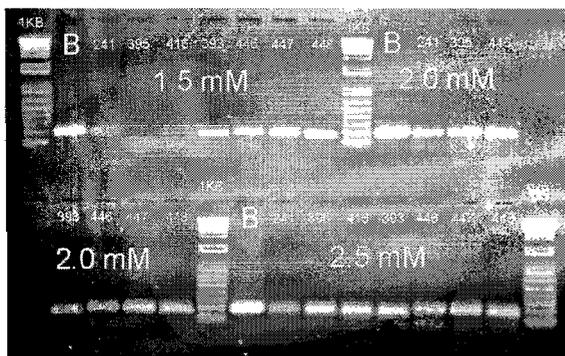


Figura 2.8: Ejemplo de un gel con amplificaciones del microsátélite TTMS-TCT-058 bajo diferentes concentraciones de $MgCl_2$ (1.5, 2.0, y 2.5 mM). La primer banda de cada prueba corresponde al ADN enriquecido utilizado para la secuenciación, las otras siete son muestras de México al azar. La amplificación generó dos fragmentos de diferentes tamaños, pero el ADN enriquecido de TTMS-TCT058 dio una banda de referencia de 193 pares de bases y es la que indica la altura del microsátélite. El mejor resultado se obtuvo con una concentración de 2.5 mM $MgCl_2$.

polimorfismos, pues es poco probable que un microsátélite de cinco repeticiones sea variable, aunque no es imposible. Por esta razón, no se descartaron las secuencias cortas de microsátélites. Las secuencias útiles se compararon entre ellas por medio de un análisis de alineación, para establecer si existían repeticiones de la misma secuencia, pues es probable que un fragmento de ADN hubiera sido insertado varias veces dentro de un plásmido y transformado varias veces en una bacteria competente. Se encontró un total de 56 microsátélites útiles, de los cuales 15 resultaron ser duplicados. El número final de microsátélites potencialmente polimórficos fue de 41, y se

diseñaron primers para 37 de ellos.

Los primers específicos para la extracción de cada microsatélite se diseñaron con el programa de diseño PRIMER 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>, (Rozen y Sjaletzky 2000). El objetivo en el diseño de los primers fue que el tamaño de los fragmentos obtenidos estuviera entre los 100-250 pb, que es el tamaño adecuado para amplificar y separar los diferentes alelos de los loci. En algunas ocasiones fue complicado diseñar primers para obtener productos dentro de este intervalo, ya que había un bajo número de bases útiles para el diseño. Se intentó obtener primers con un porcentaje de las bases G y C de entre 50 y 60%. Este porcentaje permite una mejor alineación y adherencia de los primers con el ADN de interés. Además, los primers se seleccionaron de tal manera que las secuencias internas del primer no fueran complementarias a sí mismas o al primer opuesto (ya que generalmente se necesitan dos primers para poder amplificar un segmento de ADN). De esta manera se evita perder primer al formar lazos o dímeros entre ambos primers.

16. Optimización, amplificación y análisis de polimorfismo de primers específicos para T. testudinum

Los 37 pares de primers diseñados se probaron preliminarmente con el ADN de 12 muestras de *Thalassia testudinum* provenientes de varias poblaciones de México. Para esto, se llevaron a cabo PCRs en microtubos de 0.2 ml agregando 15 ng de ADN de cada muestra a la mezcla de reacción de 20 µl. Las reacciones consistieron de: ADN genómico, 2.0 µl 10xPCR buffer (200 mM Tris.HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 1.5 - 3.5 mM MgCl₂, 100 µM de cada dNTP, 0.4 pM de cada primer, y 1 U (unidad) de Taq DNA polimerasa (Invitrogen, Live Technologies). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador de 96 pozos (modelo Flexigene, TECHNE). Los ciclos de

amplificación se realizaron con el siguiente perfil: 1 ciclo de 4 min. a 95°C de desnaturalización inicial, 35-40 ciclos de 45 segundos (s) a 95°C de desnaturalización, 30 s a temperatura de alineación (Tabla 1), 40 s de extensión a 72°C y, como último paso de la reacción, una extensión final de 10 min. a 72°C, para posteriormente almacenar las reacciones a 10°C ∞. En la mayoría de los casos se realizó un PCR tipo "Touchdown", que consistió en una disminución de un total de 10°C en la temperatura de alineación en 20 ciclos (-0.5°C por ciclo), finalizando el Touchdown a la temperatura de alineación calculada (Tabla 2.1). La reacción se extendió 15-20 ciclos adicionales a la temperatura de alineación final. Este tipo de amplificación no siempre resultó ser la más adecuada. Para estos primers se utilizaron reacciones de PCR convencionales. En los procesos de optimización del PCR se variaron principalmente las temperaturas de alineación en cambios de 1°C, así como la concentración de MgCl₂ (en pasos de 0.5 mM por ensayo) en la mezcla de reacción. Cuando no se obtuvo un producto satisfactorio, se cambiaron otras variables, como la concentración de los primers, del ADN, del TAQ, o se utilizaron programas de amplificación diferentes. Si estos cambios no generaban bandas nítidas, se diseñaban nuevos primers con una secuencia diferente. Los productos de PCR se separaron inicialmente en un gel de 1.5% de agarosa para visualizar la calidad de la reacción (Figura 2.8), lo que se expresa como una banda bien definida y de alta intensidad. Los productos con estas características se separaron posteriormente en un gel de poliacrilamida.

La separación de los productos de PCR se realizó en un gel de 6% de poliacrilamida desnaturalizante (7M urea)



Figura 2.9: Ejemplo de la separación de los alelos en un gel de poliacrilamida, teñido con nitrato de plata con el método de Creste *et al.* (2001). En esta imagen se visualizaron tres alelos, que son las bandas a las tres alturas diferentes, de un total de cinco pertenecientes al microsátélite TTMS-TGA-039.

CAPITULO 2. Aislamiento de microsatélites y desarrollo de primers específicos para *Thalassia testudinum*.

con 0.4 mm de grosor a una temperatura aproximada de 55°C y con una corriente de 75 W (1800V). Los detalles de la separación se encuentran en el Anexo 2. El sistema de secuenciación utilizado fue de BIORAD, modelo Sequigen GT System con vidrios de 38 × 50 cm. Los productos de PCR se visualizaron utilizando una tinción con nitrato de plata (Anexo 2), con el método de Creste *et al.* (2001). Se utilizó este protocolo por que genera bandas nítidas con alto contraste (Figura 2.9).

Finalmente 11 de los 37 microsatélites (o loci) seleccionados resultaron ser polimórficos. Además de estos 11 loci, se utilizaron otros tres diseñados por la Dra. Michelle Waycott de la Universidad James Cook en Townsville, Australia. Se decidió añadir estos tres pares de primers a los nuestros para ser publicados en conjunto (Tabla 2.1), aunque no fueran parte de la tesis (Van Dijk *et al.* 2007).

Los microsatélites polimórficos se analizaron para determinar su polimorfismo con un conjunto de 35 a 305 muestras de tejido de diferentes poblaciones de *T. testudinum*. Se determinó la cantidad de alelos por locus, su intervalo de tamaños, el nivel de diversidad genética (H_E =heterocigosidad esperada) y la heterocigosidad observada (H_O) con el uso de GENALEX v. 6.0 (Peakall y Smouse 2001). Las muestras utilizadas fueron una selección de varias poblaciones mexicanas de la costa del Caribe y del Golfo de México.

Los tres loci aislados por la Dra Michelle Waycott y varios de los loci aislados como parte de esta tesis se analizaron en muestras de *T. testudinum* obtenidas en Panamá. En total se encontró un total de 3 a 17 alelos por locus, en un intervalo de tamaño de 100 pb a 300 pb. Con el programa mencionado se determinó que la diversidad genética (H_E) de Nei, varió entre 0.436 y 0.859 para los diferentes loci con una heterocigosidad observada (H_O) entre 0.355 y 0.873. Como se puede deducir de la Tabla 2.1, no se analizaron todos los microsatélites en el mismo número de individuos, y en algunos casos no fue posible determinar todas las variables. Esto se debió a la falta de tiempo y a que ya se habían optimizado suficientes marcadores para llevar a cabo el análisis planteado. Para

algunos loci únicamente se demostró que hay polimorfismo, pero las amplificaciones no fueron lo suficientemente consistentes para que pudieran ser utilizadas en la genotipificación, lo que no permitió un análisis de polimorfismo completo.

Este es el primer estudio que ha buscado y encontrado microsatélites altamente polimórficos para *Thalassia testudinum*, la angiosperma marina más importante del Caribe y el Golfo de México. Este marcador es una herramienta poderosa que permitirá realizar estudios sobre la dinámica poblacional y la estructura genética de esta especie tan importante en el área de distribución, ya que se le encuentra constantemente como parte de la vegetación marina en esta región, como un elemento dominante. En futuros estudios se podrá comprobar si estos marcadores son polimórficos para la especie hermana, *Thalassia hemprichii* que se distribuyen en el Océano Pacífico e Índico.

CAPITULO 2. Aislamiento de microsatélites y desarrollo de primers específicos para *Thalassia testudinum*.

Tabla 2.1: Microsatélites polimórficos de *Thalassia testudinum* aislados por medio de un enriquecimiento. Nombre del locus, tipo de repetición, secuencia del primer (F, dirección delantera; R, dirección reversa), Protocolo 1 corresponde a microsatélites diseñados en esta tesis y protocolo 2 a microsatélites diseñados por la Dra. Michelle Waycott, concentración de MgCl₂, número de muestras analizadas (N), origen de las muestras (M) México y (P) Panamá. Temperatura de alineación (T_a) (t, PCR tipo touchdown de --°C a -- C° en 20 ciclos; f_{25} , temperatura final de alineación con número de ciclos), rango de tamaños de alelos, número de alelos por locus, promedio de heterocigosidad observada (H_o) y heterocigosidad esperada (H_E), y su numero GenBank. Nd=no determinado.

Locus	Tipo de repetición	Secuencia del primer (5'-3')	Protocolo	[MgCl ₂] (mM)	T_a (C°)	Rango de los alelos	N	No. De alelos	H_o	H_E	No. De GenBank
TTMS-GA6	(GA) ₁₉ [AG] (AC) ₂	F: TCCTTCCTCTGGATGGTTG R: GAGAGCTTCCAAGTATTTTCTT	1	2.0	t 62-52 f_{52} (19x)	125-153	305 (M)	14	0.692	0.833	DQ512877
TTMS-GA8	(GA) ₁₈	F: GTGCCCTTCCTTCATGTTGT R: CGAGTAATGGCATTGGGTTC	1	2.0	t 64-54 f_{54} (15x)	234-274	305 (M)	17	0.810	0.859	DQ512878
TTMS-GA12	(GA) ₁₈	F: CGAAAGGGCAAGAGAGAGG R: GTGAACCTTCCCCTTCCTTC	1	1.5	t 63-53 f_{53} (18x)	153-168	60 (P)	5	0.355	0.399	DQ512879
TTMS-TGA39	(GGA) ₁₆ (TGA) ₁₂	F: AAAGAAGAGTTTGGAGGAGGAGGA R: CCAAGCCCATATCAGACCTTTAT	1	1.5	t 65-55 f_{55} (19x)	219-231	305 (M)	5	0.656	0.671	DQ512880
TTMS-TCT58	(GAA) ₁₀ (GAT) ₁ (GAA) ₃	F: CCAAACAAGGGCAACAAAG R: GGAGGAGAGACCCAAGAAGC	1	1.5	t 63-53, f_{53} (15x)	166-196 158-194	305 (M) 60 (P)	11 4	0.761 0.248	0.796 0.271	DQ512881
TTMS-GGT59	(GGT) ₁₁ [GGAGGGTGA] (GGT) ₃	F: AGAGGAGCTGGGTCTCTTTC R: ACCCACCTCTCCCTCTCCT	1	1.5	59 (36x)	221-242	305 (M)	8	0.656	0.741	DQ512882
TTMS-GA72	(GA) ₁₆	F: CGATAGACGAGGAATCGTICA R: CTCCACTCCCCACTCTCAAC	1	2.0	58 (35x)	224-232	60 (P)	6	0.843*	0.609	DQ512883
TTMS-GT77	(GT) ₁₆	F: GGTGGTAGTAGGGATGGGAAG R: TCCACCCACTCTACTCAATG	1	1.5	t 63-55 f_{55} (20x)	100-110	>5	Nd	Nd	Nd	DQ512884
TTMS-GT104	(GT) ₁₅	F: CAAAGGACCTAAGTGAATAAAAGGAC R: AAAGCCATCTTCTCTCTACCAC	1	1.5	t 69-59 f_{59} (17x)	183-189	59 (P)	4	0.821	0.548	DQ512885
TTMS-GT112	(GT) ₃ [TT] (GT) ₁₂	F: AAAGCCATCTTCTCTCTACCAC R: CCACCATTACAAGCCACACA	1	1.5	t 69-59 f_{59} (17x)	202-206 204-212	305 (M) 60 (P)	3 7	0.410 0.873	0.436 0.591	DQ512886
TTMS-CA180	(CA) ₁₅	F: CACAAGACCCGAAAACA R: GTGGGCATTGAAGGGATT	1	2.0	t 64-54 f_{54} (15x)	148-166	60 (P)	10	0.449	0.763	DQ512887
Th1 MS	(CT) ₁₅	F: TTCCCATGACTAGTGACAACCA R: GCAAGCATCAGATTTGCAATAG	2	1.5	56	163-181	60 (P)	7	0.624	0.607	DQ837163
Th1 T 129	(CT) ₁₀	F: TCCCAAACGTCGTACCAGAC R: CGCGAGAAGAAGGGAGAG	2	2	48	211-225	35 (P)	5	Nd	Nd	DQ837162
Th1 Ts 97	(CA) ₁ [TA] ₁ (CA) ₁₀ [TA] ₁ (CA) ₁ [TA] ₁ (CA) ₁₀ [TA] ₁ (CA) ₁	F: AGCAGCAAACAGAGTGCAG R: CTAGCAGAAGCGATGGAAAA	2	1.5	48	300	35 (P)	>6	Nd	Nd	DQ837164

CAPITULO 3

EVALUACIÓN DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA, CONECTIVIDAD Y ESTRUCTURA CLONAL DE POBLACIONES DE *THALASSIA TESTUDINUM* A LO LARGO DE LA COSTA DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN.

Introducción

Thalassia testudinum es la especie de pasto marino más importante de la costa Atlántica de México. La obtención de información sobre la conectividad entre sus poblaciones y la estructuración genética de éstas, por lo tanto, es un tema de gran interés y de amplia utilidad para descifrar sus procesos de dinámica poblacional a escalas geográficas y también en un marco de tiempo evolutivo. Además, como *T. testudinum* es una especie que se propaga clonalmente, el uso de microsátélites como marcadores genéticos permitirá hacer una estimación del tamaño de los genets y de la diversidad clonal dentro de las diferentes poblaciones. Esta información puede ser una herramienta útil para la conservación, pues permitirá describir con detalle la dinámica poblacional e identificar las reservas de variación genética de la especie.

Aunque hasta la fecha no ha sido necesario recuperar o regenerar las poblaciones de *T. testudinum*, un uso potencial que pueden aportar los datos de genética de poblaciones en esta especie es coadyuvar a la definición de estrategias de recuperación o regeneración de pastizales (Waycott *et al.* 2006) con base en una selección de las poblaciones más adecuadas para ser donadoras utilizando criterios ecológico y evolutivos, tales como su nivel de diversidad genética, la tasa de endogamia, o bien, el que representen adecuadamente a las poblaciones originales. En el pasto marino *Posidonia oceanica* (Posidoniaceae) se han llevado a cabo transplantes bajo condiciones experimentales y se ha

demostrado que la supervivencia y el crecimiento son mayores cuando el material transplantado es de una alta diversidad genética (Procaccini *et al.* 2001).

En el medio marino, la reproducción y la dispersión de la progenie de la fauna y flora bénticas sucede principalmente por medio del transporte planctónico de huevos, larvas o gametos en la columna de agua. En estos organismos, la fase planctónica puede durar desde unos días hasta varios meses y los tiempos y distancias de dispersión dependen de los procesos oceanográficos locales (Siegel *et al.* 2003; Roughgarden *et al.* 1988). Siegel *et al.* (2003) elaboraron un resumen de la dispersión larval marina de un gran número de especies bénticas y encontraron una alta correlación positiva entre la duración larval planctónica y su escala geográfica de dispersión.

Thalassia testudinum, es una planta que requiere de una dispersión a larga distancia forzosamente. Esto se debe a que las semillas tienen un corto periodo de latencia y no forma banco de semillas (Van Tussenbroek *et al.* 2006; Orpurt y Boral 1964). Cuando las semillas psuedovivíparas son liberadas del fruto, estas únicamente logran desplazarse uno cuantos metros. En el caso que una población desaparezca por completo, su restablecimiento dependería totalmente de la migración de semillas de poblaciones foráneas. Para que se considere que ha habido una dispersión efectiva, las plántulas deben emerger y se deben establecer (Kinlan y Gaines 2003).

El potencial de dispersión de las semillas de *T. testudinum* en el mar depende de las condiciones climatológicas e hidrodinámicas locales y es posible estimar su magnitud. Sin embargo, no se sabe aun qué tan importante y común es. Los estudios de genética poblacional intentan describir el balance dinámico de la variación genética que existe dentro y entre las poblaciones, el cual depende de la tasa de mutación, selección natural, migración y deriva genética. Este balance es el resultado de cientos o miles de generaciones, por lo que la diversidad genética y genotípica actuales son el resultado de un proceso que ha tomado cientos o miles de años (Palumbi 2003).

La dispersión marina es un proceso tridimensional, pero en el caso de *T. testudinum* que tiene frutos flotantes, resulta ser bidimensional, en la práctica. La dispersión de los frutos se da por medio de las corrientes superficiales, el oleaje y el viento (Jiménez Durán 2004). Aunque parezca relativamente sencillo el hecho de que la dispersión se da en la superficie, se han llevado a cabo muy pocos trabajos sobre las trayectorias de movimiento de los propágulos de especies marinas. Posiblemente dicha trayectoria puede compararse con la dispersión de los frutos o plántulas de mangle (Clarke 1993; Rabinowitz 1978) o de los cocoteros (Ward *et al.* 1992). Se han llevado a cabo varios trabajos oceanográficos con boyas de deriva lagrangianas (boyas que son rastreadas por medio de GPS y que determinan la dirección y la velocidad de la corriente, integrándose a ella) y las trayectorias descritas son en ocasiones muy caóticas y no siempre siguen las corrientes oceánicas principales (Richardson 2005; Fratantoni 2005; Merino Ibarra 1986; Molinari *et al.* 1981). De esta manera, ha sido posible describir ciertas tendencias de circulación marina para algunas de las zonas en las que se distribuye *T. testudinum*. Estas tendencias se compararán con los datos de conectividad genética entre las poblaciones estudiadas y de esta manera se corroborará si las corrientes y los vientos son factores importantes en la dispersión de esta especie.

Merino Ibarra (1986) demostró, con el uso de tarjetas de deriva, que cerca de la costa caribeña mexicana existen contra-corrientes generadas por la corriente de Yucatán, indicando un flujo neto costero, principalmente hacia el sur (las tarjetas de deriva son tarjetas flotantes que se liberan en el mar y al ser recuperadas se registra la hora, la fecha y el lugar de recuperación, la cual puede darse por búsqueda en las costas o por su colecta por parte de desconocidos que la mandan al investigador). Este investigador encontró, además, que las tarjetas liberadas mar adentro pueden cubrir distancias muy grandes, varios cientos de kilómetros en unos días, lo cual podría indicar que exista una alta conectividad entre el Caribe mexicana y el resto del Caribe.

Los pastos marinos, incluyendo *Thalassia testudinum*, son angiospermas marinas altamente clonales en los que el crecimiento poblacional puede atribuirse totalmente a esta forma de propagación (Van Tussenbroek *et al.* 2006). El papel que juega la reproducción sexual en esta especie no es muy claro hasta el momento, pero podría incluir tanto el mantenimiento de la diversidad genética de la especie, como la posibilidad de re-colonización de áreas donde *T. testudinum* haya desaparecido por diversas razones; este último efecto también se ha llamado “efecto de rescate” (Ouborg *et al.* 1999).

Muchos animales sésiles, al igual que las plantas, dependen de una estructura modular y se propagan vegetativamente por medio de diversos tipos de ramificaciones, estolones, rizomas, bulbos, etc. (Jackson *et al.* 1985). Teóricamente una planta clonal que se propaga por medio de la formación de rizomas, como es el caso de los pastos marinos, produce genets inmortales, pues éstos generan nuevas unidades o módulos continuamente; el genet no acumula biomasa en una sola estructura, sino que la extiende en el espacio. Si un genet logra establecerse en una población, ésta se va fragmentando con el tiempo, formando “una familia” de unidades desconectadas y fisiológicamente independientes.

Anteriormente se pensaba que los pastos marinos tenían un bajo nivel de diversidad genotípica (Waycott y Barnes 2001; Schleuter y Guttman 1998; Williams y Davis 1996; Procaccini *et al.* 1996; Procaccini y Mazzella 1996; Waycott 1995; Les 1988), lo que se atribuía a su crecimiento clonal y a su reducido establecimiento de plántulas resultado de la reproducción sexual, pero con el uso de técnicas genéticas moleculares con mayor variación se ha comprobado que la diversidad puede ser alta (Muñiz-Salazar *et al.* 2005; Alberto *et al.* 2005; Olsen *et al.* 2004; Coyer *et al.* 2004, Tabla 1.1). Para realizar interpretaciones sobre el número de individuos reproductivos en una población, así como para definir el tamaño efectivo de la población (N_e), o estimar la reproducción efectiva, es muy importante identificar a los individuos genéticos, o genets. Además,

el conocer este tipo de variables agregaría más elementos a los estudios demográficos de los pastos marinos, ya que las edades de los clones se pueden estimar. Estimar el tamaño los genets y su distribución en el espacio permitiría realizar un estudio retrospectivo sobre el reclutamiento, el crecimiento, el efecto de los disturbios y la mortalidad de los clones (Oinonen 1967 en Reusch *et al.* 1998). Un ejemplo de este tipo de estudio es el de *Zostera marina* en el mar Báltico, donde se usaron microsatélites, y se encontró que la población estaba conformada de pocos genets grandes y muchos pequeños (Reusch *et al.* 1998). Otro estudio con un resultado totalmente diferente fue el de McMahon (2005) donde se analizó la diversidad clonal de la especie *Halophila ovalis* en la Bahía de Moreton, Australia. Esta especie es muy dinámica; constituye el alimento preferido de los dugongos (forma parte de la orden de los Sirénidos), que remueven la planta entera cuando la consumen. En este estudio genético se utilizaron ISSRs como marcador genético y todas las muestras resultaron tener un genotipo diferente.

Para *T. testudinum* se han utilizado varios marcadores hasta el momento (Waycott y Barnes 2001; Davis *et al.* 1999; Kirsten *et al.* 1998; Schleuter y Guttman 1998), pero no se ha tenido la resolución óptima para distinguir con seguridad los genets individuales. En lo general, se ha encontrado una diversidad genotípica alta a nivel poblacional, con una baja diferenciación entre poblaciones y una distribución homogénea de la diversidad a larga distancia (Waycott *et al.* 2006).

El uso de microsatélites como marcadores genéticos en *T. testudinum* respondería, con una alta confiabilidad, a varias de las preguntas elaboradas en el pasado para esta especie. Además, realizando un muestreo intenso se podría evaluarla conectividad y la estructuración genética entre poblaciones. En relación con esto, algunas de las preguntas que se pretenden abordar en este capítulo corresponden a algunas de las incertidumbres más grandes para la especie: ¿cuánto espacio ocupa un genet?, ¿cómo es la dinámica reproductiva de las poblaciones?, y ¿qué tan vulnerables pueden ser las poblaciones, debido al alto nivel de clonalidad? En este capítulo se intentará evaluar

CAPITULO 3. Evaluación de la estructura genética, conectividad y estructura clonal de poblaciones de *Thalassia testudinum* a lo largo de la costa de la península de Yucatán.

la variación genética en 16 poblaciones de *T. testudinum* del Atlántico mexicano, así como la diferenciación genética entre ellas. Además, se analizará la importancia de la dispersión a larga distancia en el medio marino en poblaciones de las costas de la Península de Yucatán.

Los objetivos de este capítulo son:

1. Estimar la conectividad, estructura y diversidad genética de 16 poblaciones de *T. testudinum* con el uso de seis loci de microsatélites como marcadores genéticos, y relacionar los resultados con las corrientes costeras locales.
2. Determinar los niveles de clonalidad y diversidad genotípica dentro y entre las poblaciones y estimar el tamaño y la edad de los clones.

Este estudio es el primer trabajo en el que se utilizar microsatélites para determinar la estructura genética, el flujo genético, el aislamiento por distancia y la clonalidad en poblaciones de este pasto marino. Las poblaciones se analizaron a varios niveles de escala, desde un metro hasta más de mil kilómetros de distancia.

Métodos

Área de estudio

Los sitios de colecta de material biológico fueron 16 poblaciones ubicadas en el Mar Caribe y el Golfo de México. La mayoría de estas poblaciones estuvieron ubicadas en la Península de Yucatán; además, se muestreó una población en el estado de Tabasco y una en el estado de Veracruz.

La Península de Yucatán es una plataforma

cárstica, porosa, y la aportación de agua dulce al mar no se da por medio de ríos superficiales, sino por una red extensa de cuevas subterráneas (Creed *et al.* 2003; Back 1985). En el caso de los estados de Tabasco y Veracruz, el subsuelo es menos poroso, con predominio de granito, donde la principal afluencia de agua dulce es por medio de ríos y deltas (p.ej.; los ríos Grijalva, Usumacinta y Papaloapan), que desembocan en el Golfo de México. El Oriente de la Península está delimitado por el Mar Caribe y la mayor parte de la costa se ve protegida por el Sistema Arrecifal Mesoamericano (SAM), que está constituido principalmente por arrecifes bordeantes (arrecifes que crecen bordeando

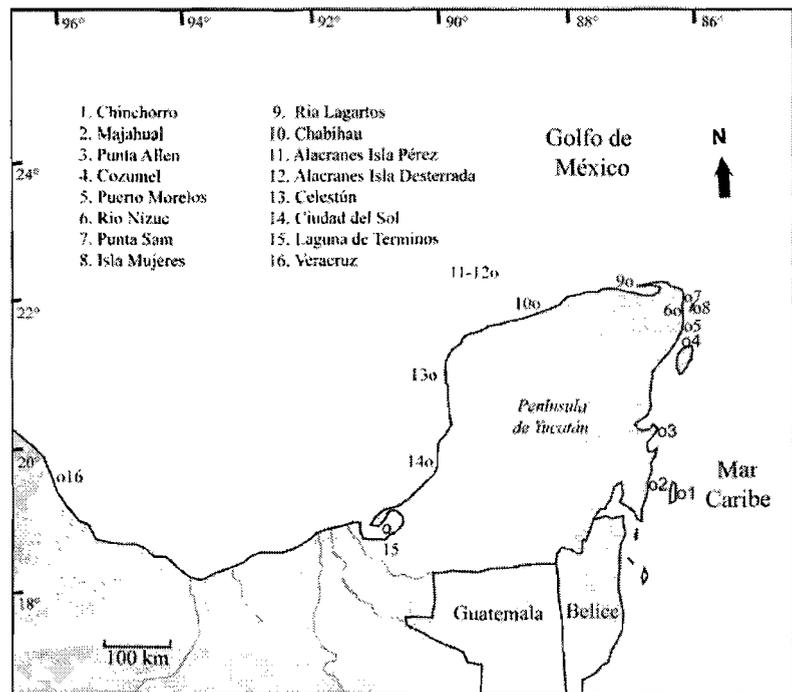


Figura 3.1. Ubicación de las poblaciones en las que se llevó a cabo la colecta en el Mar Caribe y Golfo de México mexicanos para el estudio de genética de poblaciones de *Thalassia testudinum* a nivel Nacional. El total de muestras fue de 36 por población.

Tabla 3.1 Coordenadas geográficas de las poblaciones colectadas para el estudio de la variabilidad genética y la clonalidad de la angiosperma marina *Thalassia testudinum*, con sus respectivas profundidades. La ubicación de las poblaciones se ilustra en la Figura 3.1. La colecta consistió de 36 ramets que se muestrearon según el esquema en Figura 3.2.

Sitio de recolecta	Coordenadas		Profundidad
Mar Caribe			
1. Chinchorro	N 18° 34.529	W 087° 19.146	1 m
2. Majahual	N 18° 42.656	W 087° 42.586	1 m
3. Punta Allen	N 19° 49.880	W 087° 27.718	1½ m
4. Cozumel	N 20° 33.294	W 089° 54.863	½ m
5. Puerto Morelos	N 20° 52.045	W 086° 52.032	1 m
6. Rio Nizuc	N 21° 03.475	W 086° 47.142	2 m
7. Punta Sam	N 21° 14.377	W 086° 48.106	2 m
8. Isla Mujeres	N 21° 15.421	W 086° 45.161	1½ m
Golfo de México			
9. Ría Lagartos	N 21° 34.577	W 088° 14.410	1 m
10. Chabihau	N 21° 21.533	W 089° 06.043	1 m
11. Alacranes Isla Pérez	N 22° 23.027	W 089° 40.881	1½ m
12. Alacranes I. Desterrada	N 21° 31.344	W 089° 46.288	1 m
13. Celestún	N 20° 46.702	W 090° 24.856	1 m
14. Ciudad del Sol	N 19° 26.786	W 090° 42.590	1 m
15. Laguna de Términos	N 18° 39.195	W 091° 44.347	1 m
16. Veracruz	N 19° 09.017	W 096° 05.552	1 m

continentes o islas). A partir del norte de Quintana Roo inicia el Golfo de México, el cual tiene costas generalmente muy someras y lodosas.

La hidrodinámica del Caribe Mexicano está dominada por la Corriente de Yucatán, que corre paralelamente, en dirección sur a norte a lo largo de la costa caribeña de Quintana Roo y es de alta velocidad ($> 100 \text{ cm s}^{-1}$) (Richardson 2005). En el Canal de Cozumel, que es parte del Canal de Yucatán, se han medido velocidades promedio de la corriente de 0.5 a 1.50 m s^{-1} a medio canal (Ochoa *et al.* 2005). Al pasar esta corriente por el Canal de Yucatán, que es un tramo angosto entre Cuba y México, se incorpora a la Corriente del Lazo, que forma una intrusión en forma de lazo que entra al centro del Golfo de México (Gyory *et al.* 2005). Estas intrusiones son las determinantes principales de la hidrodinámica del Golfo de México, en conjunto con las corrientes generadas por el viento.

El clima de la Península de Yucatán es cálido sub-húmedo, principalmente influenciado por los vientos alisios, que transportan masas de aire marítimo tropical provenientes del Mar Caribe (Merino Ibarra *et al.* 1991). Estos vientos tienen una dirección predominante sur-este. En el invierno la zona se ve afectada por masas de aire polar, localmente conocidos como “nortes”. La Península está ubicada en una zona de alta frecuencia de huracanes. La época principal de afectación es entre junio y noviembre (Ruíz-Rentería *et al.* 1998; Merino Ibarra y Otero Dávalos 1991).

Se colectó material biológico de 16 poblaciones (Figura 3.1 y Tabla 3.1). La distancia entre poblaciones vecinas varió entre 7 y 460 km. Se eligieron sitios donde los pastizales cubrían varios cientos de metros a lo largo de la costa y donde las playas tenían acceso público. Se realizaron las colectas de haces foliares de *Thalassia testudinum* a una distancia de 30 a 300 m de la costa y a profundidades menores de 3 m.

Genética poblacional

Colecta de material biológico

En cada sitio se colectaron mediante buceo libre un total de 36 muestras a lo largo de un transecto paralelo a la costa de ~227 m de largo. La colecta se llevó a cabo bajo un esquema anidado, como se ilustra en la Figura 3.2 (por recomendación personal de W.T Stam y J.L. Olsen, Universidad de Groningen, Holanda). Considerando que *Thalassia testudinum* es una planta clonal, no se tenía referencia del tamaño los genets, por lo cual se diseñó un esquema que disminuiría la probabilidad de colectar material en un parche monoclonal, y al mismo tiempo permitía obtener información sobre la clonalidad dentro de las diferentes poblaciones, variando las escalas espaciales entre las muestras de metros a cientos de metros. El uso de escalas espaciales diferentes permitió determinar la diversidad genética, la estructura clonal y la conectividad de las poblaciones. Cada muestra (o ramet) consistió

CAPITULO 3. Evaluación de la estructura genética, conectividad y estructura clonal de poblaciones de *Thalassia testudinum* a lo largo de la costa de la península de Yucatán.

de un haz foliar (rizoma vertical con un conjunto de hojas) se colectó por debajo del sustrato, con el uso de un cuchillo. Las muestras fueron procesadas para su preservación, aproximadamente 1 hora después de ser colectadas. Para extraer el ADN para llevar a cabo el estudio genético, se requiere de tejido limpio, preferentemente joven, con una alta concentración de núcleos. En los ramets de *T.*

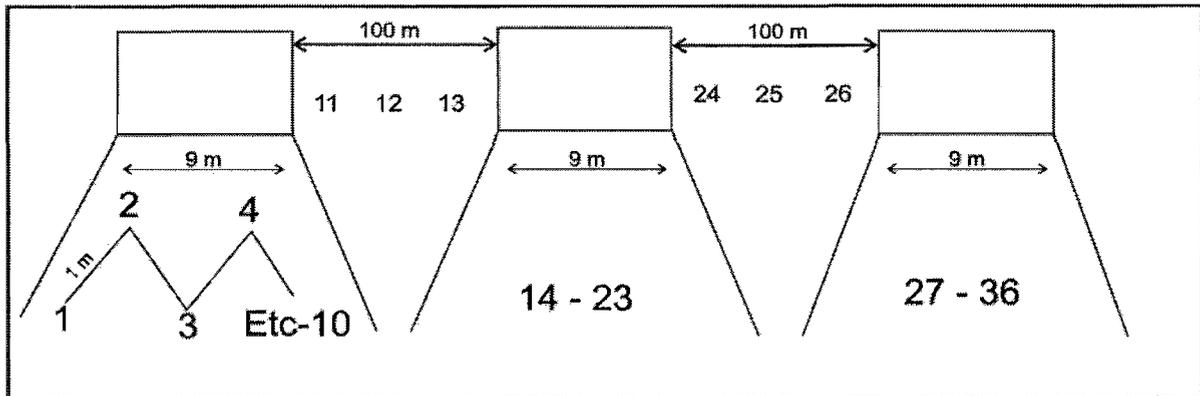


Figura 3.2 Esquema de recolecta anidada utilizada. Cada número representa un haz de *Thalassia testudinum*. El esquema consiste de un total de 36 muestras recolectadas sobre un transecto de 227 m. La distancia entre las muestras de cada bloque es de 1 m, y la distancia entre cada bloque de 10 muestras es de 100 m. Entre cada bloque se recolectaron 3 muestras más con una distancia de 25 m entre cada una, sumando un total de 36 muestras.

testudinum este tipo de tejido se localiza en el centro de los haces foliares. Así, las hojas exteriores de cada ramet se removieron hasta descubrir las hojas más nuevas y jóvenes, cercanas al meristemo de crecimiento. Se cortó un fragmento de la vaina interna de aproximadamente 2 cm de largo, realizando el corte justo arriba del meristemo apical del rizoma vertical. Este fragmento se enjuagó con agua estéril para eliminar contaminaciones superficiales, se guardó en un tubo de 30 ml, que contenía 2/3 de volumen de gel de sílice que fungió como preservador (deshidratado). En el texto siguiente nos referimos a un haz foliar como un ramet.

Extracción de ADN, amplificación y separación de fragmentos

De las muestras deshidratadas, aproximadamente 10 - 20 mg de material se rehidrató con agua estéril y se maceró con un pistilo en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, congelándolo primero con nitrógeno líquido. A la muestra congelada y pulverizada se agregaron 800 µl de 2% CTAB (bromuro de cetil-trimetil amonio) y 2 µl de 2-mercapoetanol; los tubos se incubaron durante 30 min. a 60°C en un baño seco. La primera extracción se realizó con 25:24:1 fenol (pH 8.0): cloroformo: alcohol isoamílico, seguido por dos extracciones con 24: 1 cloroformo: alcohol isoamílico con una precipitación final en una solución de isopropanol frío al 80% (Doyle y Doyle 1991). Las muestras de Cozumel, Río Nizuc, Veracruz y Alacranes se molieron en un MINI-BEADBEATER™ (Biospec Products) y su ADN se extrajo utilizando el protocolo comercial de extracción “DNeasy Plant Mini Kit” (QIAGEN). La concentración del ADN extraído se determinó en un gel de agarosa al 1.5%, cargando 1 µl de cada muestra y cuatro diluciones de ADN de referencia (de timo de bovino de alto peso molecular) con 5, 10, 20 y 50 ng de ADN. Las muestras se diluyeron hasta una concentración de 10-20 ng µl⁻¹ para después amplificarse por PCR (Reacción en Cadena de Polimerasa). Se utilizaron seis de los 14 microsatélites desarrollados para *T. testudinum* en este estudio (i.e. TTMS-GA6, TTMS-GA8, TTMS-TGA39, TTMS-TCT58, TTMS-GGT59, y TTMS-GT112; van Dijk *et al.* 2007). Los PCR's se llevaron a cabo en un termociclador “Flexigene thermocycler” (Techne), utilizando placas de 96 microtubos en reacciones de 20 µl. En el último tubo de cada placa de microtubos se amplificó el ADN original de la secuenciación del microsatélite obtenido en el proceso de enriquecimiento. El producto de esta amplificación se utilizó como referencia de tamaño y de número de repeticiones del microsatélite en el proceso de genotipificación. Los productos de PCR de cada placa se desnaturalizaron, agregándoles buffer LD de carga desnaturizante (formamida al 95%, 10mM EDTA pH 8.0, bromofenol azul al 0.25% y cianol de xileno al 0.25%) en una

proporción 1:2, calentando las placas durante 3 min. a 95°C. Las placas se mantuvieron en hielo hasta que las muestras se cargaron en el gel de secuenciación. Los productos desnaturalizados se cargaron en un gel de 6% poliacrilamida desnaturalizante (7M Urea) de 4 mm de grosor y de 38 × 50 cm de dimensiones. El sistema de secuenciación utilizado para la separación de los fragmentos, fue el Sequigen GT System (BIORAD). Se utilizó una peineta de 68 pozos (tipo dientes de tiburón) para separar los pozos, y a cada pozo se le agregó entre 5 y 8 µl de producto desnaturalizado. Cada corrida consistía de aproximadamente 50-60 amplificaciones. En la mayoría de las corridas se cargó el gel dos a tres veces, aumentando el número de muestras genotipificadas. Las diversas cargas de cada corrida consistían de amplificaciones del un mismo microsatélite, aunque en algunos casos se cargaron en el mismo gel diferentes loci de manera consecutiva. El tiempo de intervalo de carga (tiempo entre la primera y la segunda carga en el mismo posito) de muestras dependía del intervalo de tamaños de los alelos, los cuales variaban entre 125 y 242 pb para los seis microsatélites utilizados. La muestra de referencia se cargó varias veces en una corrida, además de una escalera de ADN de 10 pb (10bp DNA ladder, INVITROGEN) para determinar el tamaño de los productos de PCR. Cada gel se precalentó durante 30 min. y las corridas tuvieron una duración de 4-5 horas a 85W (a 1800V de potencia). Los geles se tiñeron con nitrato de plata sobre el vidrio del sistema de menores dimensiones. Para adherir el gel al vidrio, se utilizó Bind-Silane (Plusone, Amersham Biosciences), a la vez que el vidrio grande se trató con el repelente Sigmacote (SIGMA) para facilitar el despegue del gel. Al final de la corrida, los vidrios se separaron y el vidrio menor se colocó con el gel hacia arriba, en una charola de tinción con una solución de fijación (10% EtOH 2% HAc). Para visualizar los alelos, los geles se tiñeron con la técnica de tinción de nitrato de plata modificada (Anexo 2) descrita por Creste *et al.* (2001). Cada gel se secó al aire durante aproximadamente 24 horas, y el tamaño de los alelos se clasificó a mano sobre el vidrio con un plumón indeleble, visualizando las bandas (alelos) con un transiluminador de luz blanca. El tamaño de los alelos se

CAPITULO 3. Evaluación de la estructura genética, conectividad y estructura clonal de poblaciones de *Thalassia testudinum* a lo largo de la costa de la península de Yucatán.

estimó utilizando las referencias amplificadas y la escalera de ADN. Los vidrios marcados se escanearon y la imagen digital se mejoró y se guardó en formato TIFF con el uso del programa Photoshop CS v11 (Adobe).

Análisis de los datos

Parámetros básicos

Se capturaron los tamaños de los alelos de cada locus y de cada individuo en una hoja de cálculo en Microsoft Excel. Posteriormente se transformaron los valores a los diversos tipos de formatos necesarios para realizar los cálculos de variabilidad genética que se detalla en los siguientes párrafos. Esta transformación se realizó con el programa CONVERT (Glaubitz 2004) o a mano de ser necesario.

Se determinó la identidad de cada ramet y se analizó con el programa GenClone v1.0 de Arnaud-Haond y Belkhir (2007), el cual fue diseñado específicamente para el estudio de la genética clonal de pastos marinos. En los estudios genéticos básicos y en los de estructura genética, se utilizó una copia de cada genotipo para los genets que consistieron de varios ramets, esto para obtener un representante de cada genet y evitar la dominancia de los clones más grandes (la presencia de un clon muy grande sesgaría las frecuencias alélicas en una u otra dirección). La probabilidad de identidad clonal, p_{gen} , es la probabilidad de formación de cada genotipo en la población. Esta probabilidad depende de la frecuencia de los alelos. Por ejemplo, si un alelo tiene una baja frecuencia, la probabilidad de que un genotipo lo presente será igualmente baja. La probabilidad de identidad clonal, p_{gen} , se calculó como:

$$p_{gen} = \prod_{i=1}^l (f_i g_i) 2^h$$

CAPITULO 3. Evaluación de la estructura genética, conectividad y estructura clonal de poblaciones de *Thalassia testudinum* a lo largo de la costa de la península de Yucatán.

El valor de p_{gen} es uno de los estimadores que se obtuvieron utilizando el programa GenClone v1.0, el cual utiliza la ecuación de Parks y Werth (1993). Las variables que contempla son l , el número de loci; h , el número de loci heterocigotos; y f_i y g_i , las frecuencias alélicas de los alelos f y g en el locus i . Se realizó este cálculo para darnos una idea sobre el poder informativo de los seis microsatélites en cada población, ya que en poblaciones con pocos alelos (baja diversidad genética o bajo número de genets) la resolución es menor que en poblaciones con un alto número de alelos.

El cálculo de las frecuencias alélicas, la heterocigosidad observada (H_O), la diversidad genética de Nei o heterocigosidad esperada (H_E) (Nei 1973), y el número promedio de alelos por locus se llevó a cabo con el programa ARLEQUIN v3.1 (Excoffier *et al.* 2005). Se utilizó este mismo programa para realizar el Análisis de Variación Molecular o AMOVA (Analysis of Molecular VAriance), por medio de 1000 permutaciones y para calcular la diferenciación genética, F_{ST} , entre todos los pares de poblaciones a través del estimador θ (Weir y Cockerham 1984). También se usó el programa FSTAT v2.9.3.2 (Goudet 2002; Goudet 1995) para calcular el coeficiente de endogamia (F_{IS}) por población, estimado a través de f (Weir y Cockerham 1984); su nivel de significancia empírica se determinó con 2000 permutaciones. Se estimó el exceso y déficit de heterocigotos por población con el programa Genepop v. 3.4 (Raymond y Rousset 1995), basado en el método de Guo y Thompson (1992). Se aplicaron correcciones de Bonferroni a los niveles de significancia empírica (p) de los valores del índice de endogamia, F_{IS} (Rice, 1989). Dicha corrección se obtuvo dividiendo el valor límite de significancia, en este caso $p=0.05$, entre el número de marcadores utilizados (seis en este análisis).

Se determinaron las frecuencias alélicas de cada locus y se sometieron a una prueba de distribución normal (Shapiro-Wilk), utilizando el programa Analyse-It v1.73 (<http://www.analyse-it.com>). La diversidad alélica de cada población se describió a través de una gráfica del número promedio de alelos por locus contra el número de individuos seleccionados por población. Se

utilizaron estas graficas para determinar el número mínimo de genets necesarios para obtener una muestra representativa de cada población. El número de genets varió mucho por población debido a un alto grado de clonalidad en ciertas poblaciones. Para obtener un valor comparable de la diversidad genética de todas las poblaciones, se calculó la riqueza alélica por locus (R_l), después de haber aplicado una rarefacción (Kalinowski 2004, ajustar el número de muestras a un valor igual). La riqueza alélica representa un valor ajustado de la diversidad genética y es comparable entre todas las poblaciones. Las poblaciones se redujeron a un número idéntico de genets por población; así, las poblaciones grandes, que tienden a tener una mayor cantidad de alelos (Kalinowski 2002), tendrán una aportación equivalente a la evaluación de la variación genética. Este análisis se ejecutó con el programa HP-RARE (Kalinowski 2005).

Estructura poblacional

Para determinar si las poblaciones estudiadas presentaban una estructuración genética, éstas fueron analizadas con el programa STRUCTURE v. 2.1 (Prichard y Wen 2003), el cual determina el número más probable de agrupamientos de poblaciones por medio de un análisis Bayesiano. El valor K que selecciona el programa, representa el número de agrupamientos predeterminados (probabilidad *a priori*) en el análisis que va a realizarse. Este valor K varía entre 16 (i.e. cada población representa un grupo) y 1 (i.e. todas las poblaciones pertenecen a un grupo). El programa se ejecutó con un "burn-in length" (calentamiento) de 100,000 repeticiones, seguido por una corrida de 1,000,000 de repeticiones suponiendo entrecruzamiento libre y correlación en las frecuencias alélicas (se asume una alta migración o un ancestro común). Para corroborar que el valor de K era correcto, se calculó ΔK , como lo sugieren Evanno *et al.* (2005). Este análisis se realizó en 20 ocasiones independientes (con un burn-in de 10,000 y corridas de 100,000 repeticiones). El programa STRUCTURE hace una estimación del número de clusters presente. Sin embargo, cuando se utilizan pocos microsatélites

(menos de 10) y el número de muestras por población es escaso, este valor puede ser erróneo. En estos casos, ΔK ayuda a verificar si el valor calculado de K es correcto.

La estructuración también se visualizó con el uso de las frecuencias alélicas por medio de un árbol NJ (i.e. un Neighbor Joining tree, Saitou y Nei 1987) para ilustrar la distribución genética de las poblaciones. Este método no agrupa las poblaciones *a priori*, e ilustra gráficamente la distribución de las poblaciones por medio de la distancia genética. El árbol NJ se calculó con el programa DISPAN (Ota 1993), utilizando la distancia genética corregida de Nei (Nei *et al.* 1983), propuesta por Takezaki *et al.* (1996; 1983) como la medida más adecuada para establecer la topología de un árbol NJ con el uso de microsatélites, suponiendo un modelo de alelos infinitos (i.e. Infinite Allele Model, IAM). La topología del árbol NJ se basa en un re-muestreo de 2000 repeticiones y los valores del "bootstrap" se señalan en las bifurcaciones de las ramas.

Con los datos de distancia genética se ejecutó una prueba de Mantel para determinar el aislamiento por distancia (i.e. Isolation By Distance; Slatkin 1993; Wright 1943). Se graficaron las distancias genéticas contra las distancias geográficas entre los pares de poblaciones. La distancia genética utilizada fue la de Rousset: $F_{ST}/1-F_{ST}$ ($\theta/1-\theta$) (Rousset 1997); y la distancia geográfica fue la distancia, en km, de la línea recta más corta entre poblaciones a lo largo de la línea de costa. Esta distancia se determinó con el uso de las coordenadas de las poblaciones utilizando el programa ARCVIEW v.3.2a (ESRI Inc.) y SIG global mapper v.7.04 (Global Mapper Software LLC), empleando imágenes de satélite que se obtuvieron de la pagina del "Global Land Cover Facility", del "Institute for Advanced Computer Studies of the University of Maryland" (<http://glcfapp.umiacs.umd.edu:8080/esdi/index.jsp>). Las coordenadas de las líneas de costas se obtuvieron con "World Vector Shoreline" (WVS[®]) y los valores de las líneas de costa mundial se determinaron con la línea de marea alta promedio de la NGA (National Geospatial-Intelligence Agency) del "Office of Global Navigation, Maritime Division"

CAPITULO 3. Evaluación de la estructura genética, conectividad y estructura clonal de poblaciones de *Thalassia testudinum* a lo largo de la costa de la península de Yucatán.

(<http://www.nga.mil/portal/site/nga01>). La prueba de Mantel se realizó con el programa IBD 1.52 (Bohonak 2002), aplicando 10,000 muestreos al azar. El programa IBD 1.52 calculó el nivel de significancia empírica (p) de la correlación, la pendiente de la recta de regresión y el coeficiente de correlación R^2 , por medio de una regresión reducida de eje mayor (Reduced Major Axis, RMA) entre la distancia genética y la distancia geográfica. En el caso de las poblaciones de México, se decidió utilizar la distancia geográfica lineal, con base en las recomendaciones de Procaccini *et al.* (2007), ya que las poblaciones son costeras, por lo que se pueden considerar como lineales, siguiendo el modelo de dispersión de paso a paso. Los mismos autores sugieren que, en el caso de que las poblaciones estén distribuidas en dos dimensiones, se analicen como una estructura metapoblacional, lo que se reflejaría en un eje con distancias geográficas en escala logarítmica (Procaccini *et al.* 2007).

Para determinar la unidad panmíctica (el tamaño de la vecindad reproductiva) de *T. testudinum* con base en la diferenciación genética y la distancia geográfica entre las poblaciones, se realizaron varias regresiones estándar, cambiando el intervalo máximo de distancia entre las poblaciones de 50 en 50 km. Se inició con el cálculo de la regresión entre pares de poblaciones con una distancia menor de 200 km entre ellas, y se detuvo la prueba en cuanto la regresión resultaba significativa (i.e., aislamiento por distancia significativo).

Para determinar la dirección principal de flujo genético entre las poblaciones, se aplicó una prueba de asignación sobre las muestras, utilizando BayesAss v1.3 (Wilson *et al.* 2003). El propósito de este programa fue determinar los ancestros de cada individuo de cada población, asignando cada individuo a una de las siguientes categorías: no emigrante, emigrante, o hijo de emigrante con no emigrante (F1). Se calculó la población de origen más probable de cada genet con el método Bayesiano. Se utilizaron parámetros por defecto para determinar las asignaciones por medio de un muestreo tipo Cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC), con un calentamiento de 999,999 iteraciones, una corrida total de 3×10^6 y una frecuencia de muestro de 2000. Los

resultados de asignación se clasificaron en: 1) fracción asignada a la población de muestreo (no migrante); y 2) fracción asignada como inmigrantes. Para poder definir una dirección en el flujo genético se determinó la tasa de migración entre las poblaciones vecinas, ya que es más probable que la migración provenga de una población cercana. Se fijó una dirección de flujo genético predeterminado para asignar una dirección de flujo entre las poblaciones. Alrededor de la península de Yucatán la dirección de flujo se estableció en sentido contrario a las manecillas del reloj, iniciando con la población de Chinchorro con dirección hacia Veracruz.

Estructura clonal

El esquema de colecta se diseñó para determinar diferentes variables de clonalidad entre las poblaciones. Para el análisis de la estructura clonal se analizaron los genotipos de todos los ramets, y no únicamente los de los genets. Se determinó el número de ramets pertenecientes a cada genet con el programa GenClone v1.0 (Arnaud-Haond y Belkhir 2007), y se construyó un mapa clonal con la identidad de los ramets para cada población. La diversidad clonal o genotípica (R) de cada población se calculó como $R = [n-1]/[N-1]$ (Arnaud-Haond *et al.* 2005), en donde N es el número total de muestras genotipificadas y n es el número de genets encontrados. La diversidad clonal, R , es una medida corregida, pues sin la corrección (-1) el valor de una población depende del número de ramets. Así, si una población es monoclonal, el valor de R será de 0; y si la diversidad clonal es máxima, el valor de R alcanzará la unidad (todos los ramets provienen de diferentes genets). Además de este valor, se calcularon otras variables de clonalidad, como el tamaño del clon más grande (en número de ramets y su tamaño en metros), el número de genets con dos o más ramets y el número de genets únicos (1 ramet).

Resultados

ADN y parámetros básicos

Se amplificaron un total de 573 muestras con los seis loci de microsatélites seleccionados y se genotipificaron un total de 58 alelos, encontrándose un total de 315 genets o genotipos únicos. Se encontraron ramets con el mismo genotipo sólo al interior de las poblaciones, pero no entre las diferentes poblaciones. La probabilidad de identidad clonal p_{gen} para cada genotipo varió entre $p_{gen\ max.}=1.86 \times 10^{-03}$ en la Laguna de Términos y $p_{gen\ min.}=1.32 \times 10^{-10}$ en Ría Lagartos. El número de genets por población varió entre tres en Celestún y 29 en Punta Allen (Tabla 3.2). Todos los loci de todas las poblaciones fueron polimórficos y el número promedio de alelos por locus varió entre 3.3 en la Laguna de Términos y 6.5 en Majahual y Punta Allen (Tabla 3.2). En la Figura 3.3 se puede observar la curva de diversidad alélica que representa el número promedio de alelos por locus según el número de individuos (genets) muestreados. Se estimó un valor de 15 genets como mínimo, para tener una muestra representativa de la diversidad de una población. Este valor se estableció visualmente y corresponde al número de genets en el que el número promedio de alelos por locus se nivela. La mayoría de las poblaciones alcanzaron este número mínimo de genets con el número de muestras colectadas, excepto Ría Lagartos (10 genets), Celestún (3 genets) y Laguna de Términos (10 genets). El promedio de la riqueza alélica (R_i), con una rarefacción a 15 individuos, varió entre 3.7 (Alacranes Isla Pérez) y 5.8 (Majahual) alelos por población. La diversidad genética de Nei (H_E) de la población de Puerto Morelos resultó ser la más baja, con $H_E=0.549$, y la mayor correspondió a la población de Celestún, con $H_E=0.738$ (Tabla 3.2). El intervalo de la heterocigosidad observada abarcó desde $H_O=0.506$ en Puerto Morelos, hasta $H_O=0.833$ en Celestún. La mayoría de las poblaciones no mostraron una desviación significativa de las proporciones esperadas según el equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W), excepto la población de Puerto Morelos, que reveló un déficit

Tabla 3.2 Resumen de las propiedades genéticas de las poblaciones estudiadas de *Thalassia testudinum* en el Mar Caribe y el Golfo de México. Los nombres de las regiones y las poblaciones se encuentran en las columnas 1 y 2. Las demás variables son el número de ramets útiles (N), el número de genets (n) utilizados en el estudio poblacional, la heterocigosidad esperada (H_E) con su desviación estándar e intervalo de confianza, la heterocigosidad observada (H_O), el índice de endogamia F_{IS} (f) (los valores con un asterisco indican una desviación significativa del Equilibrio de Hardy-Weinberg, después de aplicar la corrección de Bonferroni), el número promedio de alelos por locus (A), la riqueza alélica después de estandarizar las poblaciones a un número de 15 genets (R_t) (las poblaciones señaladas con un guión no alcanzaron el número mínimo de 15 genets) y el valor más alto de la probabilidad genotípica de la población $p_{gen(max)}$.

Población	N	n	H_E	SE	H_O	F_{IS}	A	R_t	$p_{gen(max)}$
Caribe									
1. Chinchorro	36	26	0.725	0.140	0.724	0.001	6.2	5.7	9.93×10^{-6}
2. Majahual	36	26	0.702	0.174	0.712	-0.013	6.5	5.8	3.59×10^{-5}
3. Punta Allen	36	29	0.713	0.108	0.747	-0.049	6.5	5.6	5.68×10^{-5}
4. Cozumel	36	27	0.635	0.165	0.599	0.059	5.2	4.7	1.84×10^{-4}
5. Puerto Morelos	35	28	0.549	0.221	0.506	* 0.080	5.8	5.1	1.08×10^{-3}
6. Río Nizuc	36	15	0.656	0.143	0.726	-0.081	5.2	5.2	7.31×10^{-5}
7. Punta Sam	36	23	0.638	0.188	0.667	-0.047	6.0	5.6	9.11×10^{-5}
8. Isla Mujeres	35	25	0.684	0.170	0.727	-0.064	5.7	5.2	3.10×10^{-5}
Golfo de México									
9. Ría Lagartos	36	10	0.730	0.146	0.683	0.067	5.8	-	4.18×10^{-5}
10. Chabihau	36	16	0.697	0.098	0.792	* -0.141	5.3	5.3	1.30×10^{-4}
11. Alacranes Isla Pérez	36	25	0.582	0.090	0.613	-0.055	4.0	3.7	5.55×10^{-4}
12. Alacranes Isla Desterrada	36	19	0.668	0.147	0.614	0.083	5.2	5.0	6.76×10^{-5}
13. Celestún	36	4	0.738	0.079	0.833	-0.154	3.8	-	1.46×10^{-4}
14. Ciudad del Sol	35	17	0.638	0.224	0.637	0.002	5.2	5.0	7.71×10^{-5}
15. Laguna de Términos	36	10	0.611	0.109	0.650	-0.067	3.3	-	3.50×10^{-4}
16. Veracruz	36	19	0.602	0.133	0.614	-0.021	4.7	4.5	5.09×10^{-4}

de heterocigotos, y la de Chabihau, con un exceso de heterocigotos. El locus TTMS-GA-006 mostró tener un déficit significativo del equilibrio de H-W promediado sobre todas las poblaciones y el locus TTMS-TCT-058 un ligero exceso, pero significativo.

El análisis de la distribución de alelos por medio de la prueba Shapiro-Wilk demostró que los seis loci se alejan de una distribución normal ($p < 0.0001$ para los seis loci), lo que sugiere que el modelo más adecuado de mutación para los microsatélites utilizados fue el de alelos infinitos (Infinite Allele Model, IAM). Este modelo de mutación de los loci (que busca explicar el cambio en el número de repeticiones que conforman al microsatélite) parte del supuesto de que la formación de nuevos alelos da lugar a longitudes aleatorias. El segundo modelo de mutación sugerido para los microsatélites es el de paso a paso (Stepwise Mutation Model, SMM) el cual supone que como resultado de los eventos de mutación, únicamente ocurre un aumento o una disminución de una repetición del microsatélite, generando de esta manera una grafica de distribución normal (Goldstein *et al.* 1999).

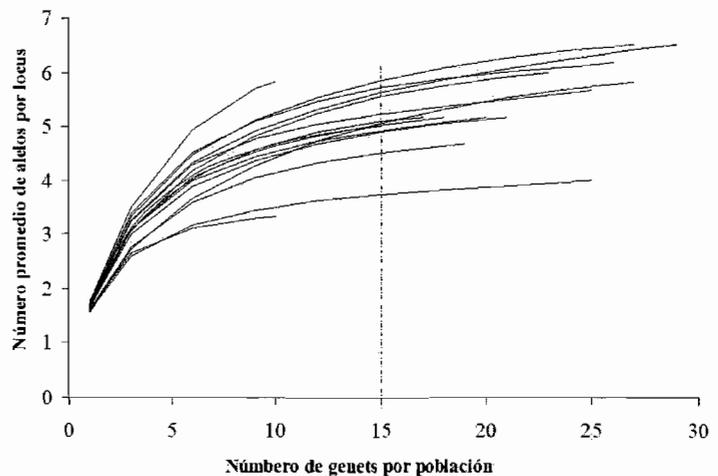


Figura 3.3 Diversidad alélica en las poblaciones estudiadas de *Thalassia testudinum*. Se muestra el número promedio de alelos por locus ($N = 6$ loci) contra el número de genes. Cada línea representa una población. La línea vertical se determinó visualmente y representa, aproximadamente, el número mínimo (15) de genes necesarios para obtener una muestra representativa de la variación genética.

CAPITULO 3. Evaluación de la estructura genética, conectividad y estructura clonal de poblaciones de *Thalassia testudinum* a lo largo de la costa de la península de Yucatán.

Estructura poblacional

El análisis de varianza molecular (AMOVA) reveló que sólo el 9.8% de la diversidad genética encontrada puede atribuirse a la variación inter-poblacional, mientras que el 90.2% restante es resultado de la variación intra-poblacional. El índice de fijación genética global (F_{ST}) fue de 0.098 ($p < 0.000$), expresando una diferenciación ligera entre todas las poblaciones en general.

Se utilizó el programa STRUCTURE para estimar el

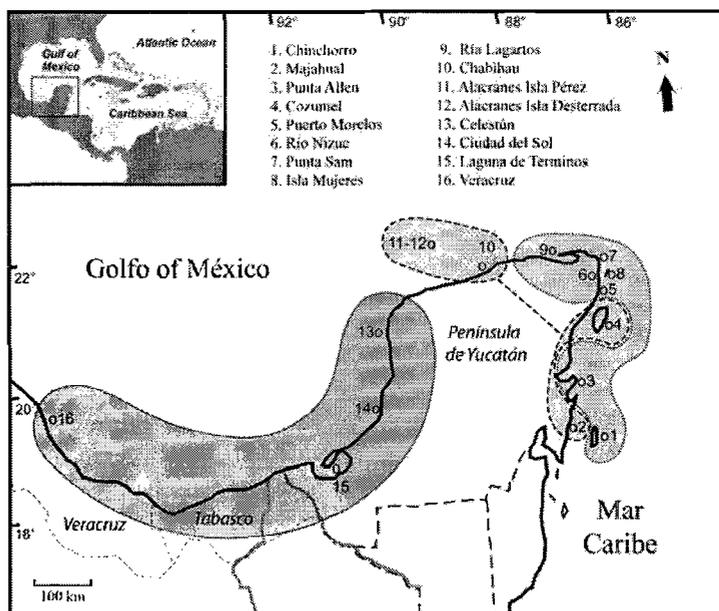


Figura 3.4 Distribución de las 16 poblaciones de *T. testudinum* estudiadas en México, formando tres agrupamientos ($K=3$) determinados con el programa STRUCTURE v2.1 (Pritchard y Wen 2003). La ubicación de la zona de estudio y la distribución de la especie se observan en el mapa de la esquina superior. Con líneas moradas se señalan los ríos más importantes de la región de estudio: el Grijalva y el Usumacinta.

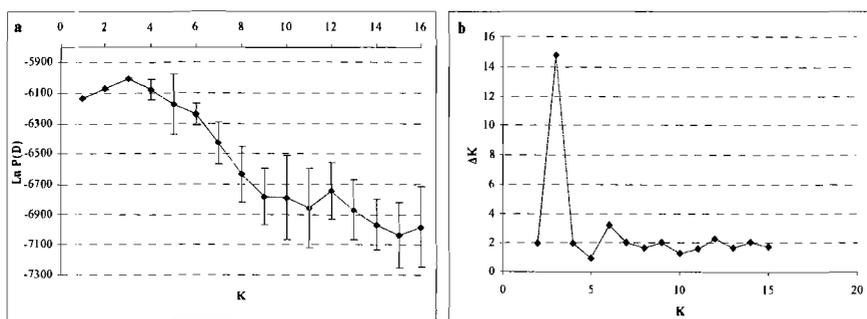


Figura 3.5 a Gráfica que ilustra los valores de probabilidad $\ln P(D)$, con sus errores estándar, para los diferentes valores de K (número de clusters) calculados con el programa STRUCTURE v2.1 (Pritchard *et al.* 2000). **b.** Gráfica que refleja la relación de ΔK contra K , el cálculo *ad hoc* sugerido por Evanno *et al.* (2005), el pico de la gráfica indica el valor de K más adecuado.

número más probable de agrupamientos entre las poblaciones estudiadas. Éste sugirió la existencia de tres clusters, no siempre bien definidos, lo que se expresó en bajas probabilidades de

CAPITULO 3. Evaluación de la estructura genética, conectividad y estructura clonal de poblaciones de *Thalassia testudinum* a lo largo de la costa de la península de Yucatán.

Tabla 3.3 La proporción de asignación de cada población a cada uno de los tres agrupamientos determinados por STRUCTURE v2.1 Pritchard *et al.* (2003). El valor estimado de la log-verosimilitud ($\log P$) fue mayor para $K=3$ agrupamientos, con un burn-in (calentamiento) de 100,000 y 1,000,000 repeticiones. La distribución de las poblaciones se basó en el mayor valor de probabilidad de pertenencia (en negritas). La distribución geográfica de las poblaciones se presenta en la Figura 3.4. La última columna presenta el número de genets por población. La última fila presenta el valor de F_{ST} promedio de cada cluster.

Población	Agrupamientos definidos por STRUCTURE			Número de genets
	1	2	3	
1. Chinchorro	0.573	0.230	0.197	26
2. Majahual	0.298	0.522	0.180	26
3. Punta Allen	0.420	0.391	0.189	29
4. Cozumel	0.353	0.364	0.283	27
5. Puerto Morelos	0.643	0.201	0.156	28
6. Río Nizuc	0.488	0.084	0.428	15
7. Punta Sam	0.537	0.120	0.344	23
8. Isl. Mujeres	0.448	0.168	0.383	25
9. Ria Lagartos	0.421	0.283	0.296	10
10. Chahihau	0.324	0.403	0.274	16
11. Alacranes Isla Pérez	0.075	0.827	0.098	25
12. Alacranes Isla Desterrada	0.162	0.634	0.205	19
13. Celestún	0.212	0.195	0.593	4
14. Ciudad del Sol	0.278	0.140	0.582	17
15. Laguna de Términos	0.061	0.082	0.857	10
16. Veracruz	0.088	0.196	0.716	19
F_{ST} promedio	<i>0.049</i>	<i>0.128</i>	<i>0.0987</i>	

asignación de las poblaciones a los clusters (Tabla 3.3). También por el método *ad hoc* de Evanno *et al.* (2005) se obtuvo un valor de $K=3$, como el número más probable de clusters; éste se define por la presencia de un máximo claro en la gráfica de K con respecto a ΔK (Figura 3.5 b). Finalmente la probabilidad posterior ($P(K|X)$) para $K=3$ fue de 1.00. Los valores de asignación más altos por población (Tabla 3.3), asumiendo la existencia de estos tres clusters, variaron entre 0.364 (Cozumel) y 0.857 (Laguna de Términos). Además, las poblaciones asignadas a cada cluster no demostraron tener siempre una organización geográfica muy definida, lo que se

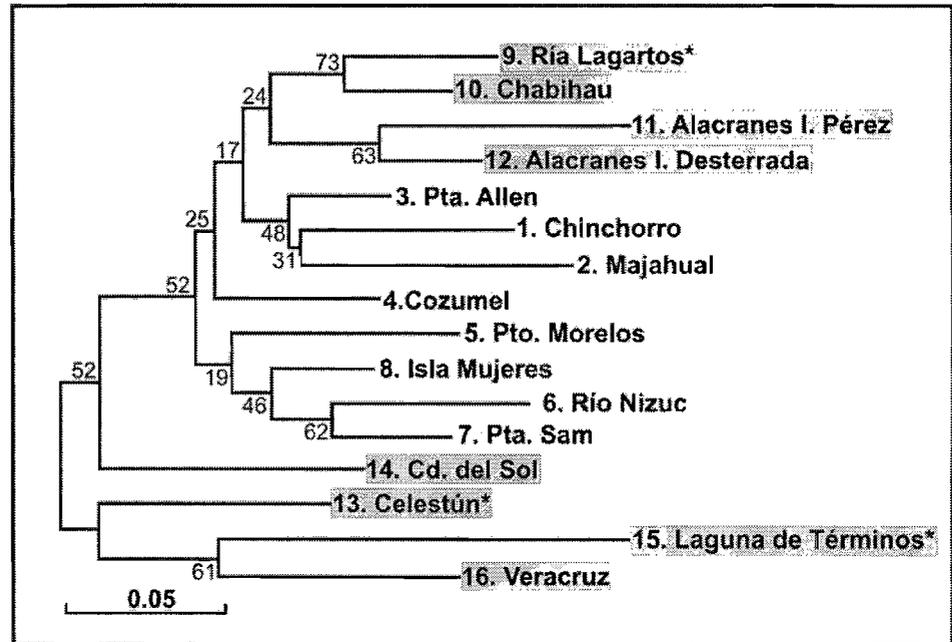
observa más con los clusters del Caribe y el norte de Yucatán (cluster 1 y 2, Figura 3.4), que se podrían considerar como un grupo. El segundo grupo incluye a las poblaciones del Golfo de México (cluster 3). La mayoría de las asignaciones fueron mayores de 0.50, y las que resultaron más bajas

no lograron definirse bien. En el caso de que una población no fuera asignada a un cluster, la probabilidad de asignación debería de ser $1/K$, en este caso $p \approx 0.333$.

La distribución genética de las poblaciones también se ilustró por medio de el árbol NJ (Neighbor Joining) más cercano, que mostró un agrupamiento significativo basado en un valor de bootstrap mayor de 70%; éste estuvo formado por las dos poblaciones cercanas del norte de la Península de Yucatán, en el Golfo de México: Ría Lagartos y Chabihau (Figura 3.6).

Con un valor de ~60% se agruparon las poblaciones de Laguna de Términos y Veracruz, y las dos poblaciones de Alacranes, al igual que las poblaciones de Río Nizuc y Punta Sam. Para las demás

ramificaciones los valores de bootstrap fueron muy bajos, lo que no permitió agruparlas con certeza en ninguno de los grupos, indicando



nuevamente una baja estructuración genética.

Figura 3.6 Árbol NJ más cercano, ilustrando las relaciones más estrechas de las poblaciones de *Thalassia testudinum* en el Caribe (blanco) y el Golfo de México (gris). Las longitudes de las ramificaciones representan la distancia genética corregida (D_A) de Nei (Takezaki y Nei 1996; Nei *et al.* 1983). Se realizó un remuestreo de 2000 repeticiones (bootstrap) para calcular los valores de las ramificaciones (en %). Las poblaciones marcadas con un asterisco (*) consistían de menos de 15 genets.

Aislamiento por Distancia

Los resultados del análisis de aislamiento por distancia mostraron una relación altamente significativa entre la distancia genética y la distancia geográfica, pero la línea de regresión explica sólo una baja proporción de la varianza (Prueba de Mantel, $p < 0.0024$, $R^2 = 0.207$, Figura 3.7). La distancia genética se calculó como lo sugiere Rousset (1997): $F_{ST}/(1-F_{ST})$. Los valores de diferenciación genética entre pares de poblaciones (F_{ST}) variaron entre 0.000 y 0.256, y la frecuencia alélica de los seis loci fue idéntica entre las poblaciones de Chabihau y Ría Lagartos. Además, se encontró una diferenciación de moderada a alta entre las poblaciones de Puerto Morelos y de Veracruz.

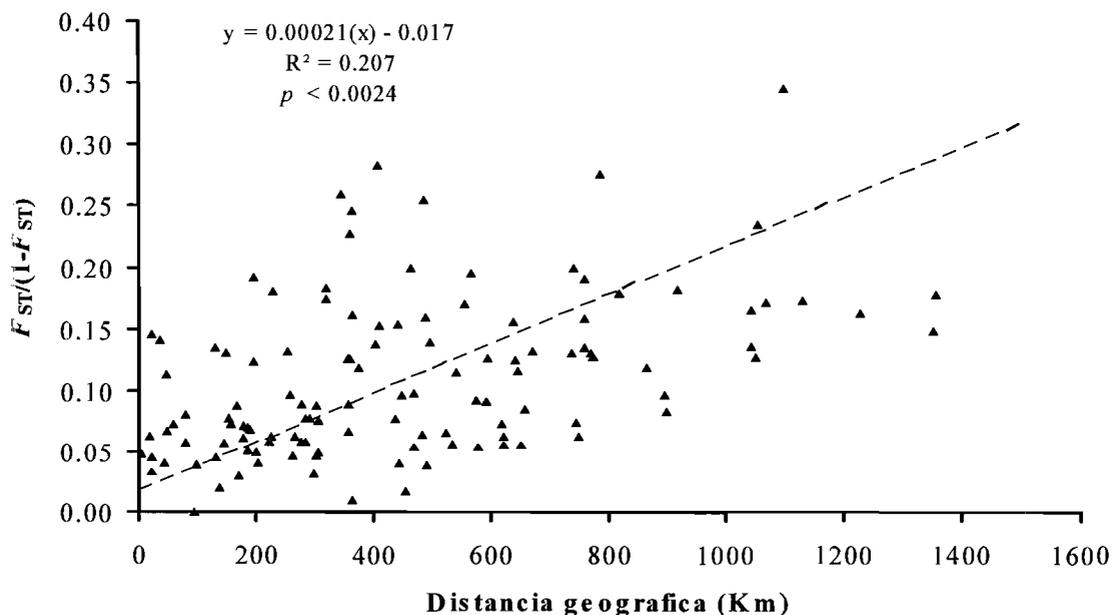


Figura 3.7 Aislamiento por distancia entre las poblaciones de *Thalassia testudinum* del Golfo de México y Caribe Mexicano. Se presenta la relación entre la distancia genética $F_{ST}/(1-F_{ST})$ ($\theta/1-\theta$) (Rousset 1997) entre pares de poblaciones y la distancia geográfica. Se realizó una prueba de Mantel aplicando 10.000 muestreos al azar (Bohonak 2002); la pendiente de la recta y la significancia de la relación se obtuvieron por medio de una regresión de eje mayor reducida.

Tabla 3.4 Las distancias geográficas y la diferenciación genética entre pares de poblaciones de *Thalassia testudinum*. La distancia geográfica (arriba de la diagonal) es la distancia en km. más corta sobre mar tomando las líneas costeras como barrera física. La diferenciación genética o $F_{ST}(\theta)$ entre pares de poblaciones se encuentra debajo de la diagonal. El valor $F_{ST}(\theta)$ fue significativo en la mayoría de los casos ($P < 0.05$), excluyendo los valores marcados con *. Los valores negativos de F_{ST} se ajustaron a cero.

Población	Chin	Maja	PtAl	Cozu	PtMo	RNiz	PtSa	IsMu	RiaL	Chab	AlaP	AlaD	Cele	CdSo	TerL	Vera
Caribe																
1. Chinchorro	-	44	140	225	258	284	304	305	491	580	648	653	749	900	1044	1356
2. Majahual	0.0388	-	131	222	255	285	301	301	486	577	645	659	746	897	1041	1351
3. Punta Allen	0.0203	0.0434	-	99	132	155	178	178	363	454	542	536	623	774	918	1228
4. Cozumel	0.0590	0.0559	0.0378	-	35	57	80	80	265	356	444	438	525	676	820	1130
5. Puerto Morelos	0.0882	0.1168	0.1185	0.1233	-	23	46	46	231	322	410	404	491	642	786	1096
6. Río Nizuc	0.0551	0.0716	0.0680	0.0681	0.1269	-	20	23	202	293	360	374	468	620	761	1069
7. Punta Sam	0.0709	0.0808	0.0670	0.0544	0.1012	0.0319	-	5	187	278	366	360	447	597	742	1052
8. Isla Mujeres	0.0476	0.0447	0.0575	0.0746	0.0636	0.0430	0.0455	-	185	276	363	358	444	595	740	1050
Golfo de México																
9. Ría Lagartos	0.0378	0.0601	0.0096*	0.0592	0.1532	0.0469	0.0658	0.0481	-	94	196	191	262	413	558	868
10. Chabihau	0.0521	0.0841	0.0174	0.0631	0.1549	0.0720	0.0814	0.0549	0.0*	-	150	147	170	321	465	776
11. Alacranes Isla Pérez	0.1034	0.1111	0.1022	0.1330	0.2201	0.1854	0.1974	0.1393	0.1092	0.1152	-	18	195	346	489	761
12. Alacranes Isla Desterrada	0.0521	0.0779	0.0521	0.0726	0.1211	0.1057	0.1114	0.0814	0.0648	0.0538	0.0598	-	206	356	498	760
13. Celestún	0.0595	0.0697	0.0532	0.0622	0.1377	0.0519	0.0882	0.0390	0.0445*	0.0293*	0.1615	0.0397*	-	152	297	624
14. Ciudad del Sol	0.0774	0.0883	0.1155	0.1170	0.1345	0.0684	0.1114	0.0837	0.1328	0.1487	0.2057	0.1123	0.0717	-	167	570
15. Laguna de Términos	0.1418	0.1197	0.1535	0.1515	0.2161	0.1193	0.1660	0.1155	0.1453	0.1661	0.2032	0.1218	0.0312*	0.0814	-	470
16. Veracruz	0.1504	0.1294	0.1404	0.1472	0.2559	0.1466	0.1900	0.1129	0.1064	0.1126	0.1597	0.1372	0.0593	0.1627	0.0890	-

Las distancias geográficas entre los pares de poblaciones variaron entre 5 y 1356 km (Tabla 3.4).

Por medio de varios análisis de regresión de la distancia genética con la distancia geográfica, se estimó la unidad panmictica para las poblaciones de *Thalassia testudinum* de las costas de México. Esta regresión se calculó a diferentes escalas, iniciando con las poblaciones que se encuentran a una distancia menor de 200 km entre ellas, y aumentando la escala de 50 en 50 km. De los 200 hasta los 350 km la regresión no fue significativa ($p=0.069$): arriba de los 350 sí lo fue ($p=0.0061$ a 400 km), indicando que la unidad panmictica es de por lo menos 350 km.

Dirección del flujo genético

Los resultados de la tasa de migración que se obtuvieron por medio del programa BayesAss v.1.3, utilizando una estimación Bayesiana se pueden observar en la Tabla 3.5. Para la mitad de las poblaciones la fracción de no migrantes fue relativamente grande (>0.95), sugiriendo que los individuos eran originarios de la misma población. Para las poblaciones con un tasa de inmigración mayor, generalmente $\sim 30\%$ de los genets provenían de otras poblaciones o eran hijos (F1) de un inmigrante con un genet no migrante. En general, la fracción de inmigración desde las poblaciones vecinas fue muy baja. Las poblaciones que se destacaron más fueron las de Río Nizuc, con un porcentaje de inmigrantes de 15.24 % provenientes de la población Punta Sam, Ría Lagartos con 8.76% de inmigrantes provenientes de Chabihau, y Laguna de Términos, con una inmigración de 15.50% proveniente de la población de Ciudad del Sol. Con los datos de migración fue imposible visualizar la dirección de flujo genético, ni en favor, ni en contra de la dirección predeterminada; más bien, la migración parece ser estocástica. También es posible que la migración sea de un origen más lejano que del vecino directo, pero no fue posible visualizar este fenómeno. Además, es posible que

CAPITULO 3. Evaluación de la estructura genética, conectividad y estructura clonal de poblaciones de *Thalassia testudinum* a lo largo de la costa de la península de Yucatán.

Tabla 3.5 Porcentaje de migración de acuerdo con los resultados de asignación de BayesAss v.1.3. Las poblaciones se agruparon en regiones: Caribe, Golfo de México y México total. Las variables que se presentan son el porcentaje de individuos asignados a su propia población, con su intervalo de confianza de 95%; el porcentaje de inmigrantes por población; el porcentaje de migrantes que se originan de la población vecina corriente arriba, y el porcentaje de inmigrantes que se originan de la población vecina corriente abajo. El número total de interacciones fue de 3,000,000 por medio de una cadena de Markov Monte Carlo, de las cuales 999,999 fueron de calentamiento, y la frecuencia de muestreo fue de 2000.

Población (Región)	% no-migrantes en la población	95% Intervalo de confianza	% inmigrantes en la población	% inmigrantes vecino población arriba	% inmigrantes vecino población abajo
Caribe (Prom.)	83		17.0		
1Chinchorro	97	88 - 100	3.1	-	0.28
2 Majahual	98	92 - 100	2.2	0.17	0.12
3 Punta Allen	68	67 - 72	32.1	2.56	0.40
4 Cozumel	69	67 - 77	31.4	0.44	1.10
5 Puerto Morelos	98	93 - 100	2.0	0.11	0.11
6 Río Nizuc	69	67 - 73	31.4	4.19	15.24
7 Punta Sam	98	92 - 100	2.2	0.12	0.15
8 Isla Mujeres	68	67 - 73	31.7	3.76	0.35
Golfo de México (Prom.)	84		15.8		
9 Ría Lagartos	70	67 - 77	30.0	1.54	8.76
10 Chahihau	97	91 - 100	2.6	0.15	0.24
11 Alacranes Isla Pérez	99	95 - 100	1.4	0.10	0.12
12 Alacranes Isla Desterrada	69	67 - 76	30.8	1.11	0.63
13 Celestún	72	67 - 85	27.5	1.46	3.37
14 Ciudad del Sol	98	91 - 100	2.4	0.13	0.13
15 Laguna de Términos	70	67 - 76	30.3	15.5	1.05
16 Veracruz	98	94 - 100	1.7	0.13	-
México total	83	68 - 99			

la migración no se detecte por la similitud de la distribución de la variabilidad en las poblaciones, si es que hay migración que no da lugar a cambios en las frecuencias alélicas.

Diversidad Clonal

En la figura 3.8 se ilustran, en un mapa clonal, los genets y ramets de las poblaciones estudiadas de *Thalassia testudinum*. En el mapa clonal se ilustra cada población según el esquema de colecta que se aplicó en todas las poblaciones. En esta figura se observa la ubicación de cada

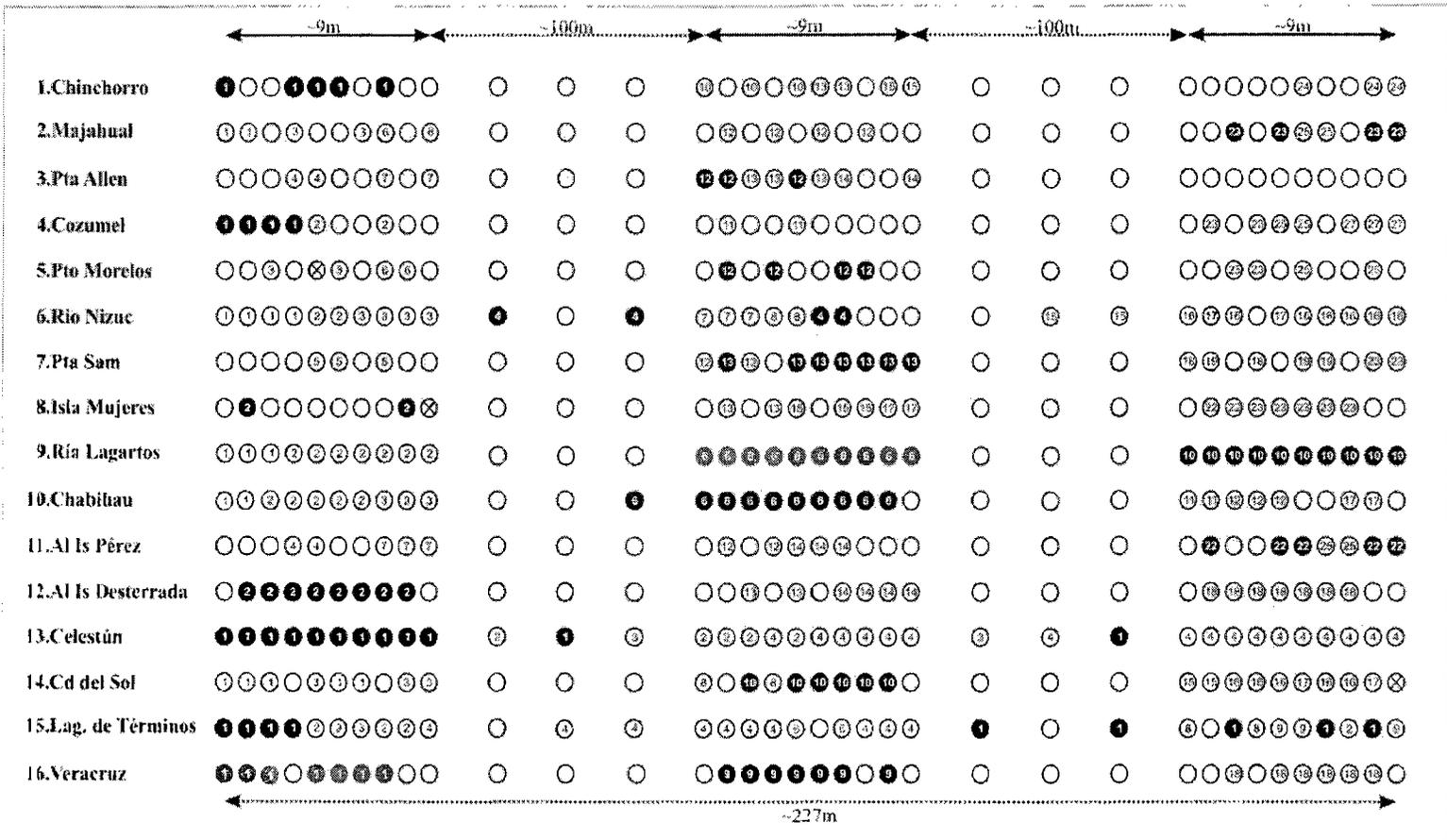


Figura 3.8 Mapa clonal de identidad de ramets, las recolectas consistieron de 36 muestras sobre una línea de 227 m. Cada círculo representa una muestra recolectada bajo el esquema de la Figura 3.2. Un círculo vacío representa un ramet con genotipo único, un genet de más de un individuo es representado por 2 o más círculos con el mismo número. El genet con círculos negros representa el individuo más grande en tamaño (m) de la población. Si dos genets son iguales de tamaño, el número de ramets determina el genet más grande, y si dos genets son idénticos en tamaño y en número de ramets, el primer genet es representado por círculos negros y el segundo por círculos grises. Las muestras que no fueron genotipificadas tienen una cruz dentro del círculo.

CAPITULO 3. Evaluación de la estructura genética, conectividad y estructura clonal de poblaciones de *Thalassia testudinum* a lo largo de la costa de la península de Yucatán.

Tabla 3.4. Valores de diferentes variables de clonalidad. La diversidad clonal está representada por $R = (n-1)/(N-1)$ (Arnaud-Haond *et al.* 2005). Si este valor es 0 la población es monoclonal, si el valor es 1 todos los ramets son de genets distintos. * = El genet más grande en tamaño, (aunque no en cuanto al número de ramets). En la Figura 3.8 se puede distinguir los ramets y genets correspondientes.

Población	No. de ramets (N)	No. de genets (n)	Diversidad clonal R (n-1/N-1)	Genets con más de 1 ramet (Promedio de No. de ramets por genet)	Genets de 1 ramet	Tamaño del genet más grande (m) - No. De ramets.
1. Chinchorro	36	26	0.71	5 (3.0)	21	7 - 5
2. Majahual	36	26	0.71	6 (2.7)	20	7 - 4
3. Pta. Allen	36	29	0.80	5 (2.4)	24	4 - 3
4. Cozumel	36	27	0.74	6 (2.5)	21	3 - 4
5. Pto. Morelos	35	28	0.79	5 (2.4)	23	6 - 4
6. Río Nizuc	36	15	0.40	9 (3.3)	6	81 - 4*
7. Pta. Sam	36	23	0.63	6 (3.2)	17	8 - 7
8. Isla Mujeres	35	25	0.71	6 (2.7)	19	6 - 2*
9. Ría Lagartos	36	10	0.26	4 (7.5)	6	9 - 10
10. Chabihau	36	16	0.43	7 (3.9)	11	33 - 10
11. Al. Isla Pérez	36	25	0.69	6 (2.8)	19	8 - 5
12. Al. Isla Desterrada	36	19	0.51	4 (5.3)	15	7 - 8
13. Celestún	36	4	0.09	4 (9.0)	0	195 - 12*
14. Cd. del Sol	35	17	0.47	7 (3.6)	10	6 - 6
15. Laguna de Términos	36	10	0.26	7 (4.6)	3	226 - 9*
16. Veracruz	36	19	0.51	3 (6.7)	16	7 - 7

ramet y se pueden apreciar el tamaño y el número de ramets de cada genet. Los valores de diversas variables de clonalidad se encuentran en la Tabla 3.4. La diversidad clonal, R , que representa el nivel de clonalidad dentro de las poblaciones (si $R=0$, la población es un solo genet; si $R=1$, todos los ramets provienen de diferentes genets), varió entre 0.09 para Celestún, la que resultó ser la población más clonal de todas, y $R=0.80$ para Punta Allen, la cual tuvo una alta diversidad clonal o un mayor número de genets en el transecto colectado. El clon más grande en tamaño (m) se registró en la Laguna de Términos, con una extensión de 226 m y consistía de nueve ramets. El clon más grande en número de ramets se encontró en Celestún, con un total de 17 ramets y 195 m de extensión.

Discusión

Sobre los Métodos empleados

El esquema de muestreo utilizado fue exploratorio y se diseñó para comparar la diversidad genética y clonal entre las diferentes poblaciones (Figura 3.2). Este muestreo anidado permitió la colecta de material biológico a diferentes escalas, desde un metro hasta cientos de metros, considerando que de esta manera se lograría la representatividad de ramets pertenecientes a diferentes genets. Además, este diseño del muestreo permitió estimar el tamaño de los genets dentro de los transectos, a partir de lo cual se identificaron genets muy grandes. El genet más grande se encontró en la Laguna de Términos, con un tamaño de 226 m que consistía de 9 ramets. Esto lleva a la conclusión de que el diseño del muestreo no abarcó áreas lo suficientemente grandes como para cubrir el tamaño completo de un genet, pues los dos haces más extremos de este clon se encontraron al inicio y al final del transecto. La distancia mínima entre dos genets diferentes fue de 1 m, la cual fue la distancia mínima entre los ramets colectados en los transectos. En estudios anteriores con esta misma especie, se reportó que las distancias mínimas entre genets variaron entre < 0.25 y 2.0 m (Waycott y Barnes 2001; Davis *et al.* 1999), lo cual coincide con los resultados encontrados. Si el muestreo se hubiera realizado en intervalos menores entre muestras, las distancias entre los genets también hubieran sido menores. Hay que mencionar que un gran número de los ramets colectados dentro de los cuadros de 10 muestras fueron genets únicos (Figura 3.2 y 3.8), indicando que existen muchos genets diferentes coexistiendo mezclados en un espacio relativamente reducido, lo que es más notorio en las poblaciones del Caribe mexicano.

Otro aspecto importante sobre el diseño del muestreo, fue que el transecto no siempre abarcó el área necesaria para incorporar al número de genets requerido para realizar un análisis adecuado de la diversidad y la estructuración genética. La población de Celestún, por ejemplo, consistió

únicamente de cuatro genets. Para estudios futuros de conectividad y estructuración genética en esta especie, y quizá en otros pastos marinos, es recomendable realizar colectas en intervalos mucho más grandes entre haces, y cubrir distancias de decenas a miles de metros por población, evitando así el muestreo doble de genotipos. Si el objetivo del estudio es describir la diversidad clonal de una población, el muestreo deberá consistir de un número mayor de muestras con sus respectivas coordenadas. Además, como lo afirman Arnoud-Haond *et al* (2007a), la forma del área de muestreo es importante, siendo mejor en un cuadrado o un círculo.

Se debe de hacer hincapié en que únicamente se utilizaron seis microsátélites en el análisis (con un total de 58 alelos); en general, se recomienda incrementar el número de loci con el objeto de disminuir los valores de p_{gen} , y aumentar la certeza de que todos los genets pudieron reconocerse. Un locus que debería ser substituido es el TTMS-GA6, ya que en algunas poblaciones presentó problemas de reproducibilidad durante las amplificaciones y la visualización de las bandas, además, presentó un déficit significativo en el equilibrio de Hardy-Weinberg promediado sobre todas las poblaciones. Otro locus que también se podría sustituir es el TTMS-GT112, pues únicamente presentó tres alelos, por lo que no fue muy informativo. Tomando en cuenta los costos y el esfuerzo que involucra el análisis, valdría la pena usar solo los microsátélites que presentan un alto número de alelos.

Se realizó una estancia en el Departamento de Ciencias del Medio Ambiente de la Universidad de Virginia en Charlottesville, Virginia, Estados Unidos, bajo la supervisión del Dr. Joseph C. Zieman, la Dra. Michelle Waycott y el M. en C. Eric Bricker, con el objetivo de genotipificar los genets más grandes de este estudio y calibrar los resultados de nuestro laboratorio con los obtenidos con el secuenciador automático MegaBACETM (GE Healthcare Life Sciences) de ese laboratorio. Durante dicha estancia se amplificaron los microsátélites de este estudio, pero además se agregaron los marcadores Th1-MS, TTMS-GA12, TTMS-GA72, TTMS-GT77, TTMS-

CAPITULO 3. Evaluación de la estructura genética, conectividad y estructura clonal de poblaciones de *Thalassia testudinum* a lo largo de la costa de la península de Yucatán.

GT104 y TTMS-GA180 (Van Dijk *et al.* 2007). Se analizaron los ramets de los genets más grandes que se encontraron en este estudio (de Celestún y Laguna de Términos) para asegurar que efectivamente pertenecían a un mismo genet. Al utilizar 12 loci de microsatélites (en lugar de los seis aquí incluidos) no se observó ningún cambio en el número de ramets, ni tampoco en el tamaño de los genets analizados, lo que permitió tener más certeza de que dichos ramets realmente eran parte del mismo genet. Esto indica que los seis loci utilizados fueron adecuados para la realización de los estudios genéticos en las poblaciones de *Thalassia testudinum* de México.

Para las poblaciones que se incluyeron en este estudio y que fueron analizadas con los seis loci de microsatélites, la probabilidad de identidad clonal para cada genotipo por separado varió entre $p_{\text{gen max.}}=1.86 \times 10^{-03}$ en Laguna de Términos, y $p_{\text{gen min.}}=1.32 \times 10^{-10}$ en Ría Lagartos. Este valor representa la probabilidad de formación de cada genotipo presente, bajo las frecuencias de los alelos disponibles en la población. La p_{gen} máxima de la población de Laguna de Términos no fue tan baja, lo que se refleja en el bajo valor de A (número de alelos por locus). Las posibilidades para formar genotipos distintos son muy bajas, debido a la falta de variación, lo que podría verse afectado aun más por la presencia de alelos muy dominantes. Si se tuviera un mayor número de microsatélites, el valor de p_{gen} disminuiría considerablemente, ya que el genotipo se va haciendo más específico al aumentar el número de loci y de alelos.

Estructura genética y conectividad

La Península de Yucatán presenta una variedad de hábitats costeros en los que se distribuye *Thalassia testudinum*. El muestreo de las poblaciones incluyó ecosistemas arrecifales, humedales con manglares y estuarios someros turbios. A pesar de haber incluido esta diversidad de hábitats, se encontró que la alta diversidad genética de esta especie se encuentra escasamente estructurada. La diversidad resultó ser mayor de lo que anteriormente se había encontrado en otros sitios con el uso de

CAPITULO 3. Evaluación de la estructura genética, conectividad y estructura clonal de poblaciones de *Thalassia testudinum* a lo largo de la costa de la península de Yucatán.

marcadores menos variables (Waycott y Barnes 2001; Davis *et al.* 1999; Kirsten *et al.* 1998; Schleuter y Guttman 1998). El nivel de diversidad genética fue similar en las diferentes localidades de México, lo que se expresó en la similitud de la riqueza alélica entre las poblaciones.

La distribución de la diversidad genética coincidió con lo que se registró en los trabajos anteriores con esta especie, usando otros marcadores. El análisis de variación molecular (AMOVA) reveló, aun a una escala de más de mil kilómetros, que la diversidad genotípica intra-poblacional es mucho mayor (90.2%) que la diversidad genotípica inter-poblacional. Los valores de variación molecular encontrados fueron similares a los detectados en *T. testudinum* utilizando AFLPs (Waycott y Barnes 2001) y RAPDs (Larkin *et al.* 2006; Kirsten *et al.* 1998), a escalas de distancia similares entre poblaciones que las de este estudio. El bajo valor de diferenciación genética entre las poblaciones de *T. testudinum* indica que existe una dispersión de genes significativa alrededor de la Península de Yucatán. Los valores estimados del número de migrantes por generación (Nm) más altos entre pares de poblaciones (resultados no mostrados, calculados con Arlequín; (Schneider *et al.* 2002)) fueron entre Puerto Morelos y Veracruz, con $Nm=1.5$, y entre Ría Lagartos y Chabihau, con $Nm=\infty$ (resultado de un valor de F_{ST} negativo y ajustado a 0.00); el promedio fue de 6.7 migrantes por generación (excluyendo $Nm=\infty$), indicando que hay una tasa de migración alta entre todas las poblaciones.

Aislamiento por distancia y dispersión de propágulos

Los resultados del análisis de aislamiento por distancia indican que hay una relación positiva y muy significativa ($p<0.0024$) entre la distancia genética y la distancia geográfica entre pares de poblaciones, pero la varianza explicada por el modelo estadístico fue relativamente baja ($R^2=0.207$). El modelo de aislamiento por distancia utilizado se basa en un supuesto de dispersión del tipo “paso a paso”, en el que la distancia genética aumenta al aumentar la distancia geográfica. Si se observa la

gráfica de aislamiento por distancia (Figura 3.7), se puede notar una alta dispersión de los puntos, lo que se vio reflejado en el bajo valor de R^2 . Esto puede indicar que el flujo génico es alto, y sugiere que la dispersión de los frutos constituye un proceso complejo, pues en ocasiones se observa una alta diferenciación a cortas distancias, y en otras una alta similitud a largas distancias. Las regresiones que se realizaron a diferentes escalas de distancia, permitieron definir de manera aproximada el tamaño de la vecindad reproductiva, o la unidad "panmíctica". Éstas indicaron que la unidad panmíctica es de por lo menos 350 km, ya que a distancias mayores de 400 km las regresiones resultaron significativas. Se puede concluir que las poblaciones alrededor de la Península de Yucatán están altamente conectadas y que los frutos de *Thalassia testudinum* se dispersan a distancias desde cientos de metros a cientos de kilómetros, repartiendo así los genes al lo largo de las costas de México. Quizá el modelo de flujo genético más aplicable sería uno de "saltos pequeños y saltos grandes", que permite mantener la diversidad genética local, a la vez que la exportación de semillas a poblaciones más lejanas genera una estructuración genética poco definida. La dispersión de semillas dependería principalmente de las condiciones meteorológicas locales y de las corrientes marinas. Los huracanes, por ejemplo, podrían ser eventos que dieran lugar a una dispersión a muy larga distancia.

Kinlan y Gaines (2003), después de haber analizado un gran número de estudios de aislamiento por distancia, sugirieron que la pendiente de la regresión de la F_{ST} contra la distancia geográfica lineal es un estimador de la distancia promedio de la dispersión a larga distancia de las larvas, huevos o semillas de las especies en cuestión. Para las poblaciones estudiadas, este estimador indica una dispersión promedio de 7.7 km (la pendiente fue de 1.15×10^{-4}). Jiménez Durán (2004) encontró que los frutos flotantes en la laguna de Puerto Morelos se movían a una velocidad promedio de 395 m h^{-1} , lo que implica que podrían dispersarse 9.5 km d^{-1} . Este dato coincide con los resultados arriba mencionados. Bajo condiciones de calma y tomando en cuenta las condiciones

hidrodinámicas de la laguna arrecifal, los frutos tendrían un potencial de desplazamiento de ~106 km en los diez días en los que se mantienen en flotación, un dato que también fue encontrado por Kaldy y Dunton (1999). Se han encontrado datos similares en *Zostera marina*, con una capacidad de dispersión de 5.3 km (Ruckelshaus 1996) y en *T. hemprichii* con un dispersión de 3.4 km y 73.5 km .

Flujo genético y corrientes marinas

Con base en los resultados genéticos se intentó determinar la dirección de la dispersión de los frutos de *T. testudinum*. Esto se realizó con los resultados de la asignación de individuos a las poblaciones que se llevó a cabo con el programa BayesAss v.1.3. Los resultados no permitieron realizar interpretaciones sobre la dirección del flujo genético. La mayoría de los individuos se asignaron a su propia población, y los inmigrantes podrían haber provenido de varias poblaciones y no solamente de una de las poblaciones vecinas. El análisis de BayesAss sólo detecta migraciones recientes, y si se comparan estos resultados con los valores de Nm arriba mencionados hay una gran diferencia, ya que la migración es alta entre las poblaciones (entre 1.5 y ∞ por generación). Esto podría significar que la baja estructuración y alta conectividad es el resultado de procesos que ocurren a lo largo de muchas generaciones y no de un proceso a corto plazo. Además, es importante tomar en cuenta que si la migración reciente es entre poblaciones muy similares, ésta podría no ser detectable por la similitud de frecuencias alélicas entre poblaciones.

Los resultados de los experimentos de dispersión de frutos *in situ* indican que la mayoría de la dispersión se lleva a cabo en las aguas costeras, que es la zona en donde crecen y se reproducen los pastos marinos. Si se combinan los datos de dispersión con los del tiempo de flotación de *T. testudinum* y con los resultados de dispersión superficial de las tarjetas de deriva de Merino Ibarra (1986), se esperaría que la dispersión local costera en el Caribe mexicano fuera en dirección opuesta a la que se observa a larga distancia (dispersión por las corrientes oceánicas principales). Esto se

CAPITULO 3. Evaluación de la estructura genética, conectividad y estructura clonal de poblaciones de *Thalassia testudinum* a lo largo de la costa de la península de Yucatán.

debe a que la dirección de las corrientes costeras en el Caribe mexicano es el resultado de contra-giros generados por la corriente de Yucatán (Merino Ibarra 1986, Figura 3.9). Por tratarse de tarjetas de deriva superficiales, los resultados de este estudio son comparables con los de dispersión de frutos de *T. testudinum*, ya que se encuentran a la misma altura en la columna de agua. En el mismo estudio se observa que la corriente del Golfo de México tiene una dirección hacia el oeste, se mueve paralela a la costa y no presenta contra-giros. Lamentablemente esto se determinó únicamente para la punta noreste de la Península de Yucatán. Los datos (no publicados) del Dr. Ismael Mariño Tapia (CINVESTAV) sobre las corrientes del Golfo de México a la altura de la población de Sisal (punta noroeste de Yucatán), indican que la corriente tiene una dirección principal hacia el oeste, por lo que en esta zona se esperaría un flujo genético en esa dirección.

Se sabe que los frutos pueden ser transportados hasta 10 días lo que sería el caso para ~2% de los frutos formados en la Laguna de Puerto Morelos (Jiménez Durán 2004), una muy pequeña fracción de estos frutos se transportaría a muy largas distancias, y se podría considerar como la dispersión extrema. La probabilidad que una semilla realmente se establezca es muy baja, pero para tener un efecto significativo en la homogenización de la diversidad genética, se necesitan únicamente unos cuantos migrantes que logren establecerse en las poblaciones receptoras (Kinlan y Gaines 2003; Slatkin 1987). Además, como se demostró en este

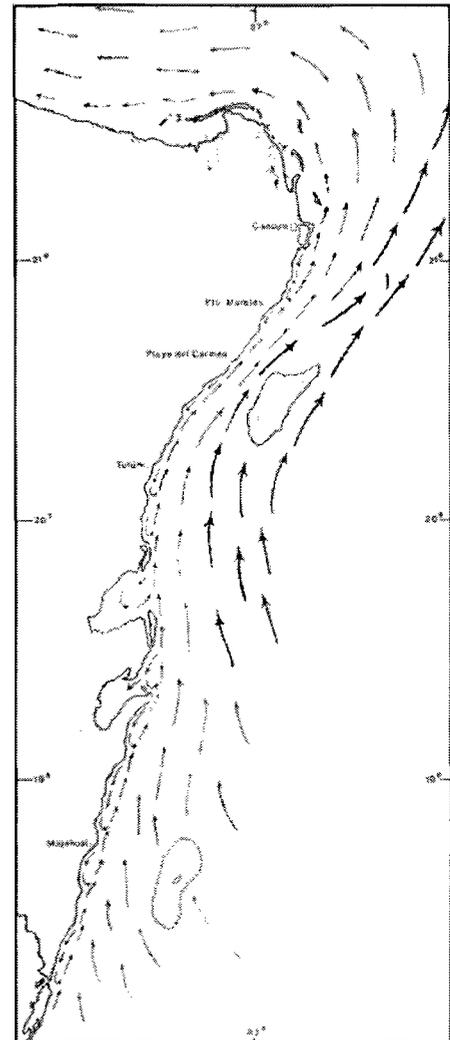


Figura 3.9 De Merino Ibarra (1986). Patrones de circulación costera superficial obtenida con el uso de tarjetas de deriva.

trabajo, los genets pueden tener cientos de años de edad, aumentando considerablemente la efectividad de la dispersión a larga distancia por individuo (o por generación). El estudio de Merino Ibarra (1986) respalda la posible dispersión extrema, pues encontró que el 12.3 % de sus tarjetas de deriva se recuperaron en la Península de Florida y 1% en la costa de Cuba.

Estructura genética

La estructura genética de *Thalassia testudinum* en las poblaciones de México fue determinada utilizando 2 métodos.

Primero, en el árbol NJ (Figura 3.6) se observa que los valores de "Bootstrap" generalmente fueron muy bajos, lo que indica que el árbol no fue muy estable, y que posiblemente hay un flujo génico significativo entre estas poblaciones. La configuración de las poblaciones en el árbol podría cambiar fácilmente si se repitiera el análisis. Se observó únicamente un agrupamiento de dos poblaciones con un valor de bootstrap mayor de 70%. Estas dos poblaciones son las dos poblaciones de Chabihau y Ría Lagartos ($F_{ST}=0.00$), son poblaciones vecinas a una distancia de 94 km y se podrían considerar como representantes de una misma población. La distancia entre estas poblaciones fue mucho menor que el tamaño de la unidad panmictica calculada de 350 km. Las dos poblaciones están en la Costa Norte de Yucatán e indica que hay una alta migración entre Ría Lagartos a Chabihau o viceversa. Aunque con un valor menor de bootstrap (~60%) se aprecian otros agrupamientos como: Laguna de Términos y Veracruz, Río Nizuc y Punta Sam y las islas de Alacranes. Además, se observa una separación ligera (52%) entre las poblaciones del Oeste de la Península de Yucatán (Celestún, Cd. del Sol, Laguna de Términos, y Veracruz) y las poblaciones del Norte de la Península de Yucatán y el Caribe. Es muy probable que con un aumento del número de genets por población el árbol se defina mejor.

El segundo método de estructuración fue por medio de un análisis de asignación Bayesiana de STRUCTURE y el método *ad hoc* de ΔK . Este análisis indica que las 16 poblaciones están agrupadas en tres unidades ($K=3$), y que de estas tres, el cluster 3 es el que se define mejor. Es un resultado muy similar al obtenido con el árbol NJ que integra las poblaciones del Golfo de México oeste. La estructuración con STRUCTURE no siempre fue muy estable, expresada por valores bajos de probabilidad de asignación a cada uno de los grupos (<0.5). Además, los clusters 1 y 2 (Caribe y Norte de la Península de Yucatán) están mixtos lo que geográficamente y oceanográficamente no tiene una explicación directa, y más bien indica que el programa no pudo definir bien la distribución de estas poblaciones, o que estos dos clusters realmente podrían ser uno.

Otro punto de vista, utilizado para el reclutamiento de especies marinas bénticas, es la hipótesis de "Gentic Sweepstakes" (Flowers *et al.* 2002; Hedgecock 1994). Esta postula que, para especies con un alto grado de producción de gametos, las larvas de unos pocos individuos logran establecerse, dominando, de manera sesgada, el importe genético a las poblaciones. Esto podría haber sido el caso para las poblaciones de Majahual y Alacranes, en donde en un evento de dispersión un gran número de frutos, originarios de Majahual o Cozumel, se establecieron en el Norte de Yucatán (Alacranes y Chabihau) generando de esta manera la extraña distribución de las poblaciones del cluster 2. Aunque es muy improbable que esta sea la explicación correcta, hay que tomarla en cuenta. La producción de frutos en *T. testudinum* es alta pero no tan masiva (en tiempo y cantidad) como en los invertebrados bénticos. La época de maduración de los frutos por lo menos toma dos meses y son liberados paulatinamente.

Una población que casi no se definió fue Cozumel, con valores de asignación de 0.353 (cluster 1), 0.364 (cluster 2), y 0.283 (cluster 3), esto indica que esta población está relacionada con los tres clusters, y podría ser la consecuencia de ser una población fuente, que dispersa genes a muy larga distancia, lo que se explicaría por ser una isla que está en medio de la Corriente de Yucatán.

La estructuración obtenida por ambos métodos coincide con los resultados encontrados de aislamiento por distancia. No hay poblaciones que realmente estén aisladas de las demás, y los resultados demuestran que hay una migración de genes entre todas las poblaciones. Esta migración evita que la deriva genética, o mutaciones, logren cambiar las frecuencias de los alelos dentro de las poblaciones o grupos de poblaciones.

Clonalidad

Los tamaños de los genets encontrados permiten estimar las edades. Si se considera que el crecimiento horizontal por medio de la extensión de los rizomas de *Thalassia testudinum* es de 19 - 35 cm año⁻¹ (Van Tussenbroek *et al.* 2006; Gallegos *et al.* 1993), la edad del genet más grande genotipificado fue de 323 - 595 años en la Laguna de Términos con un tamaño de 226 m. La edad se calculó tomando en cuenta un crecimiento lineal desde el centro del genet hacia ambos extremos. Este valor es una estimación muy conservadora, ya que la extensión del transecto de recolecta fue la limitante, y por ende se esperaba encontrar genets más antiguos en esta población. La estimación no es muy precisa, ya que es posible que el crecimiento horizontal de *T. testudinum* no sea igual en genets viejos que en genets jóvenes (Marbà y Duarte 1998), además el nivel de fragmentación de los genets puede tener una influencia sobre el crecimiento de los clones. Un mejor modelo de crecimiento para esta especie ayudaría estimar las edades de los genets con más precisión.

El uso de seis microsatélites para determinar la identidad única de cada genotipo es ligeramente bajo, y por esta razón se analizaron los genets más grandes con seis marcadores más, sumando un total de 12 loci. El aumento no generó una diferencia en el número de genets por población, o el número de ramets por genet, y se puede concluir que los seis microsatélites utilizados fueron lo suficientemente diversos para establecer la identidad genética, por lo menos en las poblaciones de México.

Los resultados acerca de la edad de los genets en general de *T. testudinum* son comparables con los encontrados en poblaciones de *Zostera marina* del Mar Báltico (Reusch *et al.* 1998). Además, la edad del clon más grande encontrado para esta especie, es comparable con la edad de 1000 años estimada para un parche monoclonal de 160 x 40 m de *Z. marina* (Reusch *et al.* 1999; Reusch *et al.* 1998), la que fue establecida igualmente con el uso de seis microsatélites. La gran diferencia entre el resultado de este trabajo, y el mencionado previamente, es que los genets grandes en las poblaciones de México no se encuentran aislados. Aunque haya pocos individuos dentro de unas poblaciones, como en Celestún (4 genets), los genets siempre fueron interrumpidos por otros. Esto indica que la estructura clonal de las poblaciones de *T. testudinum*, por lo menos en México, es mixta.

Una de las variables que determinan el nivel de clonalidad es la diversidad clonal R ($\# \text{ Genets} - 1 / \# \text{ Ramets} - 1$), y en los resultados de este estudio se observó que los valores más altos fueron encontrados en el Caribe Mexicano ($R = 0.40-0.80$), indicando una diversidad clonal mayor. Las poblaciones del Golfo de México resultaron más clonales, teniendo genets más grandes y menos individuos dentro de los transectos ($R = 0.09-0.69$). Se compararon los valores de R entre el Caribe mexicano (media $R=0.69$) y el Golfo de México (media $R=0.42$), utilizando una prueba T de Student, que demostró que son significativamente diferentes ($p=0.0034$, $t=3.53$). El tamaño promedio de los clones (más de 2 ramets por genet) fue generalmente más grande para el Golfo de México (2.8-9.0 m) que para el Caribe mexicano (2.4-3.3 m). El tamaño promedio del genet más grande de cada población en el Caribe fue de 15.3 m, que es un valor mucho menor que el promedio del Golfo de México con 61.4 m. Es importante mencionar que estos valores de clonalidad fueron un poco sagados, por integrar unos genets muy grandes. Esta misma tendencia, de más alta clonalidad en el Golfo de México, se observó en los valores promedio de número de ramets por genet más grande, con un promedio de 4.1 ramets por genet en el Caribe y 8.4 en el Golfo de México.

Interpretar las diferencias de clonalidad entre el Golfo de México y el Caribe es complicado.

Se podría argumentar que las poblaciones del Golfo de México son más estables que las del Caribe, lo que permitiría formar clones grandes. Los espacios necesarios para el establecimiento de nuevos genotipos casi nunca son generados, porque en el Golfo de México los disturbios son menos frecuentes o menos intensos. Es posible que en el Caribe, por tener regimenes de hidrodinámica más intensos, los disturbios sean más destructivos. Como consecuencia, las poblaciones resultarían ser más fragmentadas con un número mayor de clones pequeños. La diversidad genotípica es más alta en un espacio menor, lo que es causado por una generación de espacios pequeños en donde nuevos genotipos logran establecerse.

Por otro lado se puede argumentar, que en el Golfo de México, donde el fondo es blando, los huracanes pueden tener un impacto mucho mayor que en el Caribe. Las poblaciones del Golfo, especialmente las que están cerca de la costa (como la mayoría de las poblaciones recolectadas), son muy someras y el oleaje generado por las tormentas puede ser devastador, destruyendo los pastizales casi por completo. En el Caribe el tipo de fondo permite que los pastizales, anclados por medio de la gruesa rhizosfera, resistan mejor las corrientes fuertes generadas por el oleaje generado por estas tormentas. Se ha observado que durante los huracanes se remueven fragmentos del pastizal (conocidos como "blow outs"), pero el pastizal en sí queda íntegro en la mayoría de los casos (Van Tussenbroek *et al.* 2008). Esto permite que los genets ya establecidos dentro de los sistemas arrecifales persistan. *T. testudinum* requiere de condiciones específicas para establecerse, las cuales son generadas principalmente por el mismo pastizal, o más bien por la rhizosfera de éste. En áreas devastadas (que serian en este caso el Golfo de México) en donde ya no hay rhizosfera cercana, y en donde lo más factible es un ambiente anóxico dentro del sedimento, la recolonización por los pastos marinos es más lenta. En el caso remoto de que en la zona afectada, algunos individuos logren establecerse o unos pocos genets viejos no fuesen erradicados por completo, estos generarían el

ambiente adecuado para ser inicios de la proliferación. Por falta de competencia cercana, unos cuantos individuos serían capaces de recolonizar grandes áreas (efecto de fundador o "founder effect"), generando así una distribución de pocos genets en el área. Esto no necesariamente indica que en el Caribe no haya genets grandes, pero más bien que la diversidad genotípica sea mayor, y la probabilidad de muestrear el mismo genotipo sea mucho menor. Aún teniendo una diversidad genotípica menor, la diversidad genética del Golfo de México es similar a la del Caribe. Los valores de H_E , A , y R_i (Tabla 3.2) no demuestran grandes diferencias entre las poblaciones de Caribe y el Golfo de México.

Conclusión

En general se puede concluir que las poblaciones alrededor de la Península de Yucatán tienen una elevada conectividad, con una baja estructuración genética ($F_{ST}=0.098$ $p<0.000$, AMOVA). Además, no existen barreras que aislen poblaciones de las demás generando una deriva genética local. El flujo genético, o la migración por medio de la dispersión de los frutos de *Thalassia testudinum*, se lleva a cabo principalmente por medio de procesos oceánicos costeros, siguiendo un modelo de dispersión genética aquí descrito como "saltos pequeños y saltos grandes". La probabilidad de una reproducción sexual exitosa, con el establecimiento de un juvenil es sumamente baja, lo que es consecuencia de las condiciones específicas necesarias para poderse establecer. Además, es una planta con una propagación vegetativa por excelencia, lo que disminuye las posibilidades del establecimiento de las semillas dentro de los pastizales, por tener una menor competitividad con las plantas ya establecidas. Pero, si se considera que un genotipo puede sobrevivir cientos a miles de años, el tener una reproducción exitosa una vez a los 50 o a los 100 años se podría considerar como un éxito reproductivo considerable. El dogma de que la reproducción sexual de los pastos marinos no es importante parece ser equivocado, y más bien los resultados de este trabajo

CAPITULO 3. Evaluación de la estructura genética, conectividad y estructura clonal de poblaciones de *Thalassia testudinum* a lo largo de la costa de la península de Yucatán.

sugieren que la reproducción sexual es substancial y conduce a los niveles de conectividad registrados. El ser una especie tan longeva, con un reclutamiento muy lento, tiene como consecuencia que la especie sea vulnerable a los cambios ambientales rápidos, lo que dependería de la resiliencia y la capacidad de adaptación de individuos de esta especie en el campo. Estos son factores que es necesario evaluarlos, ya que el desarrollo costero, en zonas como la Riviera Maya, es exponencial causando daños como eutroficación, dragado de marinas para los hoteles, anclaje etc. *Thalassia testudinum* se ha mantenido a pesar de las presiones antropomórficas, pero es importante evaluar su plasticidad fenotípica, y determinar las limitaciones de su aclimatización a las nuevas condiciones ambientales. De esta manera se podría pronosticar y si es posible, evitar pérdidas de pastizales de *T. testudinum* en el futuro.

CAPITULO 4

ESTRUCTURA GENÉTICA Y CONECTIVIDAD DE LAS POBLACIONES DE *THALASSIA TESTUDINUM* EN SU ÁREA DE DISTRIBUCIÓN.

Introducción

El área de distribución del pasto marino *Thalassia testudinum* (Figura 4.2) comprende el Gran Caribe, el Golfo de México y las islas de Bermuda (Creed *et al.* 2003). El Gran Caribe, integra las islas y las costas del Mar Caribe, las Guyanas, las Bahamas y la costa oriental de Florida, en el Atlántico. El Golfo de México inicia en el extremo occidente de la Península de Yucatán (Cabo Catoche), en donde colinda con el Caribe, y limita con el Océano Atlántico en el extremo sureste de la península de Florida, integrando a los Cayos de Florida y a la costa noroeste de Cuba (Onuf *et al.* 2003). Una de las poblaciones más aisladas de *T. testudinum* es la de las islas de Bermuda. El clima en estas islas es sub-tropical y la temperatura del agua se mantiene dentro del intervalo de tolerancia de la especie debido a la influencia de la Corriente del Golfo (UNESCO 1998).

Existen varios estudios de genética poblacional para esta especie que han buscado determinar su diversidad y estructuración genética a una escala local (Larkin *et al.* 2006; Davis *et al.* 1999; Schlueter y Guttman 1998; Kirsten *et al.* 1998, Tabla 1.1 Capítulo 1). Hasta el momento, sólo existe un estudio genético que abarca una escala geográfica, cubriendo gran parte del área de distribución de *T. testudinum*. El trabajo realizado por Waycott y Barnes (2001) es hasta cierto punto limitado, ya que usaron AFLPs (seis pares de primers, 260 bandas, de las cuales 29 fueron polimórficas) y compararon únicamente poblaciones de dos países (Panamá y Bermuda). Estos autores encontraron que la variación genética entre ambas localidades era muy similar, y que la diferenciación genética

CAPITULO 4. Estructura genética y conectividad de las poblaciones de *Thalassia testudinum* en su área de distribución.

entre las localidades era muy baja (F_{ST} entre 0.03 y 0.07). Algo sorprendente en este estudio fue que encontraron dos muestras con el mismo genotipo, una en Panamá y la otra en Bermuda, por lo que los autores concluyeron que correspondían a un mismo genet. En los demás estudios genéticos de *T. testudinum*, realizados a escalas geográficas menores, la diversidad genética ha resultado ser relativamente alta a escala local, pero a mayores escalas las poblaciones mostraron una gran similitud genética (Larkin *et al.* 2006; Davis *et al.* 1999; Schlueter *et al.* 1998; Kirsten *et al.* 1998).

Existen pocos estudios que hayan intentado determinar la estructura y la diversidad genética cubriendo toda el área de distribución de una especie de pasto marino. Entre ellos destacan el de Waycott *et al.* (1997) para *Posidonia australis* en el sur de Australia (máx. distancia entre poblaciones =5300 km), el de Procaccini *et al.* (2000) para *Posidonia oceanica* en el Mediterráneo (máx. distancia entre poblaciones =3500 km), el de Coyer *et al.* (2004) para *Zostera noltii* en las costas de Europa (máx. distancia entre poblaciones =8000 km) y el de Olsen *et al.* (2004) para *Z. marina* en el Atlántico y Pacífico norte (máx. distancia entre poblaciones =10,000 km). Con excepción del estudio de *P. australis* (Waycott *et al.* 1997, que usaron alozimas), los demás trabajos se basaron en el uso de microsatélites. Uno de los resultados más sobresalientes del trabajo de *P. australis* fue que en el centro su área de distribución, la diversidad genética era mayor y había una tendencia hacia la homocigocidad en los extremos (Waycott *et al.* 1997), lo que también se observó en *Z. noltii* (Coyer *et al.* 2004).

La especie de pasto marino más estudiada hasta el momento, en cuanto a la genética poblacional, es *Z. marina*, que se distribuye a lo largo de las costas templadas del hemisferio norte. Olsen *et al.* (2004) encontraron una clara separación entre las poblaciones del Pacífico oriental (costa occidental de los E.U.A.) y el Atlántico (costa oriental de los E.U.A. y costas occidentales de Europa). Estos resultados se obtuvieron con base en los genotipos derivados de nueve microsatélites, las secuencias nucleares de los intrones del ITS-1, ITS-2, y del gen del cloroplasto *matK*. Además,

CAPITULO 4. Estructura genética y conectividad de las poblaciones de *Thalassia testudinum* en su área de distribución.

encontraron que la conectividad de las poblaciones en las diferentes regiones europeas era alta, y que las diferencias entre las regiones se debían a principalmente la geografía (es la especie con la distribución más amplia y se encuentra en muchos mares, de los cuales varios están aislados, un ejemplo, el Mar Negro) e hidrodinámica local (Olsen *et al.* 2004).

En el presente trabajo se pretende describir, por primera vez, la diversidad y estructuración genética de *Thalassia testudinum* en toda su área de distribución geográfica. El estudio se realizó utilizando un total de 20 poblaciones localizadas en el Gran Caribe, Golfo de México y Bermuda. Este trabajo se puede considerar como preliminar, ya que en el futuro se pretende aumentar el número de poblaciones a analizar. Actualmente se está colaborando con laboratorios de varias instituciones (Universidad de Virginia, Charlottesville, E.U.A., con el M. en C. Eric Bricker y el Dr. Joseph C. Zieman;), y la Universidad James Cook, Townsville, Australia, con la Dra. Michelle Waycott), con el fin de estandarizar los protocolos de los microsatélites diseñados y de esta manera poder construir una base de datos más completa y detallada.

Métodos

Área de estudio

El clima de la zona de estudio se puede considerar como tropical en la parte sur y media y subtropical en la parte norte. El área de distribución de *T. testudinum* se encuentra en una zona de impacto de huracanes. La época oficial de vigilancia para estos eventos meteorológicos es del 1º de junio hasta el 30 de noviembre de cada año. Los huracanes se generan por las altas temperaturas y la evaporación del Océano Atlántico tropical, Caribe y Golfo de México, e inician su existencia como una tormenta tropical (UNESCO 1998; Merino Ibarra *et al.* 1991; NOAA). El Mar Caribe es un sistema semi-cerrado, y el agua del Atlántico se filtra por la barrera de las islas colindantes. La

principal corriente se denomina Corriente del Caribe y es una corriente poderosa de agua cálida que se mueve en dirección occidental (Gyory *et al.* 2005b; Molinari *et al.* 1981). Ésta atraviesa el centro del Mar Caribe, formando varios giros de dirección ciclónica y anticiclónica. A lo largo de las costas de Venezuela, Colombia y las Antillas Menores las corrientes pueden ser fuertes (70 cm s^{-1}), pero en el centro del Caribe esta corriente se vuelve más débil, debido a que la mayoría de la masa de agua es forzada a través de un sumidero frente a las costas de Jamaica (formando la corriente de Jamaica, Gyory *et al.* 2005a). Cuando la corriente llega a las costas de México, se convierte en la Corriente de Yucatán, acelerándose en el estrecho entre

la Península de Yucatán y Cuba (Fratantoni 2005). Después de cruzar el estrecho, forma una intrusión que entra al Golfo de México, que se conoce como la Corriente del Lazo. El tamaño de esta intrusión es variable, y cuando es muy grande se puede desprender y formar giros anticiclónicos que se mueven en dirección occidental dentro del Golfo (Gyory *et al.* 2005a). Finalmente, la corriente pasa por Florida (Corriente de Florida) y se integra a la Corriente del Golfo que transporta aguas cálidas hacia Bermuda, terminando en las costas occidentales de Europa.

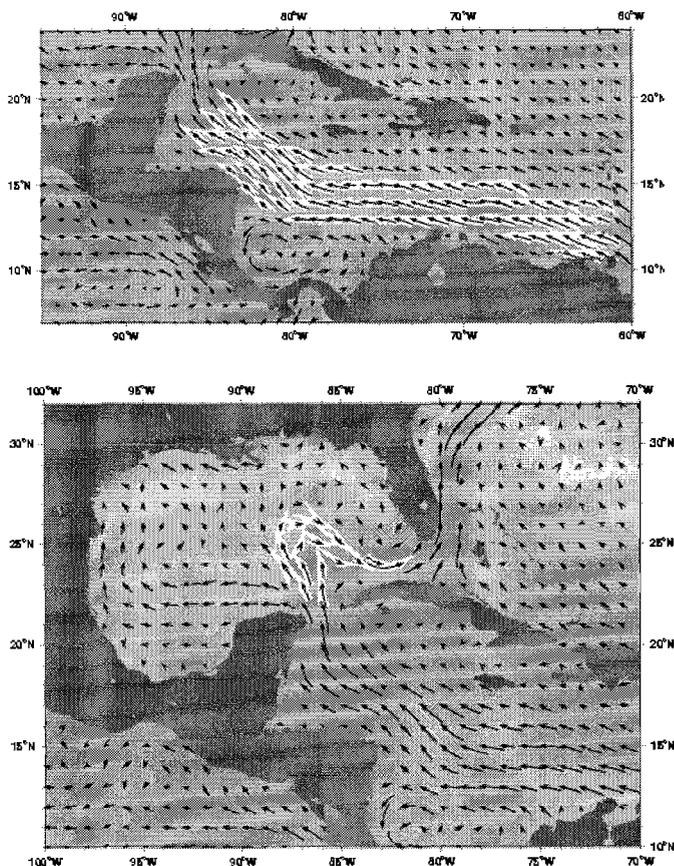


Figura 4.1 a&b a. Esquema general de las corrientes principales del Caribe central. b. Esquema de las corrientes del Caribe Occidental y el Golfo de México. Las flechas indican la dirección y la intensidad promedio de la corriente en la zona. Las flechas en blanco representan en a. La Corriente del Caribe y en b. La Corriente del Lazo que puede variar en tamaño (Figura de Gyory *et al.* 2005 a&b).

CAPITULO 4. Estructura genética y conectividad de las poblaciones de *Thalassia testudinum* en su área de distribución.

Las poblaciones estudiadas de *Thalassia testudinum* serán seleccionadas de tal manera, que cubrieran más o menos homogéneamente el área total de distribución de la especie (Figura 4.2), que abarca ~ 1,165,000 km² (Green y Short 2003). La distancia máxima del extremo sureste al noroeste de esta área de distribución es ~ 4300 km, con un ancho total de ~ 3100 km, extendiéndose de Costa Rica a Bermuda. Desgraciadamente, no fue posible coleccionar en áreas como las Bahamas, la frontera norte de la distribución de la especie en Florida, o el norte de el Golfo de México, debido principalmente a la falta de contactos o la ausencia de respuesta de los contactos en estas áreas.

Genética poblacional

Sitios de colecta

Se coleccionaron un total de 37 poblaciones, incluyendo las 16 poblaciones nacionales utilizadas en el Capitulo 3 (Ver Anexo 3). Sólo se genotificaron 14 de las 21 poblaciones internacionales. Los sitios que se utilizaron en este estudio se ilustran en la Figura 4.2, y se describen con sus respectivas coordenadas en la Tabla 4.1. Las distancias entre pares de poblaciones variaron entre 150 km y 4249 km. Las muestras de las poblaciones fuera de México, fueron coleccionadas por colegas, la mayoría de ellos participantes del proyecto CARICOMP (Caribbean Coastal Marine Productivity), de la UNESCO, con excepción de las poblaciones de Cuba, cuya colecta se realizó durante un viaje de trabajo organizado por el laboratorio de Botánica Marina de la Unidad Académica Puerto Morelos. A los voluntarios del proyecto CARICOMP se les envió un paquete de colecta que consistía de 35 tubos con gel de sílice con indicador de humedad, un esquema de colecta para apuntar detalles del sitio, una cuerda con plomos y flotador para determinar la distancia entre

CAPITULO 4. Estructura genética y conectividad de las poblaciones de *Thalassia testudinum* en su área de distribución.

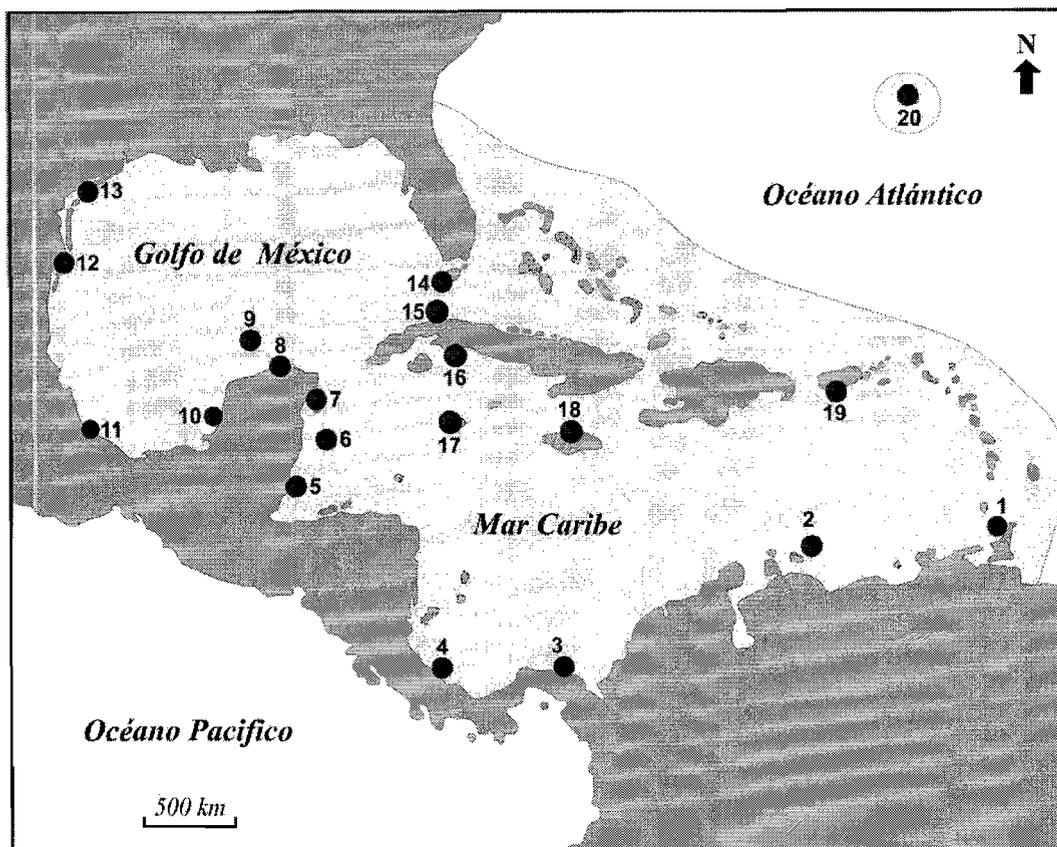


Figura 4.2 Las poblaciones de *Thalassia testudinum* utilizadas para el estudio de conectividad y estructuración genética en su área de distribución. Las poblaciones de México (6 -11) consisten de 36 muestras y las demás de 30 (1-5 y 12-20). El área gris indica la distribución geográfica de la especie.

Tabla 4.1. Los sitios de colecta de *Thalassia testudinum* para el estudio internacional en toda el área de su distribución, con sus coordenadas correspondientes. Las coordenadas de Belice no fueron tomadas con un GPS pero fueron calculadas posteriormente por medio de fotos satelitales y el programa ARCVIEW. La distancia entre los 2 puntos más extremos de colecta fue anotada como la extensión, - no fue enviada la información.

Sitio de colecta	Coordenadas	Extensión	Sitio de colecta	Coordenadas	Extensión
1 Tobago	N 11°08' W 060°50'	-	11 MX Veracruz	N 19°09'01" W 096°05'33"	227 m
2 Curazao	N 12°04'24" W 068°51'11"	-	12 EUA Low Laguna Madre	N 26°10'30" W 097°12'59"	1390 m
3 Panamá	N 09°23' 55" W 079°52'01"	306 m	13 EUA Red Fish Bay	N 27°54' 48" W 097°07'14"	677 m
4 Costa Rica	N 09°44' 48" W 082°48'34"	-	14 EUA Craig Key	N 24°50'00" W 080°45'39"	946 m
5 Belice	N 16°49'44" W 088°06'29"	-	15 Cuba Rincón de Guanabo	N 23°10'29" W 082°06'19"	816 m
6 MX Chinchorro	N 18°34'32" W 087°19'09"	227 m	16 Cuba Rancho Luna	N 22°02'03" W 080°25'03"	812 m
7 MX Puerto Morelos	N 20°5'03" W 086°52'02"	227 m	17 Jamaica	N 18°27' W 077°24'	-
8 MX Chahihau	N 21°21'32" W 089°06'03"	227 m	18 Caimán	N 19°21'20" W 081°18'25"	154
9 MX Alacranes Isla Pérez	N 22°23'02" W 089°40'53"	227 m	19 Puerto Rico	N 17°56'09" W 067°02'59"	-
10 MX Ciudad del Sol	N 19°26'47" W 090°42'35"	227 m	20 Bermuda	N 32°20' W 064°43'	750 m

CAPITULO 4. Estructura genética y conectividad de las poblaciones de *Thalassia testudinum* en su área de distribución.

muestras, y un manual de colecta y procesamiento de las muestras (Anexo 4). El esquema de colecta fue diferente al que se utilizó para el estudio nacional (Capítulo 3). Este consistió de dos grupos de 15 muestras, con una distancia de 500 a 2000 m entre ellos. La distancia entre los ramets de cada grupo fue de 2 m (establecida con una cuerda), cubriendo un total de 28 m por grupo (Fig. 4.3). Todos los sitios, con excepción del de Belice, fueron georeferenciados con un posicionador. Las coordenadas de la población de Belice se estimaron por medio del programa de Google Earth®.

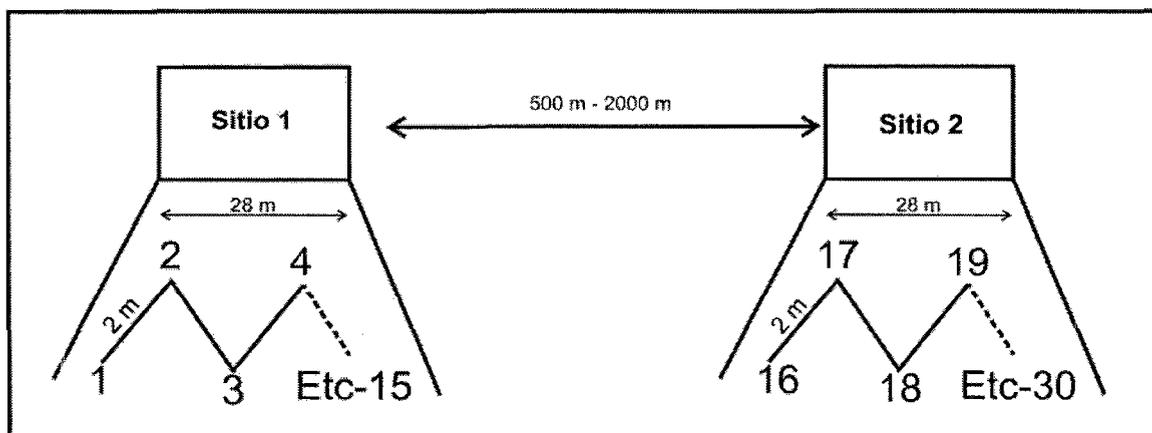


Figura 4.3 Esquema de muestreo de las poblaciones internacionales de *Thalassia testudinum*.

Considerando que se utilizaron dos esquemas distintos de colecta, se verificó con una prueba de “t de Student” si la diversidad clonal era similar entre ellos, para asegurarnos que esta medida no dependiera del método de colecta. Se calcularon los valores de diversidad clonal (o diversidad genotípica, R) de un fragmento de tamaño similar cada uno de los dos tipos de transecto. Para las poblaciones de México, se utilizaron los primeros 11 ramets (de los 36 colectados) que cubrían una distancia de 34 m, y para las muestras internacionales se utilizaron las primeras 15 muestras de los transectos, cubriendo una distancia de 28 m.

CAPITULO 4. Estructura genética y conectividad de las poblaciones de *Thalassia testudinum* en su área de distribución.

Extracción de ADN, amplificación y separación de fragmentos

Las muestras de las vainas secas se molieron con un Mini-BeadBeaterTM (Biospec Products, E.U.A.), y el ADN se extrajo utilizando el sistema comercial de extracción DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Alemania). El ADN se diluyó a una concentración de 10-20 ng μl^{-1} . Se utilizaron los mismos seis microsatélites descritos en el Capítulo 3 (TTMS-GA6, TTMS-GA8, TTMS-TGA39, TTMS-TCT58, TTMS-GGT59, y TTMS-GT112). Los procesos de amplificación, separación y tinción de fragmentos de ADN fueron idénticos a los descritos en el Capítulo 3.

Análisis de los datos

Los análisis del presente estudio fueron similares a los señalados en el Capítulo 3, salvo algunas modificaciones. A continuación se hace un resumen indicando algunos casos en los que se utilizaron diferentes variables.

Los genets y los ramets se identificaron con el programa GenClone v1.0 (Arnaud-Haond y Belkhir 2007). Las probabilidades de identidad genotípica (p_{gen}) de cada genet de cada población se calcularon con la misma ecuación utilizada en el Capítulo 3. Además, se determinó el valor de la diversidad clonal, R calcula como $(n-1)/(N-1)$, siendo n el número de genets y N el número de ramets. De los genets identificados, se seleccionó una muestra de cada genotipo para ser utilizado en los análisis de diversidad y estructuración genética.

Se colectó un total de 630 ramets internacionales (21 poblaciones), los cuales se almacenaron en sílica-gel. De éstos se utilizaron 415 ramets (14 poblaciones). Se perdieron 11 ramets de la población Bermuda 2 (población no utilizada), y se perdió 1 ramet de cada una de las siguientes poblaciones: Puerto Rico, Costa Rica, Cuba-Rincón de Guanabo y Jamaica. Esto se debe a la

pérdida de la muestras durante el traslado, o a la pérdida del pellet en el proceso de la extracción del ADN.

Los ramets y los genets de las seis poblaciones mexicanas (208 ramets) se tomaron del estudio descrito en el Capítulo 3. En total, se identificaron 611 ramets, con un total de 341 genotipos únicos para las 20 poblaciones seleccionadas. En ninguna ocasión se registró un mismo genotipo en las distintas poblaciones.

Se utilizó el programa ARLEQUIN v3.1 (Excoffier *et al.* 2005) para calcular las frecuencias alélicas, la heterocigosidad observada (H_O), la heterocigosidad esperada (H_E), el número promedio de alelos por locus o diversidad alélica (A) y el análisis de varianza molecular o AMOVA (con 1000 permutaciones). El índice de endogamia, por población, F_{IS} con sus niveles de significancia se calculó con FSTAT v2.9.3.2 (Goudet 1995; Goudet 2002); el valor de significancia se ajustó por medio de una corrección de Bonferroni (Rice, 1989). La presencia de un exceso o déficit significativo de heterocigotos se determinó con Genepop v3.4 (Raymond y Rousset 1995), con el método de Guo y Thompson (1992). La riqueza alélica, R_s , se determinó con el programa HP-RARE (Kalinowski 2005), con 15 genets por población. Las poblaciones de Panamá (9), Jamaica (9) y Bermuda (3), no alcanzaron el mínimo de 15 genets, por lo que fueron excluidas de este análisis.

Estructura poblacional

La estructuración genética de las poblaciones se determinó por medio de un árbol NJ utilizando las frecuencias alélicas. El árbol se elaboró con el programa DISPAN (Ota 1993), utilizando la distancia genética corregida de Nei, D_A (Nei *et al.* 1983; Takezaki y Nei 1996). El número de iteraciones para establecer los valores de estabilidad de las ramificaciones (valores "bootstrap"), se estableció en 10,000. Además del árbol NJ, se aplicó un análisis Bayesiano para determinar la existencia de agrupamientos panmícticos con el programa STRUCTURE v2.1 (Pritchard *et al.* 2000). Este análisis

CAPITULO 4. Estructura genética y conectividad de las poblaciones de *Thalassia testudinum* en su área de distribución.

se aplicó utilizando un modelo de alelos infinitos, con las frecuencias de los alelos correlacionados entre las poblaciones, asumiendo una alta migración o un ancestro común. También se corroboró el valor de K (número de unidades panmícticas), por medio del cálculo de ΔK , un método *ad hoc* descrito por Evanno *et al.* (2005), realizando 20 análisis independientes por valor de K (burn-in de 10,000 y corrida de 100,000).

Se aplicó una Prueba de Mantel para determinar el nivel de aislamiento por distancia entre las poblaciones internacionales. Las distancias geográficas entre las poblaciones se estimaron usando los mismos programas y mapas que los detallados en el Capítulo 3, tomando la distancia más corta posible sobre el agua y sin tomar en cuenta las corrientes oceánicas dominantes. La regresión se calculó con el programa IBD 1.52 (Bohonak 2002), aplicando 10,000 muestreos aleatorios.

Resultados

Variación genética

La prueba de "t de Student" que se realizó para comparar los dos tipos de muestro utilizados en este estudio, demostró que no hubo una diferencia significativa ($t= 0.734$, $p= 0.47$) entre la diversidad clonal de los dos transectos de distancia similar en las poblaciones mexicanas e internacionales.. Esto indica que el número de genets colectados en los dos tipos de transectos fue similar, lo que justifica que se puedan analizar de manera conjunta las poblaciones de México y las internacionales.

El alto índice de clonalidad disminuyó significativamente los tamaños de algunas poblaciones. Las poblaciones con más genets fueron Cuba - Rincón de Guanabo y Puerto Morelos, con un total de 28 (Tabla 4.2), mientras que la población con menos genets fue la de Bermuda, con tres. Las probabilidades de la identidad genotípica, p_{gen} , de cada genotipo variaron de 0.253 en Bermuda, a 1.12×10^{-11} en Curazao (Tabla 4.2). Esto significa, en el caso de Bermuda, que con los

CAPITULO 4. Estructura genética y conectividad de las poblaciones de *Thalassia testudinum* en su área de distribución.

alelos presentes en las frecuencias encontradas en esta población, la probabilidad de que este genotipo se presente es del 25.3%, la cual es muy alta y no resulta confiable para fines de identificación de genotipos únicos.

El número total de alelos para las 20 poblaciones fue de 63, utilizando los seis microsatélites polimórficos. La diversidad alélica A varió entre 6.2 en MX-Chinchorro y 1.8 en Bermuda. Los valores de riqueza alélicas, R_t , después de ajustar las poblaciones a 15 genets cada una, variaron entre 2.0, en EUA-Lower Laguna Madre, y 5.7, en MX-Chinchorro. Los valores de diversidad genética de Nei (H_E) variaron entre 0.234 en EUA-Lower Laguna Madre y 0.742 en Cuba Rincón de Guanabo, con una heterocigosidad observada (H_O) de 0.213 en EUA-Lower Laguna Madre y 0.792 en MX-Chabihau. Dos poblaciones exhibieron una desviación significativa del equilibrio del Hardy-

Tabla 4.2 Características de las propiedades genéticas básicas de las poblaciones de *Thalassia testudinum* en el Gran Caribe y el Golfo de México. (N) número de ramets, (n) número de genets, (H_E) Heterocigosidad esperada con su desviación estandar (de) y (H_O) Heterocigosidad observada, F_{IS} índice de endogamia, (A) número promedio de alelos por locus, (R_t) riqueza alélica calculada después de una rarefacción a 15 genets, (R) diversidad clonal $(n-1)/(N-1)$, y ($P_{gen\ max}$) la probabilidad de la identidad genotípica más alta de la población. (*) desviación significativa del equilibrio de Hardy-Weinberg después de una corrección de Bonferroni (Rice 1989), (-) no determinado por no tener suficientes genotipos únicos (MX) México. (EUA) Estados Unidos de América.

Población	N	n	H_E (de)	H_O	F_{IS}	A	R_t	R	$P_{gen\ max}$
1. Tobago	30	15	0.604 (0.102)	0.644	-0.069	3.3	3.3	0.48	$2.54 \cdot 10^{-5}$
2. Curazao	30	13	0.604 (0.215)	0.603	0.004	4.3	-	0.41	$1.71 \cdot 10^{-4}$
3. Panamá	30	10	0.674 (0.148)	0.667	0.014	4.5	-	0.31	$1.59 \cdot 10^{-5}$
4. Costa Rica	29	17	0.665 (0.129)	0.647	0.028	4.8	4.7	0.57	$1.50 \cdot 10^{-4}$
5. Belice	30	12	0.661 (0.133)	0.625	0.056	4.8	-	0.38	$3.08 \cdot 10^{-4}$
6. MX Chinchorro	36	26	0.725 (0.140)	0.724	0.001	6.2	5.7	0.71	$9.93 \cdot 10^{-6}$
7. MX Puerto Morelos	35	28	0.549 (0.221)	0.506	0.080*	5.8	5.1	0.79	$1.89 \cdot 10^{-3}$
8. MX Chabihau	36	16	0.697 (0.098)	0.792	-0.141*	5.3	5.3	0.43	$9.91 \cdot 10^{-5}$
9. MX Alacranes Isla Pérez	36	25	0.582 (0.090)	0.613	-0.055	4.0	3.7	0.67	$1.21 \cdot 10^{-3}$
10. MX Ciudad del Sol	35	17	0.638 (0.224)	0.637	0.002	5.2	5.0	0.47	$7.21 \cdot 10^{-5}$
11. MX Veracruz	36	19	0.602 (0.109)	0.614	-0.021	4.7	4.5	0.51	$5.04 \cdot 10^{-4}$
12. EUA Low. Laguna Madre	30	18	0.234 (0.284)	0.213	0.092	2.0	2.0	0.59	0.138
13. EUA Red Fish Bay	30	23	0.344 (0.259)	0.341	0.011	3.2	3.0	0.76	$2.95 \cdot 10^{-2}$
14. EUA Craig Key	29	21	0.658 (0.164)	0.651	0.013	5.5	5.3	0.71	$6.61 \cdot 10^{-5}$
15. Cuba Rincón de Guanabo	30	28	0.742 (0.085)	0.738	0.005	5.5	5.1	0.93	$1.47 \cdot 10^{-5}$
16. Cuba Rancho Luna	30	13	0.630 (0.131)	0.590	0.066	4.5	-	0.41	$1.33 \cdot 10^{-3}$
17. Jamaica	29	9	0.650 (0.194)	0.611	0.064	4.5	-	0.29	$5.88 \cdot 10^{-4}$
18. Caimán	30	12	0.677 (0.125)	0.681	-0.006	5.3	-	0.38	$1.83 \cdot 10^{-4}$
19. Puerto Rico	30	16	0.596 (0.209)	0.615	-0.031	4.7	4.6	0.52	$1.19 \cdot 10^{-4}$
20. Bermuda	29	3	0.411 (0.304)	0.444	-0.103	1.8	-	0.07	0.253

CAPITULO 4. Estructura genética y conectividad de las poblaciones de *Thalassia testudinum* en su área de distribución.

Weinberg; éstas fueron MX-Puerto Morelos, con un déficit, y MX-Chabihau con un exceso de heterocigotos. El análisis de la varianza molecular (AMOVA) mostró una variabilidad genotípica inter-poblacional de 19.37% e intra-poblacional de 80.63%. El índice de fijación genética global (F_{ST}) para todas las poblaciones fue de 0.194 ($p < 0.000$), indicando un nivel de estructuración genética de bajo a moderado para el área geográfica que cubre este estudio, pero comparable con los resultados encontrados en otras especies de pastos marinos en sus áreas de distribución geográfica (Tabla 1.1, Capítulo 1).

Estructura genética y conectividad

Se encontró una relación significativa entre la distancia genética y la distancia geográfica (esta última transformada a logaritmo, Prueba de Mantel, $p < 0.023$, Figura 4.4). Los valores de diferenciación genética entre pares de poblaciones (F_{ST}) variaron entre 0.044 (entre MX-Chabihau y Cuba-Rincón de Guanabo) y 0.489 (entre Cuba-Rancho Luna y EUA-Lower Laguna Madre, Tabla 4.3). Las distancias geográficas entre las poblaciones geográficas variaron entre 150 km, entre MX-Alacranes Isla Pérez y MX-Chabihau, y 4249 km, entre EUA-Redfish Bay y Tobago. Los valores de F_{ST} entre pares de poblaciones y su distancia geográfica se encuentran en la Tabla 4.3, en donde se observa que los valores más grandes de diferenciación corresponden a los pares de poblaciones más lejanas: Bermuda, EUA Lower Laguna Madre y EUA Redfish Bay. Se observó que si la regresión se realizaba excluyendo a estas poblaciones, no se encontraba una relación significativa entre distancia geográfica y genética.

Tabla 4.3 Valores de la diferenciación genética entre pares de poblaciones F_{ST} (estimado por θ (Weir y Cockerham 1984)) con su distancia geográfica lineal, ésta fue calculada por medio de puntos GPS y la distancia más corta posible sobre el mar, ver M y M Capítulo 3. Todos los valores fueron significativos ($p < 0.05$).

Sitios de colecta	1. Tobago	2. Curazao	3. Panamá	4. Costa Rica	5. Belice	6. MX Chin	7. MX Pto Mor	8. MX Chah	9. MX Al I Per	10. MX Cd Sol	11. MX Ver	12. EUA LL Madre	13. EUA Redfish	14. EUA C Key	15. Cuba R Gua	16. Cuba R Lu	17. Jamaica	18. Caimán	19. Pto Rico	20. Bermuda
1. Tobago	-	883	2204	2483	3012	2962	2981	3250	3313	3642	4035	4176	4249	3428	3233	2442	1967	2382	1008	2387
2. Curazao	0.1003	-	1287	1575	2143	2108	2156	2434	2496	2777	3207	3360	3431	2605	2420	1662	1180	1566	704	2295
3. Panamá	0.1312	0.1209	-	325	1389	1371	1489	1894	1948	2224	2666	2799	2867	2073	1928	1399	1127	1139	1680	2970
4. Costa Rica	0.1768	0.2007	0.1288	-	1225	1229	1393	1699	1765	2029	2472	2630	2711	1974	1789	1384	1189	1098	1931	3120
5. Belice	0.1391	0.1068	0.1124	0.1340	-	211	466	795	861	1129	1569	1731	1808	1191	1009	992	1159	776	2245	2968
6. MX Chinchorro	0.1041	0.1360	0.0693	0.1055	0.0768	-	258	580	648	900	1356	1522	1602	982	800	817	1054	641	2158	2750
7. MX Pto Morelos	0.1808	0.2220	0.1764	0.2286	0.1831	0.0882	-	322	410	642	1096	1271	1343	764	568	690	1033	606	2137	2532
8. MX Chahihau	0.1144	0.1476	0.1252	0.1323	0.0934	0.0521	0.1549	-	150	321	776	987	1089	936	751	940	1294	869	2396	2704
9. MX Al. Isla Pérez	0.1785	0.1874	0.1496	0.1535	0.1586	0.1034	0.2201	0.1152	-	346	761	876	969	950	791	1000	1359	949	2460	2721
10. MX Ciudad del Sol	0.1612	0.1702	0.1051	0.1573	0.0850	0.0774	0.1345	0.1487	0.2057	-	570	1002	1143	1259	1124	1274	1627	1202	2722	3048
11. MX Veracruz	0.2313	0.1808	0.1728	0.1556	0.1360	0.1504	0.2559	0.1126	0.1597	0.1627	-	789	979	1702	1526	1710	2068	1640	3176	3471
12. EUA Lo Lag Madre	0.4614	0.3987	0.4135	0.4458	0.3803	0.3777	0.4702	0.3831	0.4665	0.3787	0.3358	-	224	1686	1571	1855	2214	1803	3313	3455
13. EUA Redfish	0.3891	0.3304	0.3217	0.3756	0.3130	0.3170	0.4319	0.3170	0.3967	0.3190	0.2699	0.0738	-	1697	1599	1920	2282	1870	3377	3471
14. EUA Craig Key	0.1367	0.1311	0.1011	0.1633	0.0950	0.0874	0.1727	0.0963	0.1816	0.0789	0.1118	0.2457	0.1626	-	228	1062	1443	1022	2537	1766
15. Cuba R Guanabo	0.1091	0.1520	0.0750	0.1034	0.0956	0.0454	0.1392	0.0441	0.1358	0.1063	0.1336	0.3463	0.2789	0.0599	-	939	1251	825	2365	1982
16. Cuba R Luna	0.2086	0.2644	0.1699	0.2128	0.2134	0.1551	0.2868	0.1480	0.2608	0.2151	0.2217	0.4892	0.4007	0.1699	0.0623	-	509	311	1586	2900
17. Jamaica	0.1015	0.0872	0.0652	0.1240	0.0709	0.1061	0.1898	0.1106	0.1454	0.1093	0.1372	0.4007	0.3106	0.0926	0.0940	0.1871	-	433	1124	2048
18. Caimán	0.0999	0.1503	0.1413	0.1515	0.1028	0.0717	0.1732	0.0611	0.2056	0.1225	0.2094	0.4437	0.3695	0.1021	0.0753	0.1833	0.1124	-	1540	2430
19. Pto Rico	0.1940	0.1844	0.1552	0.2004	0.1577	0.1330	0.2341	0.1726	0.2223	0.1455	0.2614	0.3738	0.3071	0.1263	0.1212	0.2229	0.1225	0.1647	-	1654
20. Bermuda	0.3038	0.2285	0.2108	0.3013	0.2323	0.2117	0.3416	0.2287	0.3226	0.2184	0.2567	0.4873	0.3723	0.1686	0.2403	0.3394	0.2187	0.1809	0.2948	-

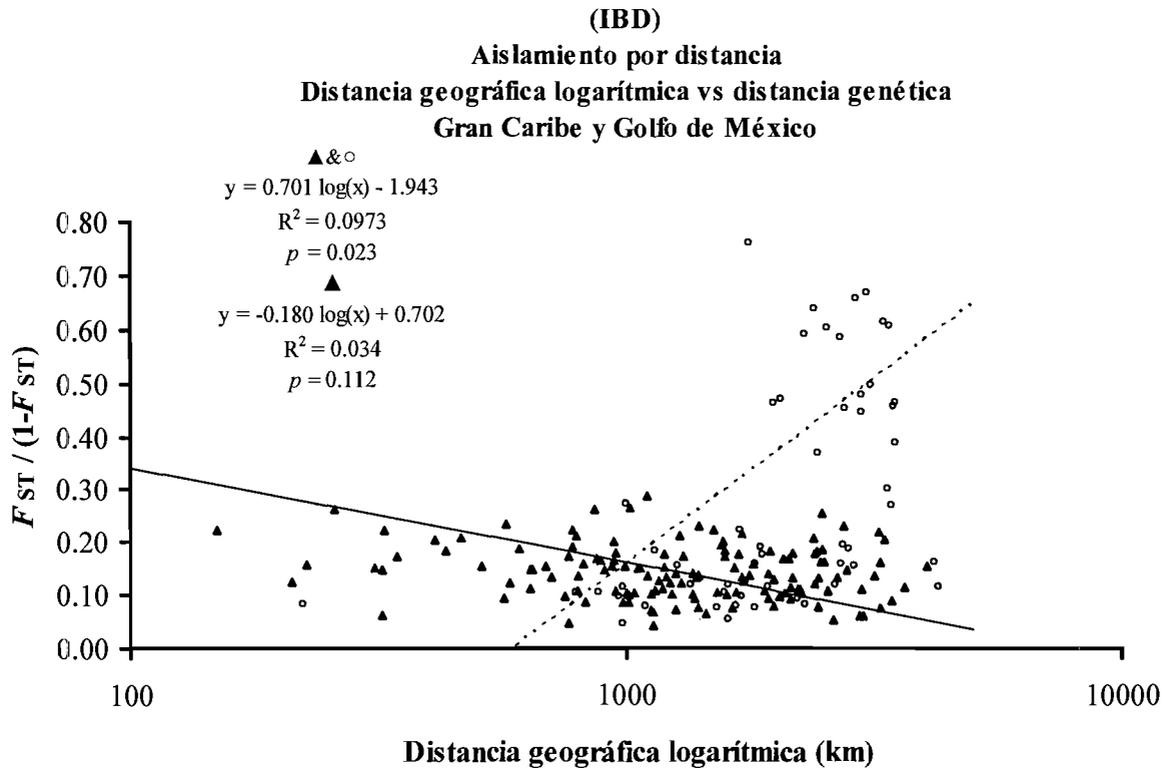


Figura 4.4 Aislamiento por distancia (Isolation By Distance, IBD) entre poblaciones de *Thalassia testudinum* del Gran Caribe y el Golfo de México por medio de una Prueba de Mantel. La relación de distancia genética está expresada como $F_{ST} / (1 - F_{ST})$ (Rousset 1997), con θ (Weir y Cockerham 1984) como estimador de F_{ST} entre pares de poblaciones del Gran Caribe y el Golfo de México. Los valores de la regresión de eje mayor reducida fueron calculados con el software IBD v3.02 (Bohonak 2002) con 10.000 repeticiones. La distancia geográfica es la distancia más corta siguiendo las rutas posible sobre el mar. Dos análisis fueron realizados: El primero incluyendo todas las poblaciones y el segundo excluyendo las poblaciones extremas Bermuda, y las dos poblaciones de la Laguna Madre (representas por ○). Las 17 poblaciones restantes están representadas por ▲.

En la Figura 4.5 se observa el árbol NJ calculado con la distancia genética estandarizada de Nei, D_A (Nei *et al.* 1983; Takezaki y Nei 1996). Se definieron claramente cuatro clusters en este análisis: el primer cluster consistió en las dos poblaciones de Cuba (con una distancia de 939 km y un valor de bootstrap de 99%). El segundo agrupamiento integró a las dos poblaciones de la Laguna

CAPITULO 4. Estructura genética y conectividad de las poblaciones de *Thalassia testudinum* en su área de distribución.

Madre (EUA), Redfish Bay y Lower Laguna Madre (con una distancia de 224 km y un bootstrap de 94%). El tercer agrupamiento se conformó por las poblaciones de la Laguna Madre (EUA) y Bermuda, con 94% de valor de bootstrap, y finalmente el último grupo correspondió a la población de Craig Key (EUA), con un valor de bootstrap de 89%. Se encontró un agrupamiento menos estable, con un valor de confianza moderado que consistió de las poblaciones Curazao y Tobago, con un valor de confianza de 74% y una distancia de 883 km.

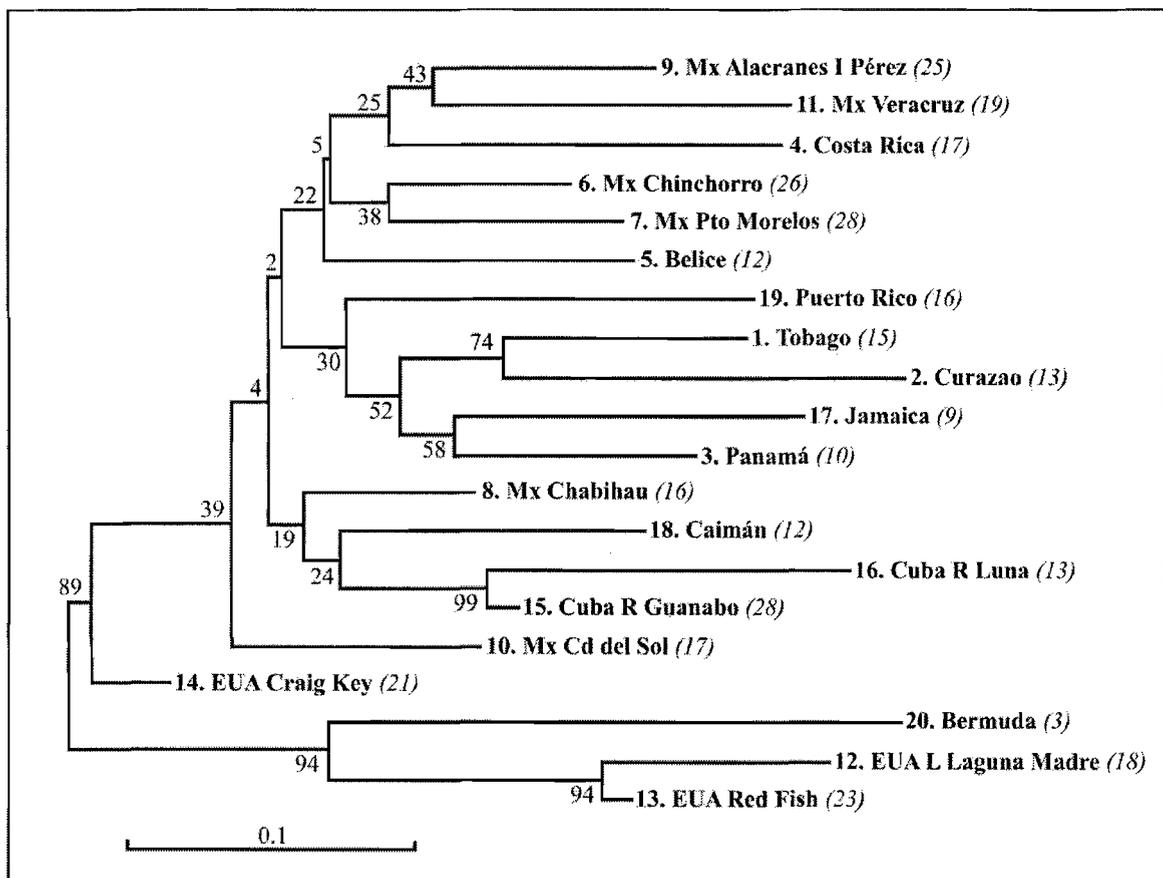


Figura 4.5 Árbol NJ de poblaciones de *Thalassia testudinum* en el Gran Caribe y el Golfo de México. El árbol fue calculado usando la distancia genética estandarizada de Nei D_A (Nei *et al.* 1983), por medio de 10,000 iteraciones. Los valores de "Bootstrap" están en porcentajes en cada bifurcación.

CAPITULO 4. Estructura genética y conectividad de las poblaciones de *Thalassia testudinum* en su área de distribución.

La estructuración genética determinada por el análisis Bayesiano con el programa STRUCTURE v2.1 (Pritchard *et al.* 2000) identificó un total de 11 clusters panmíticos, con un valor posterior de $P(X | K)=0.9918$. El método *ad hoc* de ΔK de Evanno (2005) no logró definir con claridad el valor de K adecuado (Figura 4.7 a y b). En la Tabla 4.4 se observan las probabilidades de asignación de cada población a los 11 clusters. Los valores mayores de asignación fueron los que determinaron la pertenencia a cada agrupamiento, lo cual se ilustra en la Figura 4.6.

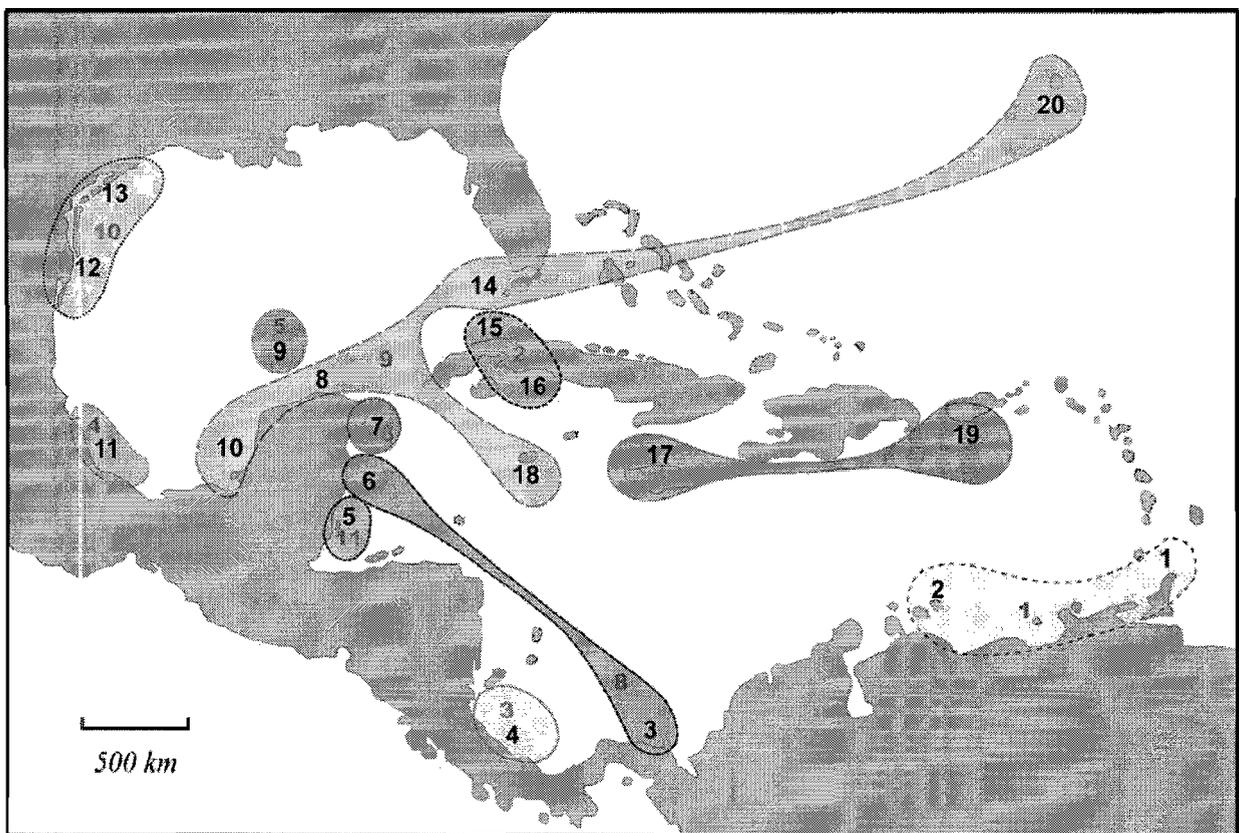


Figura 4.6 Distribución de las poblaciones de *Thalassia testudinum* en el Gran Caribe y el Golfo de México, determinado por los valores de asignación más altos calculados por STRUCTURE bajo $K=11$ (Tabla 4.4). Los números negros representan las poblaciones y las en gris el cluster a cuales fueron asignados.

CAPITULO 4. Estructura genética y conectividad de las poblaciones de *Thalassia testudinum* en su área de distribución.

Tabla 4.3 Valores de asignación de las poblaciones a los 11 clusters determinados por el programa STRUCTURE 2.1 (Pritchard y Wen 2003). Los valores más altos se encuentran en negrita y valores similares dentro de la misma población en negrita y cursivo. La columna final muestra el número de genets utilizados para el cálculo y la fila final el valor promedio de F_{ST} dentro de cada cluster.

Población	Cluster											# genets
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
1. Tobago	0.687	0.021	0.017	0.010	0.030	0.028	0.111	0.027	0.030	0.007	0.031	15
2. Curazao	0.600	0.012	0.017	0.049	0.015	0.042	0.122	0.054	0.033	0.010	0.047	3
3. Panamá	0.062	0.031	0.058	0.074	0.080	0.154	0.037	0.200	0.120	0.017	0.167	16
4. Costa Rica	0.010	0.009	0.673	0.082	0.030	0.039	0.025	0.040	0.027	0.011	0.053	13
5. Belice	0.072	0.033	0.056	0.028	0.049	0.132	0.059	0.160	0.193	0.012	0.207	10
6. MX Chinchorro	0.025	0.031	<i>0.174</i>	0.050	0.046	0.163	0.021	0.176	0.146	0.013	0.156	9
7. MX Puerto Morelos	0.036	0.041	0.049	0.021	0.060	0.378	0.016	0.274	0.056	0.011	0.059	17
8. MX Chahihau	0.037	0.138	0.103	0.099	0.085	0.066	0.034	0.081	0.177	0.038	0.142	12
9. MX Alacranes Isla Pérez	0.026	0.013	0.086	0.047	0.711	0.021	0.019	0.021	0.020	0.012	0.023	21
10. MX Ciudad del Sol	0.018	0.032	0.045	0.038	0.026	0.170	0.040	0.168	0.218	0.033	<i>0.213</i>	13
11. MX Veracruz	0.013	0.012	0.029	0.707	0.073	0.026	0.012	0.027	0.031	0.039	0.031	28
12. EUA Low. Laguna Madre	0.007	0.006	0.006	0.010	0.005	0.007	0.008	0.007	0.007	0.932	0.007	12
13. EUA Red Fish Bay	0.011	0.012	0.014	0.015	0.013	0.009	0.012	0.011	0.020	0.866	0.017	26
14. EUA Craig Key	0.036	0.089	0.047	0.075	0.024	0.084	0.053	0.097	0.176	<i>0.174</i>	0.146	28
15. Cuba Rincón de Guanabo	0.032	0.421	0.079	0.023	0.054	0.083	0.052	0.088	0.060	0.031	0.076	16
16. Cuba Rancho Luna	0.019	0.767	0.026	0.014	0.015	0.022	0.023	0.026	0.024	0.016	0.050	25
17. Jamaica	0.096	0.063	0.047	0.043	0.110	0.053	0.376	0.060	0.064	0.011	0.075	17
18. Caimán	0.112	0.145	0.026	0.018	0.017	0.044	0.036	0.085	0.302	0.010	0.206	19
19. Puerto Rico	0.022	0.035	0.022	0.013	0.018	0.019	0.787	0.020	0.022	0.018	0.024	18
20. Bermuda	0.015	0.006	0.016	0.028	0.014	0.015	0.013	0.069	0.394	0.190	0.239	23
F_{ST} promedio	0.307	0.234	0.168	0.286	0.353	0.206	0.224	0.171	0.127	0.570	0.129	

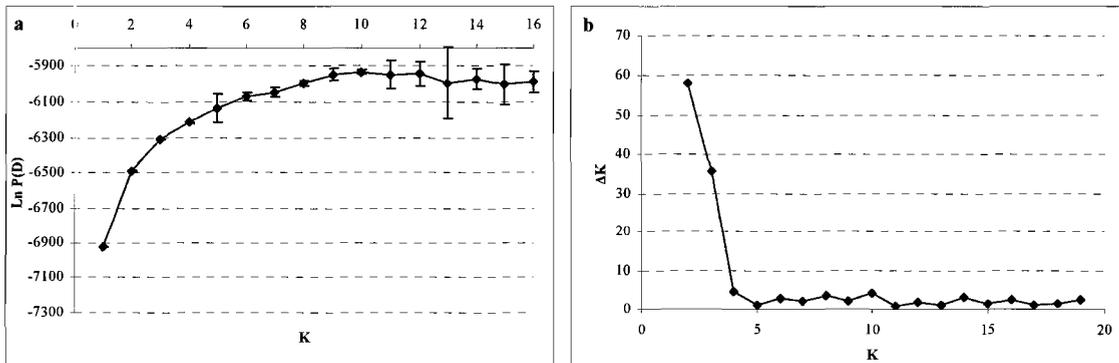


Figura 4.7 a Gráfica que ilustra los valores de probabilidad $\ln P(D)$, con sus errores estándar, para los diferentes valores de K (número de clusters) calculados con el programa STRUCTURE v2.1 (Pritchard *et al.* 2000) para las 20 poblaciones de *T. testudinum* en su área de distribución. Para este análisis se realizaron en 20 cálculos independientes para cada valor de K con un "Burn-in" de 10.000 y una corrida de 100.000 iteraciones. **b.** Gráfica que refleja la relación de ΔK contra K , el cálculo *ad hoc* sugerido por Evanno *et al.* (2005).

Discusión

Este es el primer estudio genético poblacional de una especie de pasto marino tropical que incluye poblaciones a lo largo de toda su área de distribución geográfica. El objetivo de este estudio fue determinar la diversidad genética del pasto marino *Thalassia testudinum* en el Gran Caribe y el Golfo de México, lo que se logró con éxito.

Diversidad genética

La diversidad genética definida por el número de alelos de microsatélites presentes en el área de distribución de *Thalassia testudinum* resultó ser comparable con los estudios anteriores de otras especies: en *Zostera noltii* se encontraron 106 alelos en nueve loci de microsatélites y 233 genets (Diekmann *et al.* 2005); en *Cymodocea nodosa* se describieron 45 alelos en ocho loci de microsatélites y 255 genets (Alberto *et al.* 2006); en *Zostera marina* hubo 232 alelos en nueve loci de microsatélites y 1400 genets (Olsen *et al.* 2004); y en este estudio se describió un total de 63 alelos para los seis loci utilizados y se encontraron 341 genets. La distribución de la diversidad no fue homogénea y el promedio de alelos por locus varió entre 1.8 (Bermuda) y 6.2 (Chinchorro). Todos los loci fueron polimórficos menos en las poblaciones EUA-Lower Laguna Madre (tres loci monomórficos), EUA-Red Fish Bay (un locus monomórfico) y Bermuda (dos loci monomórfico). En general, se encontró una diversidad genética (H_E , A , R_t) más baja en las poblaciones ubicadas en posiciones geográficas extremas del área de distribución de esta especie. La población más extrema fue la de Bermuda, con un valor H_E de 0.411. La segunda población extrema fue la de Tobago, que presentó una H_E relativamente alta (0.644), pero con una diversidad alélica baja ($A=3.3$, $R_t=3.3$). Un tercer grupo que se puede considerar como extremo, es el de las poblaciones de la Laguna Madre:

CAPITULO 4. Estructura genética y conectividad de las poblaciones de *Thalassia testudinum* en su área de distribución.

EUA-Lower Laguna Madre (LLM), con $H_E=0.234$, $A=2.0$ y $R_f=2.0$ y EUA-Redfish Bay (RFB) con $H_E=0.344$, $A=3.2$ y $R_f=3.0$). Este último grupo presentó un muy bajo número de alelos en comparación con las demás poblaciones de *T. testudinum* incluidas en este estudio, lo que probablemente se debe a una reciente recuperación de un cuello de botella genético, o a una reciente colonización por unos cuantos individuos (efecto de fundador).

La Laguna Madre se encuentra separada del Golfo de México por una barra de arena, inhibiendo el intercambio de genes entre el Golfo y la Laguna. La población con una H_E más alta fue la de Cuba-Rincón de Guanabo, con $H_E=0.738$, $A=5.5$ y $R_f=5.1$. Casi todas las poblaciones de este estudio resultaron estar en equilibrio de Hardy-Weinberg, excepto las poblaciones de Puerto Morelos y Chabihau (ver discusión Capítulo 3). Los resultados de las diferentes variables que describen la diversidad genética indican que la diversidad alélica (A) o la riqueza alélica (R_f) podrían ser los mejores indicadores de la distribución de la diversidad

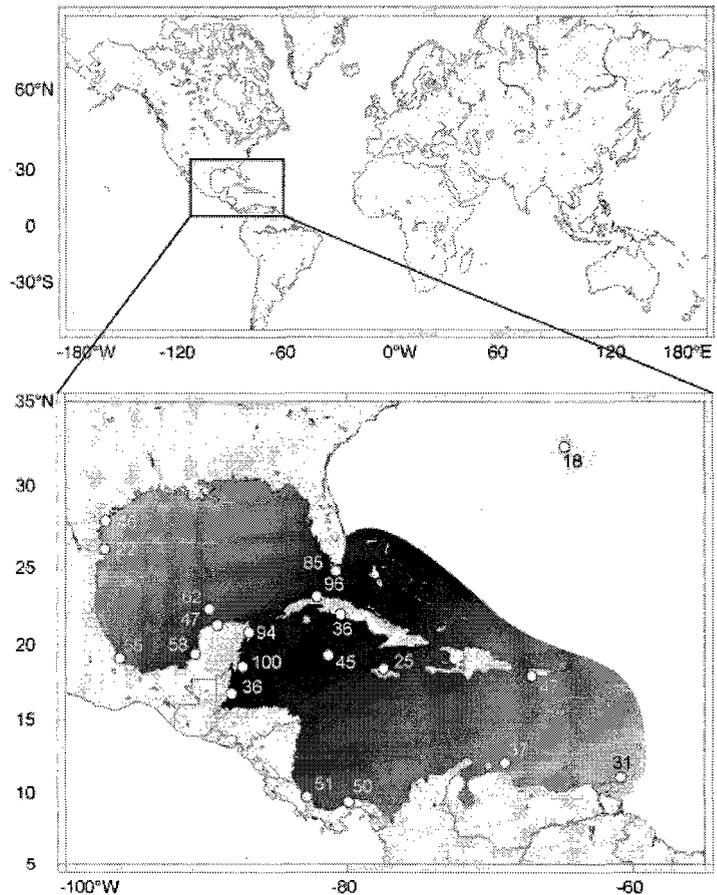


Figura 4.6 La distribución de la diversidad genética en el área de distribución del pasto marino *Thalassia testudinum*. La distribución está basada en la diversidad alélica A de cada población. El valor que representa cada población es el porcentaje relativo de diversidad comparado con la población más diversa, en este caso MX-Chinchorro (100%). La diversidad se observa en negro=100% diversidad máxima, y gris claro=16%. La diversidad nunca puede ser 0%, porque se necesitan por lo menos 6 alelos para los 6 loci utilizados en este trabajo. (Con apoyo de la Dra. Michelle Waycott .James Cook University. Townsville. Australia).

CAPITULO 4. Estructura genética y conectividad de las poblaciones de *Thalassia testudinum* en su área de distribución.

genética de *T. testudinum* en su área geográfica. Esto se basa principalmente en que la heterocigosidad esperada (H_E) puede ser alta, aún si el número de alelos de la población es baja. H_E depende de las frecuencias relativas de los alelos y no únicamente del número de alelos presentes. Basándose en los valores de la diversidad alélica (A) se diseñó un mapa de diversidad genética de *T. testudinum* en su área de distribución (Figura 4.6). Hubiera sido una mejor alternativa utilizar el valor de la riqueza alélica (R_t), pero no se alcanzó el requisito mínimo de 15 genets por población en siete poblaciones. Se empleó una prueba de t de Student para evaluar estadísticamente si las poblaciones en el borde del área de distribución son genéticamente más pobres que las del Centro. En este análisis *a posteriori* se compararon los valores de H_E , A y R_t de las poblaciones Tobago, Bermuda, y Laguna Madre LLM y RFB con las demás poblaciones. La prueba confirmó que sí hay una diferencia significativa en todas las variables entre los dos grupos ($p < 0.000$ con $t = 5.61$ para H_E ; $p < 0.000$ con $t = 6.82$ para A ; y $p < 0.000$ con $t = 5.58$ para R_t).

En otras especies de pastos marinos, como *Zostera marina* (Olsen *et al.* 2004) y *Z. noltii* (Diekmann *et al.* 2005; Billingham *et al.* 2003), se encontró que las poblaciones de los bordes están genéticamente empobrecidas, lo que se atribuye a su aislamiento geográfico, a la fragmentación de las poblaciones por este aislamiento y a factores ambientales relacionados con el aislamiento, como el estrés térmico. Esto también podría ser el caso para *T. testudinum*, ya que la población de Bermuda, por ejemplo, se encuentra en el borde de su área de distribución (que seguramente corresponde al borde de su tolerancia, Figura 4.6).

Hay que mencionar que el área donde la diversidad genética resultó ser más alta es aquella en donde las corrientes son las más intensas (costa de Quintana Roo, costas de Cuba y Florida); así, es posible que la diversidad genética esté relacionada con la intensidad de las corrientes, aunque sería necesario investigar con detalle esta relación con un estudio adecuado.

El análisis de varianza molecular (AMOVA) reflejó una variación genética inter-poblacional de 19.4% (con índice de estructuración genética global, $F_{ST}=0.194$, $p<0.000$), que es mayor que el valor que se obtuvo para las poblaciones de México ($F_{ST}=0.098$). Aún así, es un valor de estructuración significativo pero moderado, más si se considera que se trata de un área de distribución geográfica completa. El nivel de estructuración es comparable con los de otras especies de pastos marinos (Tabla 1.1, Cap 1). La especie *Z. marina* rompe con esta tendencia, pues es una de las especies más cosmopolitas, presente en los dos océanos del hemisferio norte, y tuvo un valor de variación genotípica inter-poblacional de 39.7 %, que es el más alto registrado hasta el momento (Olsen *et al.* 2004). Hay que mencionar que para la especie arriba mencionada existen muchas barreras que pueden impedir el flujo genético entre las regiones en donde crece la especie. Por lo tanto se podría concluir que es común que exista una moderada estructuración genética en pastos marinos que tienen una distribución restringida en un sistema donde el flujo genético no es restringido por barreras, como el Caribe o el Mediterráneo.

Waycott y Barnes (2001) quienes estudiaron las poblaciones de *T. testudinum* de Panamá y Bermuda, encontraron un valor máximo de F_{ST} de 0.07, indicando que las dos eran casi idénticas. El valor de diferenciación genética entre las mismas localidades en este estudio fue mucho mayor ($F_{ST}=0.194$), lo que es un resultado significativamente diferente. Se podría concluir, por lo tanto, que los primers utilizados en el análisis de AFLPs no reflejaron el potencial de la diversidad genética de estas dos poblaciones. Es posible que la diversidad aumente con un cambio o un aumento de primers, pero con la existencia de microsatélites polimórficos este esfuerzo se podría considerar excesivo.

Clonalidad

Como ya se ha mencionado anteriormente, el muestreo de las poblaciones internacionales no fue diseñado para obtener datos sobre la clonalidad, sino más bien para obtener una muestra representativa de la diversidad genética. Aún así, fue posible hacer algunas observaciones generales sobre la clonalidad, el tamaño de los genets y sus edades probables, ya que el muestreo fue similar en cada sitio.

La identidad genotípica, P_{gen} , es la probabilidad de identidad de cada genotipo multi-locus, calculado con las frecuencias alélicas de cada población. Si el número de alelos en una población es bajo, la probabilidad de obtener genotipos similares o idénticos por medio de la reproducción sexual es alta. Cuando los valores de probabilidad son altos, es posible cometer un error y asignar ramets erróneamente a un genet, suponiendo que provienen de una misma semilla, cuando se trata de dos individuos genéticos distintos. La P_{gen} fue muy alta en Bermuda y en la Laguna Madre (EUA), con un valor máximo en Bermuda de 0.253, lo que se debe al bajo número de alelos presentes en esta población (11 alelos para los seis loci), la cual contenía, además un alto número de loci monomórficos (3 de 6). Esta baja diversidad alélica se debe posiblemente a que Bermuda es una de las poblaciones más remotas del área de distribución, donde el aporte de nuevos genes probablemente es muy limitado.

En la población de EUA-Lower Laguna Madre se encontraron dos ramets con el mismo genotipo a una distancia de 850 m. Estos fueron analizados *a posteriori* con los loci Th1-MS, TTMS-GA12, TTMS-GA72, TTMS-GT77, TTMS-GT104 y TTMS-GA180 (Van Dijk *et al.* 2007) para asegurar su identidad. El análisis se realizó a manera de complemento del trabajo de tesis, en el laboratorio de Ciencias de Medio Ambiente de la Universidad de Virginia, Charlottesville, EUA. Al aumentar el número de marcadores para estos dos ramets, se observó que correspondían a dos

CAPITULO 4. Estructura genética y conectividad de las poblaciones de *Thalassia testudinum* en su área de distribución.

genotipos diferentes, pero muy similares (las diferencias se observaron en los loci GA012 y GT077), asegurando de esta manera que no pertenecen a un mismo genet. La población de Bermuda, por ser tan clonal, también se analizó en su totalidad con los 12 loci de microsatélites, lo que resultó en un número de genets idéntico al establecido con los seis loci iniciales, asegurando de esta manera la presencia de tres genets en esta población. El genet más grande fue de de aproximadamente 750 m de largo, integrando un total de 24 ramets. La edad de este genet se estimó en 1050 a 1950 años, considerando un crecimiento promedio de 19-35 cm año⁻¹ (Van Tussenbroek *et al.* 2006; Gallegos *et al.* 1993) y suponiendo un propagación vegetativa únicamente (sin fragmentación). La diversidad clonal (diversidad genotípica) dentro de las poblaciones de *T. testudinum*, resultó alta en comparación con los estudios que emplearon un muestreo a una escala similar (Tabla 1.1).

Para obtener una estimación global de la clonalidad de la especie en toda su área geográfica de distribución, se calculó la diversidad clonal, R , para todos los ramets y genets genotificados de todas las poblaciones juntas, utilizando la ecuación $R=(n-1)/(N-1)$ (Arnaud-Haond *et al.* 2005). Este valor, denominado R_{global} , fue de 0.51 para *T. testudinum*, indicando que aproximadamente uno de cada dos ramets correspondió a un genet diferente. Este valor es ligeramente menor al estimado en los pastos marinos templados de *Zostera* spp donde se encontró una $R_{global}=0.69$ en *Z. marina* (Olsen *et al.* 2004) y $R_{global}=0.69$ en *Z. noltii* (Coyer *et al.* 2004). Las especies de *Zostera* son perennes y anuales, con un alto índice de floración, lo que probablemente explica esta mayor diversidad. Para *Posidonia oceanica* en el Mediterráneo, R_{global} fue de 0.12 (Procaccini *et al.* 2000), indicando que el mantenimiento de las poblaciones es principalmente por propagación vegetativa. *Pocidonia oceanica* es una planta que presenta un bajo éxito de la reproducción sexual, lo que se debe principalmente a un alto porcentaje de frutos abortados (Balestri *et al.* 2003). Con base en lo anterior, el valor de R se podría considerar como un indicador del nivel de reproducción sexual exitosa en los pastos marinos, siendo *T. testudinum* una especie con una reproducción sexual

CAPITULO 4. Estructura genética y conectividad de las poblaciones de *Thalassia testudinum* en su área de distribución.

moderada. *Thalassia testudinum* es una planta dioica, lo cual disminuye la probabilidad de endogamia y aumenta el entrecruzamiento de genes en esta especie, el costo de esta dioicidad es que la probabilidad de polinización disminuye, algo que no es el caso en las plantas monoicas, si es que no hay un sistema de autoinmunidad.

Dos poblaciones que presentaron valores de diversidad genética y clonal sobresalientes fueron la de la Laguna Madre (EUA-Lower Laguna Madre (LLM) y la de EUA-Red Fish Bay (RFB)), que son las dos poblaciones más importantes de *Thalassia testudinum* de esta laguna. En general, estas dos poblaciones presentaron niveles muy bajos de diversidad genética (H_E , A y R_i), pero expresaron un alto nivel de diversidad clonal R . Los valores de diversidad genética fueron $H_E=0.234$, $A=2.0$ y $R_i=2.0$ para LLM y $H_E=0.344$, $A=3.2$ y $R_i=3.0$ para RFB (Tabla 4.2), con una diversidad clonal de $R=0.59$ y $R=0.76$, respectivamente. La laguna es un sistema semi-cerrado con pocas conexiones al mar abierto, pues la presencia de una barra de arena aísla a la laguna de las poblaciones del Golfo de México. La relativa alta diversidad genotípica en estas poblaciones indica que en ellas hay una reproducción sexual significativa, pero que el "pool" genético es pequeño.

En el pasado reciente, antes de la década de 1940, el sistema lagunar de la Laguna Madre fue hipersalino, con valores de $>100\text{‰}$ en la Upper Laguna Madre y con $>60\text{‰}$ en la Lower Laguna Madre, lo que no permitía el crecimiento de pastos marinos en la laguna. Con el dragado del canal Gulf Intracoastal Waterway en 1949, la salinidad disminuyó a valores de $<40\text{‰}$, con cambios de salinidad más moderados. Según los monitoreos de *T. testudinum* en esa zona en las últimas décadas, su población se ha expandido al mejorar las condiciones ambientales dentro de la laguna (Green y Short 2003; Quamenn y Onuf 1993), y sabemos que las poblaciones son muy jóvenes, con una edad de <70 años. Los resultados genéticos de diversidad y clonalidad probablemente indican que se está observando un evento de colonización de un área virgen, y que esta colonización se está llevando a cabo por medio de la reproducción sexual, principalmente. Este es un proceso muy

importante que valdría la pena seguir con mayor detalle, ya que se puede monitorear el proceso de colonización y la dinámica poblacional posterior a colonización. Procesos que se podrían monitorear serian: la velocidad de colonización, diversidad genética y genotípica inicial, el cambio de esta diversidad durante los años próximos, tasa de reproducción sexual inicial y posterior, velocidad de propagación vegetativa durante la colonización y después, estos procesos probablemente son muy lentos, y sería un monitoreo que podría durar decenas de años.

Como observación final, con respecto a la clonalidad de la población de Bermuda, y en relación al estudio realizado en esta especie por Waycott y Barnes (2001), se puede concluir que los ramets con un genotipo idéntico encontrados en las poblaciones de Panamá y Bermuda, probablemente no formaban parte del mismo genet. Uno de los argumentos de Waycott y Barnes (2001) a favor de que los dos ramets pertenecían al mismo ramet, a pesar de estar separado por ~2700 km, fue que existe una alta conectividad en el Caribe. Sin embargo, en el presente estudio, no se encontraron individuos con un mismo genotipo en poblaciones distintas.

Aislamiento por distancia

En toda el área de distribución de *T. testudinum*, se encontró un aislamiento por distancia (IPD) que resultó menos significativo que el determinado exclusivamente para las poblaciones mexicanas (Capítulo 3, $p < 0.0024$, $R^2 = 0.207$). Aún así, la correlación fue significativa pero la R^2 extremadamente baja ($p = 0.023$, $R^2 = 0.097$). Esta baja correlación para el área geográfica de la especie se debe probablemente a que varias de las poblaciones provienen de las islas, y a que las poblaciones están separadas por grandes estrechos de mar. La presencia de un cuerpo de agua entre las poblaciones hace que la dispersión de los frutos no pueda ocurrir gradualmente (como sería el caso en las poblaciones conectadas por tierra, por ejemplo, las de *T. testudinum* de la costa de México). Aunque una dispersión a cortas distancias, con una estrategia de tipo colonización de paso a paso sería lo más

probable, los resultados de la baja diferenciación genética entre algunos pares de poblaciones alejadas geográficamente, sugieren que existe una dispersión significativa a larga distancia. Se sabe que los frutos, que son los propágulos de dispersión de larga distancia, tienen una capacidad de flotación de 10 días (Jiménez Durán 2004; Kaldy *et al.* 1999), lo que permite que las semillas puedan desplazarse potencialmente cientos de kilómetros en aguas abiertas. Es muy factible que las trayectorias de los frutos no sean lineales (como las preestablecidas en este estudio) y tengan rutas complicadas de dispersión, combinando transporte costero con oceánico, generando de esta manera una relación no lineal entre distancia genética y geográfica. Si se analiza la gráfica de aislamiento por distancia (Figura 4.4), se observan diferenciaciones altas entre pares de poblaciones cercanas geográficamente y diferenciaciones muy bajas entre poblaciones geográficamente muy lejanas, siendo indicadores de una dispersión aleatoria, con un potencial de dispersión grande, y una alta conectividad a nivel de especie en su área de distribución.

Hubo casos específicos que afectaron la correlación de IPD, como las poblaciones de Cuba, Bermuda y la Laguna Madre. El valor de F_{ST} entre Cuba-Rincón de Guanabo y Cuba-Rancho Luna fue de 0.062 con una distancia geográfica de 939 km (baja diferenciación genética y gran distancia geográfica). Estas poblaciones se encuentran al lado norte y sur de la Isla de Cuba, respectivamente y aparentemente sin una conectividad directa que fuera generada por las corrientes oceánicas (Fig. 4.1). Esta baja diferenciación se puede considerar como una señal de alta conectividad, resultado de una dispersión costera importante.

Los valores elevados de diferenciación que se encontraron entre las poblaciones de la Laguna Madre (RFB y LLM), Bermuda y las demás poblaciones, se deben a la baja variedad de alelos dentro de estas tres poblaciones, y por ende, a una dominancia de unos cuantos alelos, algo que no ocurre en las poblaciones más centrales del Golfo de México y el Gran Caribe. Si descartamos estas tres poblaciones más pobres del análisis se observa que la correlación desaparece,

y que la pendiente de la regresión se vuelve ligeramente negativa. Esto quiere decir que entre las poblaciones que se encuentran en un área de alto potencial de flujo genético, no hay una relación entre la distancia geográfica y la distancia genética, y que la diferenciación genética de poblaciones cercanas y lejanas es aproximadamente similar.

Estructuración genética

Para toda el área de distribución de *T. testudinum* el valor del índice de fijación F_{ST} fue de 0.194, que es una medida general que describe la diferenciación presente en el área de estudio. En este caso, el valor indica una estructuración baja a intermedia, comparado con estudios de otras especies de pasto marino, y también tomando en cuenta la superficie que cubre esta especie (Tabla 1.1, Cap. 1).

La distribución de las poblaciones basada en las frecuencias de los alelos obtenida con un árbol NJ (Figura 4.5), demostró que hay muy pocos agrupamientos, la mayoría conformados por clusters de dos poblaciones vecinas (la Laguna Madre, Cuba, Tobago y Curazao, y Laguna Madre y Bermuda). El único agrupamiento geográficamente grande, y que podría considerarse como una región, es el de EUA-Lower Laguna Madre, EUA-Red Fish Bay, Craig Key y Bermuda, con un valor de bootstrap de 89%, pero hay que confirmar este agrupamiento aumentando el número de muestras, ya que Bermuda únicamente aportó tres genets como población, y la Laguna Madre contribuyó muy pocos alelos. Además, sería recomendable agregar más poblaciones entre Florida y la Laguna Madre para así asegurar la existencia de este agrupamiento. Los valores de bootstrap de las demás ramificaciones fueron demasiado bajos, con valores menores del 70-60% de confianza, por lo que se pueden considerar como ramificaciones inestables. En algunos casos particulares, el valor bajo de confianza se explica por el número reducido de individuos, pero en general, se puede concluir que existe una baja estructuración genética en el área de distribución de la especie.

En el análisis Bayesiano de asignación de las poblaciones por el programa STRUCTURE v2.1 (Pritchard *et al.* 2000), definió que el total de clusters fue de 11 y es un resultado comparable con el del árbol NJ, aunque las agrupaciones no fueron iguales en todos los casos. En el centro del área geográfica de la especie se observa el cluster 9 que integra una gran parte de la superficie de la especie, y se podría considerar una evidencia de alta conectividad en esta zona. Los clusters mejor definidos fueron la poblaciones de La Laguna Madre (cluster 10) y Tobago con Curazao (cluster 1) (ver Tabla 4.3). Una gran parte de las poblaciones tuvo un valor de pertenencia a varios de los clusters definidos, resultado que indica una estructuración no muy estable, y posiblemente un tasa de flujo genético entre las poblaciones. La mayoría de los clusters consistieron de poblaciones vecinas, pero en algunos casos, como el cluster 8, las asignaciones fueron no bien explicables por su ubicación geográfica. Como ya se ha mencionado, es muy probable que la estructuración se defina mejor con un aumento de genets dentro de las poblaciones. El valor de estructuración definido por ΔK tampoco logró definir bien el resultado obtenido por STRUCTURE, resultando en un valor de K optimo de $K=2$, un resultado no muy probable. Además, el método *ad hoc* de ΔK no es capaz de determinar el valor de ΔK para $K=1$, siendo esto el caso se consideraría toda el área de distribución como una población.

Como observación general se puede concluir que los resultados de estructuración aquí presentados sugieren que el Gran Caribe y el Golfo de México forman un gran sistema abierto, sin barreras a gran escala que impidan el flujo genético entre las poblaciones de *T. testudinum*. Esto se acentúa si se eliminan del análisis AMOVA las poblaciones de Bermuda y las de La Laguna Madre. El valor de F_{ST} disminuye a 0.144 (incluyendo estas poblaciones el valor de $F_{ST}=0.194$, AMOVA), indicando que la estructuración fue un poco sesgada por estas tres poblaciones.

Si se analiza la distribución de las poblaciones en relación con las corrientes principales del Caribe y el Golfo de México (ver Figuras 4.1 a y b), se esperaría una dirección del flujo genético de

este a oeste, con un giro hacia el norte en el área del Canal de Yucatán. Las Figuras 4.1 a y b representan la dirección y velocidad promedio de las corrientes principales mediadas por boyas de deriva lagrangianas. Éstas sugieren una relación fuente-sumidero (source-sink), del sur-este al norte, de los propágulos de *T. testudinum*. Si esto fuera el caso, se esperaría que las poblaciones de Trinidad y Tobago y Venezuela funcionaran como fuentes de frutos para el resto del Caribe, y que hubiese un aumento de la diversidad genética a lo largo de la trayectoria de la corriente principal. Este aumento se atribuiría a la acumulación de mutaciones que se van desplazando hacia el oeste, y se esperaría una diversidad máxima (con alelos únicos para la zona) en las costas de Cuba o Florida. Los resultados genéticos obtenidos no apoyan esta posible tendencia gradual, encontrándose una diversidad similar en toda el área con un máximo en el centro del área de distribución. Esto puede indicar que el transporte de los frutos (el flujo genético) es multi-direccional. Es probable que los frutos sean transportados a larga distancia por estas corrientes de sur a norte, pero como se menciona en el Capítulo 3, la dispersión principal se lleva a cabo a lo largo de las costas y el flujo genético podría ser revertido por el transporte en dirección opuesta por medio de la colonización de paso a paso, homogenizando de esta manera la distribución de los alelos. Otro aspecto importante es que la circulación del Caribe es muy variable, tanto en dirección como en fuerza y tiempo. Las corrientes mostradas en las Figuras 4.1 a y b son generalizaciones basadas en promedios. Estudios recientes revelaron que el Caribe es influenciado por giros de 100-500 km de diámetro que se mueven en dirección oeste, atravesando el Mar a lo largo de la Corriente del Caribe, cambiando su dirección localmente (Andrade 2000; Fu *et al.* 1983).

Conclusión

En resumen, con base en los resultados derivados del árbol NJ para poblaciones internacionales, se puede concluir que hay una alta conectividad entre las poblaciones de *Thalassia testudinum*, pero que existe cierta estructuración. La distribución de las poblaciones en el árbol NJ, STRUCTURE y la distribución de la grafica de APD indican que la estructuración probablemente se genera por un transporte a larga distancia que es poco frecuente y aleatorio, y una dispersión costera principal generando un aislamiento por distancia local pero sólo para las poblaciones conectadas por tierra. Los resultados también demuestran que no hay barreras que impidan el flujo genético a gran escala al interior del área geográfica de distribución de la especie. Las poblaciones de *T. testudinum* se encuentra en la mayoría de las costas del Caribe y del Golfo de México, pero hay localidades donde no existe y donde se esperaría encontrarla. Un ejemplo de ello sería la laguna de Chetumal, donde el ambiente parece ser adecuado para el crecimiento de *T. testudinum*. Sería interesante investigar la posibilidad de que las poblaciones de esta especie, en el total de su área de distribución, se comporten como una gran meta-población, con una dinámica muy lenta de aparición y desaparición de las poblaciones locales.

CAPITULO 5

DISCUSIÓN GENERAL

Los microsatélites de *Thalassia* spp.

Cuando se inició el presente proyecto de genética poblacional de *Thalassia testudinum* había la posibilidad de utilizar varios marcadores ya existentes como: AFLPs e isoenzimas (Waycott y Barnes 2001), RAPDs (Larkin *et al.* 2006 ; Kirsten *et al.* 1998), y ISSRs (Davis *et al.* 1999). Para llevar a cabo el trabajo se realizó una prueba con los ISSRs de Davis *et al.* (1999), sin embargo, los resultados no fueron muy consistentes (los primers no amplificaban y las bandas no eran repetibles), por lo que, debido a la falta de reproducibilidad, se descartaron. Los RAPDs también fueron descartados, ya que son difíciles de manejar y no siempre son reproducibles los resultados. Waycott y Barnes (2001) recomendaron utilizar microsatélites ya que los AFLPs que utilizaron no fueron tan informativos como esperado, además las instalaciones del laboratorio no eran las adecuadas para utilizar AFLPs. Es por lo anterior que se decidió realizar el estudio con microsatélites como marcadores que son co-dominantes y fáciles de reproducir. El problema con estos marcadores es que son específicos para cada especie, y no se habían desarrollado para *T. testudinum*, así que se tomó la decisión de desarrollar microsatélites como parte del trabajo de tesis, trabajo que se realizó en conjunto con el Dr. Joop Ouborg de la Universidad Radbout de Nijmegen, Holanda.

El presente estudio es el primero que se realiza con estos marcadores, altamente polimórficos y co-dominantes. Además, es el primer estudio que determinó la diversidad genética a escala geográfica, e incluso a lo largo de toda su área de distribución.

Los pastizales de *Thalassia testudinum* aparentemente son muy homogéneos y aparentan ser una misma planta o un genet único. El uso de microsatélites como marcadores genéticos demostró que éste no es el caso y que los pastizales de *T. testudinum* generalmente son genéticamente heterogéneos, integrando mucho genotipos. Los resultados obtenidos demostraron que los microsatélites son excelentes marcadores permitiendo determinar los genotipos de las plantas con un alto grado de confiabilidad. La diferenciación genética en *T. testudinum* con los AFLPs entre Panamá y Bermuda (Waycott y Barnes 2001, $F_{ST}=0.070$, AMOVA) fue mucho menor que aquella determinada entre estas mismas poblaciones con microsatélites ($F_{ST}=0.210$) en el presente estudio. Aún así, los valores de F_{ST} de este estudio que están relacionados con Bermuda no son confiables, ya que únicamente consintió de 3 genets, pero si se comparan los resultados de todo el Caribe y Golfo de México, se esperaría una diferenciación del orden encontrado. La baja diferenciación obtenida con los AFLPs se podría atribuir a una baja diversidad genómica en *T. testudinum*, considerando que los AFLPs están conformados de fragmentos amplificados de una gama de regiones del ADN genómico. Los microsatélites a su vez, son generalmente mucho más variables por tener una mutación relativamente alta. Los AFLPs, a pesar de su baja resolución, también pueden ser útiles para estudios de genética poblacional de *T. testudinum*. Cada tipo de marcador representa un tipo distinto de reloj molecular y la escala de tiempo evolutivo depende de la frecuencia de mutación del marcador. Los microsatélites son de los marcadores que mutan a una tasa mayor, lo que permite visualizar cambios genéticos, relativamente recientes (Ouborg *et al.* 1999). Incluso se pueden combinar diferentes tipos de marcadores, como lo hicieron Serra *et al.* (2007) con *Posidonia oceanica*, quienes usaron microsatélites e ISSRs; estos autores encontraron más genotipos y genets dentro las poblaciones combinando los resultados de estos dos tipos de marcadores, que cuando los genets fueron determinados con cada marcador por separado.

En el presente estudio se desarrollaron un total de 14 microsatélites para *T. testudinum* (van Dijk *et al.* 2007), utilizando sólo seis debido a que se amplificaban bien en el laboratorio. En un análisis realizado posterior se aumentó el número de loci con 6 más: Th1-MS, TTMS-GA12, TTMS-GA72, TTMS-GT77, TTMS-GT104 y TTMS-GA180 (de Van Dijk *et al.* 2007). El análisis fue realizado como complemento final del trabajo de tesis en el laboratorio de Ciencias del Medio Ambiente en la Universidad de Virginia, Charlottesville, EUA. Para comparar los resultados obtenidos se analizaron estos marcadores "nuevos" y los seis marcadores utilizados en este estudio, con los resultados de un secuenciador MegaBACE™ (GE Healthcare Life Sciences). Además, las muestras fueron amplificadas con otro tipo de TAQ Polimerasa, llamado IMMOLASE POLIMERASE (Bioline) que es más específico y menos sensible a la temperatura de alineación que el TAQ utilizado en el análisis actual. La comparación de los alelos de los loci fue consistente para las muestras del estudio de México y el internacional, con una diferencia del número de bases por alelo entre la tinción de plata y el secuenciador automático, con; TTMS-GA6 (-1 base), TTMS-GA8 (+2 bases) , TTMS-TGA39 (+2 bases), TTMS-TCT58 (-2 bases), TTMS-GGT59 (+4 bases). El locus TTMS-GT112 no fue analizado por tener muy pocos alelos. Los microsatélites que aumentaron el número de genets en la población de la Laguna Madre fueron el locus TTMS-GT77 y el locus ThMS1, que son loci muy diversos. Por lo cual se sugieren como candidatos adecuados para futuros trabajos. En estudios anteriores se ha demostrado, en pastos marinos, que el aumento de los marcadores o la substitución de ellos por unos más diversos, puede aumentar el número de genets dentro de una población (Arnaud-Haond *et al.* 2007; 2005).

El efecto de un aumento en el número de los loci sería más notorio en las poblaciones del límite del área de distribución de la especie, ya que en estas poblaciones la diversidad alélica (*A*) tiende a ser menor que en el centro del área de distribución, un resultado igualmente encontrado para otras especies de pasto marino en su área de distribución (Diekmann *et al.* 2005; Olsen *et al.* 2004;

Billingham *et al.* 2003). Aun así, el número de loci utilizados en el presente estudio, fue suficiente para determinar las relaciones de conectividad y estructuración genética de la especie. Pero para realizar estudios de diversidad clonal dentro de las poblaciones se recomiendarecomendaría aumentar por lo menos a ocho loci el número de marcadores utilizados, disminuyendo de esta manera igual el valor de p_{gen} de los genotipos.

Al finalizar el muestreo y los análisis de laboratorio, dos marcadores tuvieron ciertas restricciones y posiblemente deberían de ser substituidos en el futuro. El primero fue el microsatélite TTMS-GA6, el cual presentó complicaciones durante las amplificaciones y la genotipificación. El segundo locus que tuvo restricciones fue el TTMS-GT112. Este microsatélite funcionó bien, pero únicamente amplificó tres alelos que, además estaban presentes en toda el área de distribución de la especie por lo que contribuyó poca información para definir la estructuración genética de las poblaciones.

Se sabe que para algunas especies de pastos marinos los microsatélites fueron utilizados para especies cercanas dentro del mismo genero, un ejemplo de ello son los microsatélites desarrollados para *Zostera noltii* que resultaron ser polimórficos en *Z. japonica* (Coyer 2004). Es posible que algunos de los 14 marcadores desarrollados puedan ser polimórficos para *T. hemprichii*, la única otra especie del genero *Thalassia* que habita en el Océano Pacífico e Indico. En los mares tropicales, existen tres pares de especies hermanas de pastos marinos que se encuentran en el Indo-Pacífico y en el Atlántico occidental tropical que son: *Halodule uninervis* (Indo-Pacífico) y *H. wrightii* (Atlántico occidental tropical), *Syringodium isoetifolium* (Indo-Pacífico) y *S. filiforme* (Atlántico occidental tropical) y *Thalassia hemprichii* (Indo-Pacífico) con *T. testudinum* (Atlántico occidental tropical). Se supone que estos tres grupos de especies hermanas se originaron de tres ancestros con una distribución pantropical.

Estas especies probablemente iniciaron su divergencia geográfica después del cierre del Istmo de Panamá en el Mioceno, hace 3 – 2.5 millones de años (Den Hartog 1970). Hay varias preguntas que se podrían plantear en relación a las especies hermanas, por ejemplo: 1. ¿Habrá un efecto de comunidad (baja o alta diversidad específica) sobre la diferenciación genética? Esta pregunta se basa en que *T. testudinum* generalmente es la especie dominante y coexiste mayormente con solo una otra especie de pasto marino, mientras que *T. hemprichii* generalmente crece en praderas formadas por varias especies, y por ellos tiene que competir. 2. ¿Hay un "efecto del área per se" sobre la diversidad genética de las especies de este género? Por tener un tamaño de población mayor en un área mayor, se esperaría una variación genética y estructuración mayor. El área de distribución de *T. hemprichii* del Indo-Pacífico es mucho más grande que la de *T. testudinum* del Atlántico tropical (Caribe y Golfo de México).

El muestreo de *Thalassia testudinum* para estudios de genética poblacional

El diseño de muestreo fue un "híbrido" en el entendido que su fin fue obtener información sobre la estructura genética a una escala geográfica, y al mismo tiempo revelar la estructura clonal dentro de las poblaciones. El presente estudio puede servir como una referencia para diseñar trabajos con fines más específicos.

Por ejemplo, se recomienda realizar una recolecta de aproximadamente 40 ramets o más sobre una superficie mayor, tomando las muestras por lo menos a 50 m de distancia entre cada una. Esto se debe a la alta clonalidad dentro de las poblaciones y por ende a la alta tasa de recolectas múltiples del mismo genet, disminuyendo la población efectiva para realizar los cálculos de diversidad genética.

Por razones logísticas se recolectaron poblaciones cercanas a la costa por medio de buceo libre. Las poblaciones cercanas a la costa son más susceptibles a eventos climatológicos y por

consiguiente probablemente más dinámicas, y es posible que los resultados de las poblaciones de este estudio se vieron afectados por la cercanía a la costa y la profundidad que fueron recolectadas. Es probable que las poblaciones recién recuperadas demuestren una diversidad genética menor o que se encuentren en un desequilibrio de Hardy-Weinberg, lo que podría ser el caso para la población de Puerto Morelos, por ejemplo, que demostró un déficit significativo de heterocigosidad. Para obtener una visión más amplia de la dinámica poblacional, se deberían realizar colectas más alejadas de la playa, ya que las poblaciones profundas son en general más estables (profundidad máxima de la especie es de app. 15 m), y se esperaría que reflejaran mejor la diversidad genética acumulada durante la existencia de la población.

Por otro lado, si el propósito del estudio es realizar un análisis de autocorrelación y clonalidad, se recomienda realizar la recolecta de muestras en un gran cuadrante con coordenadas, para lo cual las dimensiones dependerían del objetivo del estudio. Además, sería importante aumentar el número de marcadores. Para un mapeo de ramets y un análisis de autocorrelación una colecta en una cuadrante de 50 × 50 m sería adecuado, con una recolecta de más de 100 ramets para obtener valores confiables de tamaño de clon, la relación distancia y la relación genética.

Es importante ser cautelosos con los resultados de la individualidad con el uso de técnicas moleculares, especialmente con especies tan longevas como *T. testudinum*. La identidad genética, determinada por medio de genotipos, puede estar sesgada por mutaciones somáticas dentro de las secuencias de los microsatélites que se generan y que durante el proceso de mitosis en los meristemas, se fijan en la población. Estas mutaciones se pueden integrar (si no son letales) a los clones durante la vida del genet (Klekowski 2003). Es posible que a lo largo del tiempo, un genet cambie de genotipo por una de estas mutaciones somáticas en la secuencia del microsatélite, lo que podría resultar en uno o varios fragmentos diferentes, pero del mismo genet que presenten un genotipo diferente.

Otro estudio que no se ha realizado para el genero *Thalassia* es un análisis filogeográfico, y valdría la pena comparar regiones variables del genoma o del cloroplasto (transferido por la planta madre únicamente) para descifrar los procesos históricos de la especie después del cierre de Istmo de Panamá.

Genética poblacional en los pastos marinos

En los últimos diez años el estudio genético poblacional en los pastos marinos, ha aumentado considerablemente. Esto se debe principalmente al desarrollo de marcadores altamente polimórficos, que tienen la resolución adecuada para revelar la diversidad genética dentro de este grupo ecológico, contribuyendo a un mayor conocimiento de las especies, especialmente en relación a su distribución, clonalidad y reproducción sexual. Al finalizar este estudio, un total de 102 publicaciones fueron registradas relacionadas con la diversidad genética o la filogenética de los pastos marinos, las cuales incluyen esta incluía dos tesis de doctorado y una de maestría. De estas 102 citas, 86 fueron publicadas en los últimos diez años. Si se considera que hay aproximadamente 60 especies (Green *et al.* 2003), el número de publicaciones es considerable.

Este es el primer estudio de genética poblacional para una especie de pasto marino en el Atlántico Mexicano, pero no es el primer trabajo en el país. En las costas de Baja California y el Golfo de California, se han realizado trabajos que evaluaron la estructura genética y el aislamiento por distancia de *Zostera marina* (Muñiz-Salazar *et al.* 2007; 2005). Estos trabajos fueron realizados con el uso de nueve microsatélites desarrollados por el Reusch *et al.* (2000a y b; 1999). Muñiz-Salazar *et al.* (2005) encontraron una diferenciación genética considerable entre las poblaciones del Pacífico y las del Golfo de California, pero entre las poblaciones de las dos regiones el flujo genético también fue restringido con valores de F_{ST} significativos entre ellas.

Los resultados del estudio genético de *T. testudinum* con el uso de microsatélites reveló que la diversidad genética de esta especie es comparable con los resultados de otras especies de pastos marinos, con un total de 63 alelos para 6 loci. Sin embargo, su estructuración genética a lo largo de su área distribución geográfica fue de moderada a baja, y se demostró que la diversidad está homogéneamente distribuida sobre toda el área. Además, la relación entre distancia geográfica y distancia genética fue muy aleatoria indicando que los eventos de migración, son significativos. Estos resultados con los estimados del potencial de dispersión de los frutos (Jiménez Durán 2004; Kaldy *et al.* 1999) demuestran que la conectividad entre las poblaciones de esta especie debe ser alta. Por lo tanto, se podría contemplar la posibilidad de que las poblaciones de *Thalassia testudinum* sean parte de una gran meta-población, lo que se definiría como “Un grupo de poblaciones geográficamente separadas que interactúan entre ellas en cierto nivel” (Hanski 1999). Generalmente, una meta-población consiste de áreas ocupadas por poblaciones de la especie y áreas potencialmente adecuadas para la especie, pero no ocupadas por ella, lo que sería causa de extinciones de las poblaciones locales que a lo largo del tiempo fueron recolonizadas. La dinámica de las meta-poblaciones se basa en la probabilidad estocástica de la desaparición y la recolonización de las poblaciones. De esta manera, la meta-población se mantiene estable pero las áreas adecuadas para la especie van apareciendo y desapareciendo (Hanski 1999; Hanski 1998; Levins 1969).

En el caso de *T. testudinum* el escenario meta-poblacional pudiera ser el siguiente: Las poblaciones diferentes en el Gran Caribe y el Golfo de México mantienen una relación genética por medio de un flujo genético de moderado a esporádico, dependiendo de la ubicación geográfica, evitando de esta manera una estructuración genética pronunciada. Las poblaciones van aumentando y desmintiendo en tamaño y nuevas áreas son recolonizadas por los frutos, un proceso que probablemente se llevaría a cabo muy lentamente para esta especie tan clonal. Las poblaciones externas (situadas en los

límites de la distribución de la especie) son las que menos interactúan genéticamente con las demás poblaciones, lo que resulta en una menor diversidad genética en estas áreas (bajo número de alelos).

Aplicaciones prácticas del presente estudio

Una de las aplicaciones más importantes del desarrollo de los microsatélites es la aportación de una capacidad para identificar los niveles de conectividad entre poblaciones de *T. testudinum* en México y en toda su área de distribución, básico para el desarrollo de planes de manejo y conservación. Es una herramienta muy poderosa que puede aumentar el éxito de los proyectos de conservación y restauración.

Para iniciar sería muy importante establecer la tasa de entrecruzamiento (outcrossing) entre los genets de las poblaciones, esto implicaría establecer cual es el proceso de polinización, es decir , cómo se dispersa, qué lejos llega, cuánto se produce, cuál es el éxito de polinización, si hay herbivoría, y cuánto tiempo sobrevive. Además, hay que establecer si hay procesos de inhibición de parte de la flor femenina o no y, habría que determinar, cuántas flores se forman, cuántas se fecundadas, qué tan relacionado genéticamente puede ser el polen para fecundar el óvulo, cuántos abortos hay, si existe herbivoría, si se presenta apomixis y en cuánto porcentaje (la apomixia depende de la presencia o ausencia de plantas masculinas), qué tan viables son las semillas y si hay selección para nuevos individuos migrantes o no. Muchas de estas preguntas se pueden responder por medio de análisis genéticos, con el uso de los microsatélites, determinando por ejemplo: los valores de heterocigosidad en la población establecida, comparar ésta con la diversidad de los juveniles, hacer pruebas de paternidad, analizar los juveniles con la planta madre para poder determinar presencia de apomixis, realizar fecundaciones artificiales con polen y flores de plantas genotipificadas. Estos análisis aportarían información valiosa para determinar la dinámica

reproductiva de la especie, especialmente por ser una especie con un sistema tan especial como el de tener una reproducción totalmente subacuática y marina.

En los ecosistemas terrestres la biodiversidad se ha postulado como una medida de desempeño o de adaptación al medio ambiente (Loreau *et al.* 2001). Una alta biodiversidad (alto número de especies) dentro de un ecosistema, generalmente indica un sistema sano, o que tiene un intervalo de tolerancia más amplio que los ecosistemas con una baja biodiversidad. En los ecosistemas acuáticos dominados por macrófitas (como los pastizales del Caribe), existe una tendencia hacia una baja biodiversidad y generalmente una o pocas especies dominan estos sistemas (Reusch y Hughes 2006). Estos autores postularon que el desempeño en este tipo de ecosistemas no es atribuible a la biodiversidad de especies, sino más bien se atribuye a la diversidad genotípica (clonal) de las especies dominantes. En el caso de *T. testudinum*, esto significaría que la diversidad genotípica podría utilizarse como una medida de adecuación, que primero ser probada experimentalmente. Esta hipótesis de adecuación también sería aplicable a sistemas dominados por algas u otro tipo de planta acuática dominante.

Otra aplicación de los microsatélites en *T. testudinum* relacionada con la conservación es su utilidad para los esfuerzos de restauración. Se ha comprobado, con el uso de técnicas moleculares, que los esfuerzos de restauración de *Zostera marina*, en los Estados Unidos de América, regeneraron nuevas poblaciones con valores de diversidad genética muy bajos (Williams 2001). Teóricamente esta pobreza en la diversidad genética tiene como consecuencia un reducido desempeño de la población (afectación al crecimiento y la reproducción sexual), y podría haberse evitado con una prospección previa de la diversidad genética (número de alelos, heterocigosidad) y genotípica (número de genets por m²) de la población donante.

Trabajos recientes comprobaron que la diversidad genotípica tiene una gran influencia sobre la adaptación en las poblaciones restauradas (Reusch y Hughes 2006; Reusch *et al.* 2005; Hughes *et*

al. 2004). Se analizaron poblaciones de *Z. marina* con diferentes composiciones genotípicas bajo varios niveles de estrés, como temperatura (Reusch *et al.* 2005) y forrajeo de gansos (Hughes *et al.* 2004), y las poblaciones genotípicamente más diversas resultaron ser más resistentes a los disturbios (Reusch *et al.* 2005). En un estudio similar, con *Posidonia oceanica*, donde se analizaron tres poblaciones donantes y tres poblaciones receptoras, se encontró que el desempeño en crecimiento fue mayor en la población que recibió plantas originarias de la población donante genéticamente más diversa (Procaccini *et al.* 2001). Los autores atribuyeron el éxito de las poblaciones genéticamente más diversas a una plasticidad fenotípica mayor, la que a su vez está directamente relacionada con el polimorfismo genético de la planta.

Si se explora la hipótesis de Reusch y Hughes y los resultados de Williams (2001) y Procaccini *et al.* (2001), las poblaciones de *Thalassia testudinum* del centro del área de distribución, y específicamente las poblaciones de México, deberían de estar mejor adaptadas y más resistentes comparado con las poblaciones de, por ejemplo, Bermuda o Tobago, donde la diversidad fue la más baja. Las herramientas para comprobar esta mejor adaptación en *T. testudinum* ya están disponibles, y sería de gran interés evaluar si la hipótesis realmente es aplicable en una población como la de EUA-Lower Laguna Madre, donde la diversidad genética resultó ser muy baja, pero la diversidad genotípica fue alta (alto número de genets en los transectos). Experimentos relacionados a la diversidad genética y genotípica con las adaptaciones al medio ambiente se tendrían que probar en experimentos controlados, sin embargo, hay que tomar en cuenta que esta especie no es sencilla para trabajar en sistemas cerrados artificiales, aunque no se deberían de descartar la posibilidad. Una manera de resolver este problema es realizar los experimentos *in situ* pero aislados de los alrededores. Esto se lograría cortando, en cuadrantes experimentales, las conexiones con las plantas externas. Y dentro de estos cuadrantes hacer experimentos con luz, nutrientes o competencia con otras especies, por ejemplo, sería importante genotipificar los individuos dentro de los cuadrantes y

seleccionar áreas diversas y pobres en diversidad genética y en número de genets presentes. Un proceso muy costoso y laborioso.

En un contexto práctico, la aplicación de técnicas moleculares para la conservación en poblaciones de *Thalassia testudinum* se resumiría en:

- A. Asignar las poblaciones clave (genéticamente o genotípicamente más diversas) para la conservación, realizando una prospección de la diversidad genética local o general.
- B. Si un trasplante de *T. testudinum* fuera requerido, seleccionar las poblaciones genéticamente o genotípicamente más diversas como poblaciones donantes.
- C. Para evaluar el éxito del trasplante, monitorear la diversidad genética del trasplante en el transcurso del tiempo y evaluar si el crecimiento es por extensión vegetativa o por reproducción sexual.

En el caso de un "rescate" de una población, la preocupación más grande sería evitar que se genere una erosión genética en la población receptora por una falta de diversidad genotípica de la población donante y como consecuencia, un mal desempeño de la población receptora y un fracaso del proyecto. La prospección de posibles poblaciones donantes con marcadores genéticos no revelaría directamente cual sería la población más adecuada en relación al crecimiento, tolerancia o adaptación a nuevos ambientes, pero por lo menos permitiría seleccionar la población inicial más numerosa en genets. Los costos iniciales de este tipo de prospección son altos, pero las probabilidades de éxito serían mayores.

Otra aplicación importante para las investigaciones de *T. testudinum* en general es la relevancia de conocer la diversidad genética de las poblaciones con que se está trabajando, principalmente para evitar la pseudo-replicación del muestreo. Es muy común que cuando se estudia el efecto de un factor ambiental o contaminante *in situ*, se considera que el experimento

consiste de muchas réplicas, esto se realiza seleccionando ramets en diferentes zonas. Sin embargo, si el estudio es realizado dentro de una población muy clonal, la probabilidad de muestrear varias veces el mismo genet y realizar las observaciones de interés dentro de un mismo individuo genético, y asumiendo que sean diferentes, los resultados podrán ser erróneos por comparar varias veces lo mismo. Una área donde se han realizado un gran número de estudios con *T. testudinum* es en la Laguna Madre y los resultados del estudio actual indican que no es una población genéticamente representativa para la especie y lo mismo se podría concluir de las poblaciones de Bermuda.

Contribuciones del presente estudio

Las contribuciones más importantes para el conocimiento de *Thalassia testudinum* como especie podrían resumirse en:

- A. Existe una alta diversidad genética en *T. testudinum*, atribuida en la mayor parte (80%) a la variabilidad dentro de las mismas poblaciones y únicamente el 20% de la diversidad se atribuyó a diferencias inter-poblacionales
- B. Existe una alta conectividad entre las poblaciones y la estructura genética fue relativamente baja para toda el área de distribución. Con respecto a las diferencias genéticas entre las poblaciones, los niveles de diferenciación genética no están relacionados directamente a la distancia, especialmente si se eliminan las poblaciones aisladas.
- C. No se encontró una conectividad genética relacionada con los patrones de circulación de las corrientes principales del Caribe y el Golfo de México, lo que se puede interpretar como una evidencia de transporte de los frutos a larga distancia pero de forma aleatoria y multi-direccional. Es muy probable que sí exista un transporte a larga distancia a favor de las corrientes principales, pero el efecto de este transporte uni-direccional es homogenizado por

un transporte dominante a cortas distancias cercana a la costa y en ocasiones en dirección opuesta.

- D. Se mostró que *Thalassia testudinum* puede formar genets muy grandes en tamaño y probablemente muy longevos (cientos de años de edad), una característica que no es única para el pasto marino *T. testudinum*. Los altos niveles de clonalidad en los pastos marinos no son necesariamente indicadores de una baja diversidad genética, y hasta la fecha, la alta clonalidad se podría considerar como una característica intrínseca de las especies perennes de este grupo ecológico.
- E. Los resultados de la diversidad genotípica y la distribución tan homogénea de la variación genética, indican que la reproducción sexual juega un papel importante en la dinámica poblacional de *Thalassia testudinum*. Esta reproducción se podría considerar como una estrategia de mantenimiento de la diversidad genética y de colonización. Pero a nivel local, los modelos demográficos de los ramets han demostrado que, para el mantenimiento de las poblaciones, la multiplicación por reproducción sexual no es esencial para muchos pastos marinos (Kenworthy *et al.* 1998; Marbà *et al.* 1996; Vermaat *et al.* 1995), entre ellos *Thalassia testudinum* (Van Tussenbroek *et al.* 2006; Van Tussenbroek 2002; Van Tussenbroek 2000). Las poblaciones se mantienen por medio de la proliferación vegetativa y la contribución de nuevos ramets por establecimiento de semillas es muy baja. El trabajo de Quamen y Onuf (1993) demuestra la importancia en la colonización de áreas nuevas por medio de frutos y semillas, y determinaron que las poblaciones de *T. testudinum* en la Laguna Madre se extendieron con una velocidad que sobrepasa el crecimiento clonal durante las últimas décadas y que únicamente puede ser atribuida a la dispersión por propágulos sexuales. En estudios anteriores se ha comprobado que la reproducción sexual de *T. testudinum* puede ser elevada (Jiménez Durán 2004; Kaldy *et al.* 1999; Durako *et al.* 1985;

datos no publicados Lab. Botánica Marina), pero el establecimiento de juveniles en poblaciones estables es muy bajo, lo que se debe probablemente a la falta de competitividad (aprovechamiento de luz o nutrientes) de las plántulas con las plantas adultas. Pero si se toma en cuenta el número de semillas generadas o el número de plántulas que botaron en un ambiente adecuado por un genet grande (cientos o miles de haces reproductivos por año) la probabilidad de una reproducción exitosa puede ser considerable, más si se considera que la planta puede alcanzar cientos a miles de años.

CAPITULO 6

RESULTADOS MÁS IMPORTANTES Y SUGERENCIAS

Los resultados más importantes del estudio genético poblacional de *Thalassia testudinum*:

- Se aislaron 14 microsatélites polimórficos específicos para esta especie de pasto marino.
- Los 6 microsatélites utilizados resultaron ser lo suficientemente diversos para identificar los genets únicos en la mayoría de los casos.
- *Thalassia testudinum* resultó ser genéticamente más diversa que lo estimado previamente con otros marcadores.
- El muestreo “híbrido” a diferentes niveles de escala, permitió una estimación de los tamaños y las edades de los genets, al mismo tiempo de obtener datos de su estructuración genética a escala geográfica.
- *Thalassia testudinum* puede alcanzar tamaños muy grandes, con edades estimadas de decenas a cientos de años.
- *Thalassia testudinum* tiene una alta diversidad genética, la cual se encontró principalmente dentro de las poblaciones. La diversidad resultó estar homogéneamente distribuida a lo largo de su área de distribución.
- Las poblaciones estudiadas de *T. testudinum* mostraron una ligera a moderada estructuración genética en su área de distribución. A nivel de flujo genético, no se encontraron barreras físicas que impidan la dispersión genética, con excepción de sistemas muy aislados como La Laguna Madre, y Bermuda, EUA.

CAPITULO 6. Resultados Más Importantes y Sugerencias.

- Poblaciones vinculadas por una línea de costa (por ejemplo las costas occidentales de México) mostraron una relación ligera, pero significativa, entre distancia geográfica y distancia genética (Aislamiento genética por Distancia o IBD por sus siglas en Inglés).
- La diversidad genética de *T. testudinum* fue mayor en el centro del área de distribución geográfica (México, Belice) y disminuyó hacia los extremos, como se observó en Bermuda, Tobago y La Laguna Madre.
- La dispersión de genes de *T. testudinum* es principalmente costera y generalmente ocurre a distancias cortas (de pocos kilómetros). Por ello, hay una escasa pero significativa dispersión a larga distancia, que se refleja en la baja estructuración genética de esta especie en toda su área de distribución.
- La diversidad genotípica o clonal fue mayor en el Caribe Mexicano que en el Golfo de México mexicano.
- Dentro de las praderas, la distribución de los genets fue mixta y hay una diversidad genotípica alta. Genets con diferentes genotipos se encuentran dentro de la misma vecindad.

Sugerencias para futuros trabajos con *Thalassia testudinum*:

- Se debe optimizar los protocolos de los microsatélites desarrollados y no utilizados en el presente estudio.
- Descartar el microsatélite TTMS-GA6 de futuros trabajos, por no amplificar correctamente en todas las ocasiones, y por tener un déficit significativo de heterocigotos.
- El microsatélite TTMS-GT112 es polimórfico sólo para 3 alelos que se distribuyen sobre toda el área de distribución de *T. testudinum*. Se recomienda usar otro locus, de esta manera se obtendría más información por el mismo esfuerzo y costo.
- Un aumento de 2-3 microsatélites en las poblaciones extremas, genéticamente más pobres, aumentó el número de genets, por eso se recomienda utilizar al menos 8 microsatélites en futuros trabajos. Los microsatélites ya funcionales y con información valiosa agregados *a posteriori* fueron TTMS-GA77 y ThMS1.
- Para futuros trabajos de comparación de diversidad genética entre poblaciones se recomienda un muestreo con intervalos de distancias más grandes, ya que los genets fueron más grandes que el transecto utilizado.
- La determinación de la diversidad genética fue realizada con poblaciones muy costeras. Se recomienda comparar la diversidad genética y clonal de las poblaciones costeras con las de poblaciones más profundas, con un enfoque a las poblaciones del Golfo de México.
- Para poder determinar con más precisión la conectividad y la estructuración en el Caribe y el Golfo de México se deberían analizar más poblaciones. El muestreo de los ramets no necesariamente necesitaría ser muy preciso, pero si distribuidos sobre una gran superficie. De esta manera se evitaría el doble muestreo de los mismos genets y se obtendría una muestra

más representativa de la población, ya que la diversidad de las poblaciones está repartida de manera homogénea sobre grandes áreas.

- Para definir bien el vecindario genético (genetic neighborhood N_b) se debería realizar un muestreo más intenso dentro de una población y realizar un análisis de autocorrelación. El tipo de muestreo sería en un cuadrante (p.e. 50 x 50 m) con un alto número de ramets (> 100) referenciadas por coordenadas X y Y. Se recomendaría realizar un muestreo en el Caribe y el Golfo de México, ya que las condiciones ambientales son diferentes.
- Es necesario realizar un estudio sobre la diversidad genotípica y su relación con el medio ambiente. Los datos indican que hay una relación con el tipo de sedimento y/o la hidrodinámica local. El tipo de muestreo sería similar al arriba mencionado.
- Para determinar si los juveniles de *T. testudinum* están bajo presión selectiva, se recomienda realizar un estudio que compare la diversidad genética (Heterocigosidad esperada H_E y observada H_O) de las plántulas de *T. testudinum*, con la población natural de donde originaron.
- Se recomienda realizar un estudio de apomixis, y comparar los genotipos de las plántulas con los de la planta madre. Estudios preliminares histológicos indican que podría existir este tipo de reproducción.
- Se recomienda realizar un estudio de dispersión de propágulos flotantes a una escala de 10 días de flotación (decenas a cientos de km) para las áreas costeras del Caribe y el Golfo de México, ya que hay muy poca información sobre la dispersión de agua en los primeros cm de la superficie marina.
- Es importante analizar si la dispersión de genes es únicamente por frutos, consecuencia de la reproducción sexual, y averiguar si hay transporte de genes por medio de fragmentos de *T. testudinum* que se reestablecen.

- *Thalassia testudinum* es una angiosperma marina con una alta tasa de reproducción sexual. Para descifrar el porqué de esta gran inversión de energía, se recomienda realizar un estudio sobre la tasa de la reproducción efectiva. Este estudio integraría el éxito de: la fecundación, la dispersión local, la dispersión a larga distancia, el establecimiento y la sobrevivencia a adulto. Este estudio debería de tomar en cuenta todas las etapas en donde hay pérdida de frutos, como son; la pérdida de semillas por llegar a tierra firme, la pérdida de semillas en el océano abierto y la pérdida de flores y frutos por herbivoría de peces y crustáceos.
- El estudio actual es una muy buena base para iniciar estudios relacionados con la interacción de individuos genéticos con el medio ambiente (luz, nutrientes, otras especies de pastos marinos, algas, herbivoría, etc.) o estudios relacionados en la competencia intra-específica.
- Los microsatélites pueden ser una herramienta muy potente para la conservación y el manejo de los pastizales de *Thalassia testudinum*. Se recomienda realizar estudios relacionados con la recuperación de pastizales (por medio de la extensión y reproducción sexual natural) y estudios relacionados con la recuperación de pastizales por medio de trasplantes y comparar el desempeño de los trasplantes relacionado a sus niveles de diversidad genética.

LITERATURA CITADA

- Alberte RS, Suba GK, Procaccini G, Zimmerman RC, Fain SR (1994) Assessment of genetic diversity of seagrass populations using DNA fingerprinting: Implications for population stability and management. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 1049-1053.
- Alberto F, Correia L, Arnaud-Haond S *et al.* (2003a) New microsatellite markers for the endemic Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*. *Molecular Ecology Notes*, **3**, 253-255.
- Alberto F, Correia L, Billot C, Duarte CM, Serrão E (2003b) Isolation and characterization of microsatellite markers for the seagrass *Cymodocea nodosa*. *Molecular Ecology Notes*, **3**, 397-399.
- Alberto F, Arnaud-Haond S, Duarte CM, Serrão EA (2006) Genetic diversity of a clonal angiosperm near its range limit: the case of *Cymodocea nodosa* at the Canary Island. *Marine Ecology Progress Series*, **309**, 117-129.
- Alberto F, Gouveia L, Arnaud-Haond S *et al.* (2005) Within-population spatial genetic structure, neighbourhood size and clonal subrange in the seagrass *Cymodocea nodosa*. *Molecular Ecology*, **14**, 2669-2681.
- Andrade CA (2000) Eddy development and motion in the Caribbean Sea. *Journal of Geophysical Research*, **105**, 26.191-26.201.
- Arbeláez-Cortés E, Castillo-Cárdenas MF, Toro-Perea N, Cárdenas-Henao H (2007) Genetic structure of the red mangrove (*Rhizophora mangle* L.) on the Colombian Pacific detected by microsatellite molecular markers. *Hydrobiologia*, **583**, 321-330.
- Arens P, Durka W, Wernke-Lenting JH, Smulders MJM (2004) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Geum urbanum* (Rosaceae) and their transferability within the genus *Geum*. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 209-212.
- Arens P, Van't Westende W, Bugter R, Smulders MJM, Vosman B (2000) Microsatellite markers for the European tree frog *Hyda arborea*. *Molecular Ecology*, **9**, 1944-1946.

Literatura Citada.

- Arnaud-Haond S, Alberto F, Teixeira S *et al.* (2005) Assessing genetic diversity in clonal organisms: Low diversity or low resolution? Combining power and cost efficiency in selecting markers. *Journal of Heredity*, **96**, 434-440.
- Arnaud-Haond S, Duarte CM, Alberto F, Serrão EA (2007a) Standardizing methods to address clonality in population studies. *Molecular Ecology*, **16**, 5115-5139.
- Arnaud-Haond S, Belkhir K (2007) GENCLONE: a computer program to analyse genotypic data, test for clonality and describe spatial clonal organization. *Molecular Ecology Notes*, **7**, 15-17.
- Arnaud-Haond S, Migliaccio M, Diaz-Almeda E *et al.* (2007b) Vicariance patterns in the Mediterranean Sea: east-west cleavage and low dispersal in the endemic seagrass *Posidonia oceanica*. *Journal of Biogeography*, **34**, 963-976.
- Back W (1985) Hydrogeology of the Yucatan. In: *Geology and hydrology of the Yucatan and quaternary geology of Northeastern Yucatan peninsula* pp. 99-124. New Orleans Geological Society.
- Balestri E, Cinelli F (2003) Sexual reproductive success in *Posidonia oceanica*. *Aquatic Botany*, **75**, 21-32.
- Barrett SCH (2002) Sexual interference of the floral kind. *Heredity*, **88**, 154-159.
- Billingham MR, Reusch TBH, Alberto F, Serrão EA (2003) Is asexual reproduction more important at geographical limits? A genetic study of the seagrass *Zostera marina* in the Ria Formosa, Portugal. *Marine Ecology Progress Series*, **265**, 77-83.
- Bohonak AJ (2002) IBD (Isolation By Distance): a program for analyses of isolation by distance. *Journal of Heredity*, 153-154.
- Bruford MW, Wayne RK (1993) Microsatellites and their application to population genetic studies. *Genomes and Evolution*, **3**, 939-943.
- Cambridge ML, Carstairs SA, Kuo J (1983) An unusual method of vegetative propagation in Australian Zosteraceae. *Aquatic Botany*, **15**, 201-203.

Literatura Citada.

- Cebrián J, Duarte CM (2001) Detrital stocks and dynamics of the seagrass *Posidonia oceanica* (L.) Delile in the Spanish Mediterranean. *Aquatic Botany*, **70**, 295-309.
- Chambers JC, MacMahon JA (1994) A day in the life of a seed: movements and fates of seeds and their implications for natural and managed systems. *Ecology*, **83**, 3319-3330.
- Clark-Tapia R, Alfonso-Corrado C, Eguiarte LE, Molina-Freaner F (2005) Clonal diversity and distribution in the *Stenocercus eruca* (Cataceae), a narrow endemic cactus of the Sonoran desert. *American Journal of Botany*, **92**, 272-278.
- Clarke PJ (1993) Dispersal of grey mangrove (*Avicennia marina*) propagules in southeastern Australia. *Aquatic Botany*, **45**, 195-204.
- Cox PA (1983) Search theory, random motion, and the convergent evolution of pollen and spore morphology in aquatic plants. *The American Naturalist*, **121**, 9-31.
- Cox PA, Humphries CJ (1993) Hydrophilous pollination and breeding system evolution in seagrasses: a phylogenetic approach to the evolutionary ecology of the Cymodoceaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **113**, 217-226.
- Cox PA, Tomlinson PB (1988) Pollination ecology of a seagrass, *Thalassia testudinum* (hydrocharitaceae), in St. Croix. *American Journal of Botany*, **75**, 958-965.
- Coyer JA (2004) Characterization of microsatellite loci in the dwarf eelgrass *Zostera noltii* (Zosteraceae) and cross-reactivity with *Z. japonica*. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 497-499.
- Coyer JA, Diekmann OE, Serrão EA *et al.* (2004) Population genetics of dwarf eelgrass *Zostera noltii* throughout its biogeographic range. *Marine Ecology Progress Series*, **281**, 51-62.
- Creed JC, Phillips RC, Van Tussenbroek BI (2003) Seagrasses of the Caribbean. In: *World atlas of seagrasses* (eds. Green EP, Short FT), pp. 234-242. University of California Press, Berkeley, USA.
- Creste S, Tulmann Neto A, Figueira A (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequence gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, **19**, 299-306.

Literatura Citada.

- Davis JL, Childers DL, Kuhn DN (1999) Clonal variation in a Florida Bay *Thalassia testudinum* meadow: molecular genetic assessment of population structure. *Marine Ecology Progress Series*, **186**, 127-136.
- Den Hartog C (1970) *The sea-grasses of the world*. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, London, 275 pp.
- Den Hartog C (1987) "Wasting disease" and other dynamic phenomena in *Zostera* beds. *Aquatic Botany*, **27**, 3-14.
- Den Hartog C, Kuo J (2006) The taxonomy of seagrasses. In: *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation* (eds. Larkum AWD, Orth RJ, Duarte CM), pp. 1-23. Springer, Dordrecht.
- Di Carlo G, Badalamenti F, Jensen AC, Koch EW, Riggio S (2005) Colonisation process of vegetative fragments of *Posidonia oceanica* (L.) Delile on rubble mounds. *Marine Biology*, 1-61.
- Diekmann OE, Coyer JA, Ferreira J *et al.* (2005) Population genetics of *Zostera noltii* along the west Iberian coast: consequences of small population size, habitat discontinuity and near-shore currents. *Marine Ecology Progress Series*, **290**, 89-96.
- Dodd RS, Afzal-Rafii Z, Kashani N, Budrick J (2002) Land barrier and open oceans: effects on gene diversity and population structure in *Avicennia germinans* L. (Avicenniaceae). *Molecular Ecology*, **11**, 1327-1338.
- Doyle JJ, Doyle JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**, 3-5. 1991.
- Durako MJ, Moffler MD (1985) Observations on the reproductive ecology of *Thalassia testudinum* (Hydrocharitaceae). III Spatial and temporal variations in reproductive patterns within a seagrass bed. *Aquatic Botany*, **22**, 265-276.
- Eckert CG, Lui K, Bronson K, Corradini P, Bruneau A (2003) Population genetic consequences of extreme variation in sexual and clonal reproduction in an aquatic plant. *Molecular Ecology*, **12**, 331-344.
- Elmqvist T, Cox PA (1996) The evolution of vivipary flowering plants. *OIKOS*, **77**, 3-9.

Literatura Citada.

- Enriques S, Van Tussenbroek BI, Duarte CM, Reyes-Zavala G (2001) Effects of seagrass *Thalassia testudinum* on sediment redox. *Marine Ecology Progress Series*, **219**, 149-158.
- Espinoza-Avalos J (1996) Distribution of seagrasses in the Yucatan peninsula, Mexico. *Bulletin of Marine Science*, **59**, 449-454.
- Evanno G, Regaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, **14**, 2611-2620.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**, 47-50.
- Flowers JM, Schroeter SC, Burton RS (2002) The recruitment sweepstakes has many winners: Genetic evidence from the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Evolution*, **56**, 1445-1453.
- Fain SR, DeTomaso A, Alberte RS (1992) Characterization of disjunct populations of *Zostera marina* (eelgrass) from California: genetic differences resolved by restriction-fragment length polymorphism. *Marine Biology*, **112**, 683-689.
- Fratantoni DM (2005) North Atlantic surface circulation during the 1990's observed with satellite-tracked drifters. *Journal of Geophysical Research*, **106**, 22.067-22.093.
- Fu L, Holt B (1983) Some examples of detection of oceanic mesoscale eddies by the SEASAT synthetic-aperture radar. *Journal of Geophysical Research*, **88**, 1844-1852.
- Gallegos ME, Merino M, Marbà N, Duarte CM (1993) Biomass and dynamics of *Thalassia testudinum* in the Mexican Caribbean: elucidating rhizome growth. *Marine Ecology Progress Series*, **95**, 185-192.
- Glaubitz JC (2004) COVERT: A user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 309-310.

Literatura Citada.

- Gobert S, Cambridge ML, Velimirov B *et al.* (2006) *Biology of Posidonia.*, 2nd edn. Springer, Dordrecht, 387-408.
- Goldstein DB, Schlötterer C (1999) *Microsatellites. Evolution and Applications.* Oxford University Press, Oxford, 352 pp.
- Goudet J (1995) FSTAT (vers. 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, **86**, 485-486.
- Goudet J. *FSTAT. A computer program to calculate F-statistics, estimate and test gene diversities and fixation indices.* Version 2.9.3.2 Update from Goudet 1995. 2002.
- Green EP, Short FT (2003) *World atlas of seagrasses*, Prepared by the UNEP World Conservation Monitoring Centre edn. University of California Press, Berkley, USA, 298 pp.
- Grimsby JL, Tsirelson D, Gammon MA, Kesseli R (2007) Genetic diversity and clonal vs. sexual reproduction in *Fallopia spp.* (Polygonaceae). *American Journal of Botany*, **94**, 957-964.
- Guo SW, Thompson EA (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics*, **48**, 361-372.
- Gyory J, Mariano AJ, Ryan EH. "The Loop Current." Ocean Surface Currents. CIMAS . 2005a.
- Gyory J, Mariano AJ, Ryan EH. "The Caribbean Current." Ocean Surface Currents. CIMAS . 2005b.
- Hammerstrom KK, Kenworthy WJ (2003) A new method for estimation of *Halophila dicipiens* Ostenfeld seed banks using density separation. *Aquatic Botany*, **76**, 79-86.
- Hanski I (1998) Metapopulation dynamics. *Nature*, **396**, 41-49.
- Hanski I (1999) *Metapopulation Ecology.* Oxford University Press, New York, 313 pp.
- Harper JL (1990) *Population Biology of Plants.* Academic Press, London, 892 pp.

Literatura Citada.

- Hedgecock D (1994) Does variance in reproductive success limit effective population size of marine organisms. In: Genetics and evolution of aquatic organisms. (ed. Beaumont A), pp. pp 122-134. Chapman and Hall, London.
- Harwell MC, Orth RJ (2002) Long-distance dispersal potential in a marine macrophyte. *Ecology*, **83**, 3319-3330.
- Heck KL Jr, Hays G, Orth RJ (2003) Critical evaluation of the nursery role hypothesis for seagrass meadows. *Marine Ecology Progress Series*, **253**, 123-136.
- Herzka SZ, Dunton KH (1997) Seasonal photosynthetic patterns of the seagrass *Thalassia testudinum* in the western Gulf of Mexico. *Marine Ecology Progress Series*, **152**, 103-117.
- Hughes AR, Stachowicz JJ (2004) Genetic diversity enhances the resistance of a seagrass ecosystem to disturbance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 8998-9002.
- Inglis GJ (2000) Disturbance-related germination of *Halodule wrightii* seeds. *Biologia Marina Mediterranea*, **7**, 63-66.
- Jackson JBC, Buss LW, Cook RE (1985) *Population biology and evolution of clonal organisms*. Yale University Press, New Haven and London, 530 pp.
- Jarne P, Lagoda PJJ (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*, **11**, 424-429.
- Jiménez Durán K (2004) *Desarrollo y dispersión de frutos y semillas de Thalassia testudinum Banks ex König (Hydrocharitaceae)*. **Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.**
- Kaldy JE, Dunton KH (1999) Ontogenic photosynthetic changes, dispersal and survival of *Thalassia testudinum* (turtle grass) seedlings in a sub-tropical lagoon. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **240**, 193-212.
- Kalinowski ST (2004) Counting alleles with rarefaction: private alleles and hierarchical sampling designs. *Conservation Genetics*, **5**, 539-543.

Literatura Citada.

- Kalinowski ST (2002) Evolutionary and statistical properties of three genetic distances. *Molecular Ecology*, **11**, 1263-1273.
- Kalinowski ST (2005) HP-RARE 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Molecular Ecology*, **5**, 187-189.
- Karagyozov L, Kalcheva ID, Chapman VM (1993) Construction of random small-insert genomic libraries highly enriched for simple sequence repeats. *Nucleic Acids Research*, **21**, 3911-3912.
- Keddy CJ, Patriquin DG (1978) An annual form of eelgrass in Nova Scotia. *Aquatic Botany*, **16**, 163-170.
- Kenworthy WJ, Schwarzschild AC (1998) Vertical growth and short-shoot demography of *Syringodium filiforme* in outer Florida Bay, USA. *Marine Ecology Progress Series*, **173**, 25-37.
- Kenworthy WJ, Wyllie-Echeveria S, Coles RG, Pergent G, Pergent-Martini C (2006) *Seagrass conservation biology*, 2nd edn. Springer, Dordrecht, 595-623.
- Kinlan BP, Gaines SD (2003) Propagule dispersal in marine and terrestrial environments: A community perspectives. *Ecology*, **84**, 2007-2020.
- Kirsten JH, Dawes CJ, Cochrane BJ (1998) Random amplified polymorphism detection (RAPD) reveals high genetic diversity in *Thalassia testudinum* banks ex König (Turtlegrass). *Aquatic Botany*, **61**, 269-287.
- Klekowski EJ (2003) Plant clonality, mutation, diplontic selection and mutational meltdown. *Biological Journal of the Linnean Society*, **79**, 61-67.
- Kuc J, Cook IH, Kirkman H (1987) Observations of propagating shoots in the seagrass genus *Amphibolis* C. Agardh (Cymodoceae). *Aquatic Botany*, **27**, 291-293.
- Kuc J, Den Hartog C. Seagrasses: A profile of an ecological group. Proceedings Fourth International Seagrass Biology Workshop. *Biologia Marina Mediterranea* **7**, 3-17. 2000.

Literatura Citada.

- Lacap CDA, Vermaat JE, Rollon RN, Nacorda HM (2002) Propagule dispersal of the SE Asian seagrasses *Enhalus acoroides* and *Thalassia hemprichii*. *Marine Ecology Progress Series*, **235**, 75-80.
- Lande R (1988) Genetics and demography in biological conservation. *Science*, **241**, 1455-1460.
- Larkin P, Quevedo E, Salinas S *et al.* (2006) Genetic structure of two *Thalassia testudinum* populations from the south Texas Gulf Coast. *Aquatic Botany*, **85**, 198-202.
- Larkum AWD, Den Hartog C (1989) Evolution and biogeography of seagrasses. In: *Biology of seagrasses. A treatise on the biology of seagrasses with special reference to the Australian region.* (eds. Larkum AWD, McComb AJ, Shepherd AJ), pp. 112-156. Elsevier Science Publishing Company, New York.
- Les DH (1988) Breeding systems, population structure, and evolution in hydrophilous angiosperms. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **75**, 819-835.
- Les DH, Cleland MA, Waycott M (1997) Phylogenetic studies in Alismatidae, II: Evolution of marine angiosperms (seagrasses) and hydrophily. *Systematic Botany*, **22**, 443-463.
- Levins R (1969) Some demographic and genetic consequences of environmental heterogeneity for biological control. *Bulletin of the Entomological Society of America*, **15**, 237-240.
- Lewis RR, Phillips RC (1980) Occurrence of seeds and seedlings of *Thalassia testudinum* Banks ex König in the Florida Keys (USA). *Aquatic Botany*, **9**, 377-380.
- Lincoln RJ, Boxshall GA, Clark PF (1998) *A dictionary of ecology, evolution and systematics*, 2 edn. Cambridge University Press, 361 pp.
- Loreau M, Naeem S, Inchausti P *et al.* (2001) Biodiversity and ecosystem functioning: Current knowledge and future challenges. *Science*, **294**, 804-808.
- Maguire TL, Saenger P, Baverstock P, Henry R (2000) Microsatellite analysis of genetic structure in the mangrove species *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (Avicenniaceae). *Molecular Ecology*, **9**, 1853-1862.

Literatura Citada.

- Marbà N, Duarte CM (1998) Rhizome elongation and seagrass clonal growth. *Marine Ecology Progress Series*, 174, 269-280.
- Marbà N, Duarte CM, Cebrián J *et al.* (1996) Growth and population dynamics of *Posidonia oceanica* on the Spanish Mediterranean coast: elucidating seagrass decline. *Marine Ecology Progress Series*, 137, 203-213.
- McMahon K (2005) *Recovery of subtropical seagrasses from natural disturbances*. The University of Queensland, Australia.
- McRoy CP, Helfferich C (1977) *Seagrass ecosystems : a scientific perspective*. Marcel Dekker, New York, 51 pp.
- Merino Ibarra M (1986) Aspectos de la circulación costera superficial del Caribe Mexicano con base en observaciones utilizando tarjetas de deriva. *ANALES DEL INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGIA*, <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/cienciasdelmar/instituto/1986-2/articulo216.html>.
- Merino Ibarra M, Otero Dávalos L (1991) *Atlas ambiental costero. Puerto Morelos - Quintana Roo* Mexico, 79 pp.
- Merino M, Enríques S, Strasses RJ, Iglesias-Prieto R (1995) Spatial and diurnal variations in the photosynthetic activity of the tropical seagrass *Thalassia testudinum*. In: *Photosynthesis: From Light to Biosphere - Proceedings of the Xth International Photosynthesis Congress, Montpellier, France, 20-25 August 1995* (ed. Mathis P), pp. 889-892. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Molinari RL, Spillane M, Brooks I, Atwood D, Duckett C (1981) Surface current in the Caribbean Sea as deduced from Lagrangian observations. *Journal of Geophysical Research*, 86, 6537-6542.
- Muñiz-Salazar R, Talbot SL, Sage GK, Ward DH, Cabello-Pasini A (2006) Genetic structure of eelgrass *Zostera marina* meadows in an embayment with restricted water flow. *Marine Ecology Progress Series*, 309, 107-116.
- Muñiz-Salazar R, Talbot SL, Sage GK, Ward DH, Cabello-Pasini A (2007) Genetic structure of eelgrass *Zostera marina* meadows in an embayment with restricted water flow. *Marine Ecology Progress Series*, 309, 107-116.

Literatura Citada.

- Muñiz-Salazar R, Talbot SL, Sage GK, Ward DH, Cabello-Pasini A (2005) Population genetic structure of annual and perennial populations of *Zostera marina* L. along the Pacific coast of Baja California and the Gulf of California. *Molecular Ecology*, **14**, 711-722.
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **70**, 3321-3323.
- Nei M, Tajima F, Tateno Y (1983) Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution*, **19**, 153-170.
- NOAA. National Hurricane Center. <http://www.nhc.noaa.gov/> .
- Núñez-Farfán J, Domínguez CA, Eguiarte LE *et al.* (2002) Genetic divergence among Mexican populations of red mangrove (*Rhizophora mangle*): geographic and historic effects. *Evolutionary Ecology Research*, **4**, 1049-1064.
- Ochoa J, Candela J, Badan A, Sheinbaum J (2005) Ageostrophic fluctuations in Cozumel Channel. *Journal of Geophysical Research*, **110**.
- Olsen JL, Stam WT, Coyer JA *et al.* (2004) North Atlantic phylogeography and large-scale population differentiation of the seagrass *Zostera marina* L. *Molecular Ecology*, **13**, 1923-1941.
- Onuf CP, Phillips JC, Moncreiff CA, Raz-Guzman A, Herrera-Silveira JA (2003) The seagrasses of the Gulf of Mexico. In: *World atlas of seagrasses* (eds. Green E, Short F), pp. 224-233. University of California Press, Berkley, USA.
- Orpurt PA, Boral LL (1964) The flower, fruits, and seeds of *Thalassia testudinum* Koenig. *Bulletin of Marine Science of the Gulf and Caribbean*, **14**, 296-302.
- Orth RJ, Carruthers TJB, Dennison WC *et al.* (2006a) A Global crisis for seagrass ecosystems. *BioScience*, **56**, 987-996.
- Orth RJ, Harwell MC, Inglis GJ (2006b) Ecology of seagrasses seeds and dispersal strategies. In: *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation* (eds. Larkum AWD, Orth RJ, Duarte CM), pp. 111-133. Springer, Dordrecht, The Netherlands.

Literatura Citada.

- Orth RJ, Luckenbach M, Moore KA (1994) Seed dispersal in a marine macrophyte: implications for colonization and restoration. *Ecology*, **75**, 1927-1939.
- Ota T. DISPAN (Genetic Distance and Phylogenetic Analysis). 1993. Pensilvania State University PA.
- Ouborg NJ, Piquot Y, Van Groenendael JM (1999) Population genetics, molecular markers and the study of dispersal plants. *Journal of Ecology*, **87**, 551-568.
- Palumbi SR (2003) Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecological Applications*, **13**, S146-S158.
- Parks JC, Werth CR (1993) A study of spatial features of clones in population of Bracken Fern, *Pteridium aquilinum* (Dennstaedtiaceae). *American Journal of Botany*, **80**, 537-544.
- Peakall R, Smouse PE. GenAEx V5: Genetic Analysis in Excel. 1-29. 2001.
- Phillips RC, Menez EG (1988) *Seagrasses*, Smithsonian Contr. Mar. Sci. 34 edn. Smithsonian Institution Press, Washington, DC.
- Pointer IR, Walker DI, Coles RG (1989) Regional studies – seagrasses of tropical Australia. In: *Biology of seagrasses. A treatise on the biology of seagrasses with special reference to the Australian region* (eds. Larkum AWD, McComb AJ, Shepherd SA), pp. 279-303. Elsevier, New York.
- Pritchard JK, Wen W. *Documentation for STRUCTURE software: Versio 2.1* 2003.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945-959.
- Procaccini G, Mazzella L (1998a) Population genetic structure and gene flow in the seagrass *Posidonia oceanica* assessed using microsatellite analysis. *Marine Ecology Progress Series*, **169**, 133-141.
- Procaccini G, Orsini L, Ruggiero MV. Genetic structure and distribution of microsatellite diversity in *Posidonia oceanica*. Proceedings Fourth International Seagrass Biology Workshop. *Biologia Marina Mediterranea* 7, 115-118. 2000.

Literatura Citada.

- Procaccini G, Piazzì L (2001) Genetic polymorphism and transplantation success in the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*. *Restoration Ecology*, **9**, 332-338.
- Procaccini G, Waycott M (1998) Microsatellite loci identified in the seagrass *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *The Journal of Heredity*, **89**, 562-568.
- Procaccini G, Alberte RS, Mazzella L (1996a) Genetic structure of the seagrass *Posidonia oceanica* in the Western Mediterranean: ecological implications. *Marine Ecology Progress Series*, **140**, 153-160.
- Procaccini G, Mazzella L (1996b) Genetic variability and reproduction in two Mediterranean seagrasses. *Seagrass Biology: Proceedings of an International Workshop*, 85-92.
- Procaccini G, Olsen JL, Reusch TBH (2007) Contribution of genetics and genomics to seagrass biology and conservation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **350**, 234-259.
- Quamenn ML, Onuf CP (1993) Laguna Madre: Seagrass changes continue decades after salinity reduction. *Estuaries*, **16**, 302-310.
- Rabinowitz D (1978) Dispersal properties of mangrove propagules. *Biotropica*, **10**, 47-57.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (Version 3.4): a population genetics software for exact test and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**, 248-249.
- Reusch TBH (2000) Five microsatellite loci in eelgrass *Zostera marina* and a test of cross-species amplification in *Z. noltii* and *Z. japonica*. *Molecular Ecology*, **9**, 371-373.
- Reusch TBH, Stam WT, Olsen JL (1998) Size and estimate age of genetes in eelgrass, *Zostera marina*, assessed with microsatellite markers. *Marine Biology*, **133**, 519-525.
- Reusch TBH, Stam WT, Olsen JL (2000) A microsatellite-based estimation of clonal diversity and population subdivision in *Zostera marina*, a marine flowering plant. *Molecular Ecology*, **9**, 127-140.

Literatura Citada.

- Reusch TBH (2002) Microsatellites reveal high population connectivity in eelgrass (*Zostera marina*) in two contrasting coastal areas. *Limnology and Oceanography*, **47**, 78-85.
- Reusch TBH, Borström C, Stam WT, Olsen JL (1999a) An ancient eelgrass clone in the Baltic. *Marine Ecology Progress Series*, **183**, 301-304.
- Reusch TBH, Chapman ARO (1995) Storm effects on eelgrass (*Zostera marina* L.) and blue mussel (*Mytilus edulis* L.) beds. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **192**, 257-271.
- Reusch TBH, Ehlers A, Hämmerli A, Worm B (2005) Ecosystem recovery after climatic extremes enhanced by genotypic diversity. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **102**, 2826-2831.
- Reusch TBH, Hughes AR (2006) Perspective in estuarine and coastal science. The emerging role of genetic diversity for ecosystem functioning: Estuarine macrophytes as models. *Estuaries and Coasts*, **29**, 159-164.
- Reusch TBH, Stam WT, Olsen JL (1999b) Microsatellite loci in eelgrass *Zostera marina* reveal marked polymorphism within and among populations. *Molecular Ecology*, **8**, 317-321.
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, **43**, 223-225.
- Richards AJ (1986) *Plant breeding systems*. George Allen & Unwin, London, 529 pp.
- Richardson PL (2005) Caribbean Current and eddies as observed by surface drifters. *Deep-Sea Research II*, **52**, 429-463.
- Roughgarden J, Gaines SD, Possingham H (1988) Recruitment dynamics in complex life cycles. *Science*, **241**, 1460-1466.
- Rousset F (1997) Genetic differentiation and estimation of geneflow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics*, **145**, 1219-1228.

Literatura Citada.

- Rozen S, Sjaletzky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* (eds. Krawetz S, Misener S), pp. 365-386. Humana Press, Totowa, NJ.
- Ruckelshaus MH (1996) Estimation of genetic neighborhood parameters from pollen and seed dispersal in the marine angiosperm *Zostera marina* L. *Evolution*, **50**, 856-864.
- Ruggiero MV, Procaccini G (2002) Genetic identity and homozygosity in North-Adriatic populations of *Posidonia oceanica*: An ancient, post-glacial clone? *Conservation Genetics*, **3**, 71-74.
- Ruíz-Rentería F, Van Tussenbroek BI, Jordán-Dahlgren E (1998) Puerto Morelos, Quintana Roo, Mexico. In: *CARICOMP - Caribbean Coral Reef, Seagrass and Mangrove Sites* (ed. Kjerfve B), pp. 57-66. UNESCO, Paris.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining Method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**, 406-425.
- Santamaría-Gallegos NA, Sánchez-Lizaso JL, Félix-Pico EF (2000) Phenology and growth cycle of annual subtidal eelgrass in a subtropical locality. *Aquatic Botany*, **66**, 329-339.
- Schlueter MA, Guttman SI (1998) Gene flow and genetic diversity of turtle grass, *Thalassia testudinum*, banks ex König, in the lower Florida Keys. *Aquatic Botany*, **61**, 147-164.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L. Arlequin ver. 2000: A software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland. 2002.
- Serra IA, Procaccini G, Inttrieri MC *et al.* (2007) Comparison of ISSR and SSR markers for analysis of genetic diversity in the seagrass *Posidonia oceanica*. *Marine Ecology Progress Series*, **338**, 71-79.
- Siegel DA, Kinlan BP, Gaylord B, Gaines SD (2003) Lagrangian descriptions of marine larval dispersion. *Marine Ecology Progress Series*, **260**, 83-96.

Literatura Citada.

- Slatkin M (1987) Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, **236**, 787-792.
- Slatkin M (1993) Isolation by distance in equilibrium and non equilibrium populations. *Evolution*, **47**, 264-279.
- Takezaki N, Nei M (1996) Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics*, **144**, 389-399.
- Tomasko DA, Dawes CJ, Hall MO (1991) Effects of the number of short shoots and presence of the rhizome apical meristem on the survival and growth of transplanted seagrass *Thalassia testudinum*. *Contrib.Mar.Sci.*, **32**, 41-48.
- Tomlinson PB (1986) *The botany of mangroves*. Cambridge University Press, Cambridge, 419 pp.
- Tsyusko OV, Smith MH, Sharitz RR, Glenn TC (2005) Genetic and clonal diversity of two cattail species, *Typha latifolia* and *T. angustifolia* (Typhaceae), from Ukraine. *American Journal of Botany*, **92**, 1161-1169.
- UNESCO. CARICOMP - Caribbean coral reef, seagrass and mangrove sites. Coastal region and small island papers 3. xiv, 347 pp. 1998. Paris, UNESCO.
- Valentine JF, Duffy JE (2006) Grazing in seagrass ecosystems. In: *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation* (eds. Larkum AWD, Orth RJ, Duarte CM), pp. 463-501. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Van der Pijl L (1972) *Principles of dispersal in higher plants*. Springer-Verlag, Berlin, 162 pp.
- Van Dijk JK, Waycott M, Van Tussenbroek BI, Ouborg J (2007) Polymorphic microsatellite markers for the Caribbean seagrass *Thalassia testudinum* Banks ex König. *Molecular Ecology Notes*, **7**, 89-91.
- Van Lent F, Verschuure JM (1994) Intraspecific variability of *Zostera marina* L. (eelgrass) in estuaries and lagoons of the southwestern Netherlands. II. Relation with environmental factors. *Aquatic Botany*, **48**, 59-75.

Literatura Citada.

- Van Tussenbroek BI. Frequency distributions and demographical analysis of Seagrasses with special emphasis on *Thalassia testudinum* in a tropical reef lagoon. Proceedings Fourth International Seagrass Biology Workshop. *Biologia Marina Mediterranea* 7, 147-151. 2000.
- Van Tussenbroek BI (1996) Integrated growth patterns of turtle grass, *Thalassia testudinum* Banks ex König. *Aquatic Botany*, **55**, 139-144.
- Van Tussenbroek BI (1995) *Thalassia testudinum* leaf dynamics in a Mexican Caribbean coral reef lagoon. *Marine Biology*, **122**, 33-40.
- Van Tussenbroek BI, Galindo CA, Marquez J (2000) Dormancy and foliar density regulation in *Thalassia testudinum*. *Aquatic Botany*, **1441**, 1-15.
- Van Tussenbroek BI, Hermus K, Tahey T (1996) Biomass and growth of the turtle grass *Thalassia testudinum* (Banks ex König) in a shallow tropical lagoon system, in relation to tourist development. *Caribbean Journal of Science*, **32**, 357-364.
- Van Tussenbroek BI (2002) Static life-table analysis and demography of the foliar shoots of the tropical seagrass *Thalassia testudinum*. *Bulletin of Marine Science*, **71**, 1247-1256.
- Van Tussenbroek BI, Vonk JA, Stapel J *et al.* (2006b) The Biology of Thalassia: Paradigms and recent advances in research. In: *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation* (eds. Larkum AWD, Orth RJ, Duarte CM), pp. 409-439. Springer, Dordrecht.
- Van Tussenbroek BI, Wong RJG, Márquez-Guzman J (2008) Synchronized anthesis and predation on pollen in the marine angiosperm *Thalassia testudinum* (Hydrocharitaceae). *Marine Ecology Progress Series*, **354**, 119-124.
- Vermaat JE, Agawin NSR, Duarte CM *et al.* (1995) Meadow maintenance, growth and productivity of a mixed Philippine seagrass bed. *Marine Ecology Progress Series*, **124**, 215-225.
- Walker DI, Kendrick GA, McComb AJ (2006) *Decline and recovery of seagrasses.*, 2nd edn. Springer, Dordrecht, 551-565.

Literatura Citada.

- Ward DH, Brookfield M (1992) The dispersal of the coconut: did it float or was it carried to Panama? *Journal of Biogeography*, **19**, 467-480.
- Waycott M, Barnes PAG (2001) AFLP diversity within and between populations of the Caribbean seagrass *Thalassia testudinum* (Hydrocharitaceae). *Marine Biology*, **139**, 1021-1028.
- Waycott M, Les DH (2000) Current perspectives on marine angiosperm evolution. Proceedings Fourth International Seagrass Biology Workshop. *Biologia Marina Mediterranea* 7, 160-163.
- Waycott M (1995) Assessment of genetic variation and clonality in the seagrass *Posidonia australis* using RAPD and allozyme analysis. *Marine Ecology Progress Series*, **116**, 289-295.
- Waycott M, James SH, Walker DI (1997) Genetic variation within and between populations of *Posidonia australis*, a hydrophilous, clonal seagrass. *Heredity*, **79**, 408-417.
- Waycott M, Procaccini G, Les DH, Reusch TBH (2006) Seagrass genetics and Evolution. In: *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation* (eds. Larkum AWD, Orth RJ, Duarte CM), pp. 25-50. Springer, Dordrecht.
- Waycott M, Sampson JF (1997) The mating system of an hydrophilous angiosperm *Posidonia australis* (Posidoniaceae). *American Journal of Botany*, **85**, 621-625.
- Waycott M, Walker DI, James SH (1996) Genetic uniformity in *Amphibolis antarctica*, a dioecious seagrass. *Heredity*, **76**, 578-585.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**, 1358-1370.
- Weissing K, Nybom H, Wolff K, Kahl G (2005) *DNA fingerprinting in plants. Principles, methods, and applications.*, 2nd edn. CRC press, Boca Barton, 444 pp.
- Williams SL (2001) Reduced genetic diversity in eelgrass transplantations affects both population growth and individual fitness. *Ecological Applications*, **11**, 1472-1488.

Literatura Citada.

- Williams SL, Adey WH (1983) *Thalassia testudinum* Banks ex König seedling success in a coral reef microcosm. *Aquatic Botany*, **16**, 181-188.
- Williams SL, Davis CA (1996) Population genetic analysis of transplanted eelgrass (*Zostera marina*) beds reveal reduced genetic diversity in southern California. *Restoration Ecology*, **4**, 163-180.
- Williams SL, Orth RJ (1998) Genetic diversity and structure of natural transplanted eelgrass populations in the Chesapeake and Chincoteague Bays. *Estuaries*, **21**, 118-128.
- Wilson GA, Rannala B (2003) Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics*, **163**, 1177-1191.
- Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics*, **28**, 114-138.
- Zieman JC (1982) *The ecology of the seagrasses of South Florida: A community profile.*, FWS/OBS-82/25 edn. U.S. Fish and Wildlife Services, Office of Biological Services, Washington DC, 158 pp.
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1993) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, **20**, 176-183.

ANEXO 1

PROTOCOLO DE ENRIQUECIMIENTO DE MICROSATELLITES PARA LA ANGIOSPERMA MARINA *THALASSIA TESTUDINUM* Y EL DISEÑO DE PRIMERS ESPECÍFICOS.

January 2007

Protocol

Isolation of Microsatellites for *Thalassia testudinum*.

Protocol of the laboratory of the Department of Ecology, Radboud University Nijmegen, The Netherlands, under supervision of Dr. Joop Ouborg.

Modified by Jent Kornelis van Dijk for the above mentioned species.

Before starting:

Check if there are sufficient: buffers, oligo's, primers, enzymes, linkers, filter paper, etc and if there expiry date has not been exceeded.

1. Extraction of genomic DNA from target plant

This is the most important step in the whole procedure (bad DNA gives bad results)

Plant genomic DNA Isolation Protocol

Doyle and Doyle (CTAB) app 1 gr fresh material per reaction, or QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit (Best!), 4 to 5 extractions (0.1 gr fresh material per extraction or 0.02 dry)

Check DNA concentration/purity with spectrophotometer (260 - 280 nm) and view in 1% agarose gel (200 mg agarose, 20 ml buffer, 1,0 µl ethidium bromide stock concentration 10mg/ml)

Use only clean DNA, 15-20 µg at least per enrichment procedure.

2. DNA digestion

DNA must be fragmented in pieces of sizes between 300 and 1500 bp by an enzyme digestion. This is the approximate fragment- length which can be totally sequenced in one reaction. If the fragments are too big, then they can not be cloned anymore and the sequencing afterwards gives problems, if the fragments are too small then the flanking regions are not big enough to design primers. It is important to use the right enzyme (after trying several) that will give DNA fragments of the desired size. This should look in an agarose gel like a smear around the area between 300 and 1500 bp.

ANEXO 1: Protocolo de enriquecimiento de microsatélites para *Thalassia testudinum*.

A nice try are the following four enzymes: Mbo I (in R+ buffer), BglI (in O+ buffer), Alu /RSA (double digestion in Y+ buffer) and MseI (=Tru I (65°C!!), in R+ buffer). Buffer names depend on the supplier. We used MBI enzymes. It is important to check the temperature at which the enzyme works best.

Test reactions:

Preparation of test digestions. Leave reactions at least for ± 2.5 h at its optimum digestion temperature; this can be different for each enzyme

- 2 μ l DNA (app 300-500 ng) solution
- 2 μ l buffer
- 2 μ l enzyme (10 U/ μ l)
- 2 μ l MQ water
-

-Check on 1 % agarose (the total volume):

The enzyme that yielded best result for Thalassia was Mbo I. (buffer R+).

Total digestion:

Overnight large digestion with the adequate enzyme (in 200 μ l, with 10 μ l of enzyme):

- o 20 μ l R+ buffer
- o ?? μ l DNA (the approximate amount needed is >15 μ g of genomic DNA)
- o 10 μ l enzyme (10 U/ μ l)
- o Top up to 200 μ l with MQ (Milli Q water)
- Incubate overnight at 37°C in water bath.
- Check in the morning on a 1 % agarose if the digestion was complete, if not then add some more enzyme and leave for 2 hours longer to digest.

If there are some small band within the digestion, this is no problem, this happens with some restriction enzymes in certain species

Ethanol precipitation:

- Add 1/10 volume of 3M NaAc (pH 5.2) and 2x volume of ice-cold 96% ethanol.
- Put at -20°C for at least 20'
- Spin at 13000 rpm (at 4°C) for 20'
- Dispose liquid by pipetting (glass pipette with pulled tip (use Bunsen burner))
- Dry for 5' in Speed-vac
- Resuspend in 20 μ l MQ water (let stand at RT)

3. Size selection of fragmented DNA.

- Put 20 µl of size selected DNA on a 2% Agarose gel. Best is to divide DNA over different wells or by making a big well by taping 2 teeth of a comb together. (Otherwise there will be too much DNA in one well and this will block the gel.
- Put 4 µl 100 kb ruler on gel.
- Let run for 1 hour.

Size selection is done to obtain a higher success in useful DNA after the enrichment procedure. Best DNA's are of sizes between 350 – 1200 bp. Most important is to avoid small fragments, this because the PCR and the insertion in the vector selects on small DNA fragments. These are easier to amplify and to insert. Too short DNA's will make it difficult to find long enough flanking regions on the sides of the microsatellites.

Make dialysis tubes:

- Use gloves!
- Cut a piece of dialysis tube of app 10 to 20 cm.
- Fill a 2 liter beaker with:
 - 1 liter MilliQ.
 - 20 gr NaHCO₃
 - 2 ml EDTA (0.5M)
- Cook dialyze for 10' in microwave with 3 empty 1ml (blue) pipette-tips. (it takes app 10' to get buffer cooking)
- Wash dialyze tubes with MQ
- Cook tube with 3 pipette tips for 10' in MQ
- Store at 4°C in 0.5 liter demi (demineralized water) with 1 ml EDTA (0.5M)

Cut 300 –1300 bp DNA fraction out of gel.

- Use a sharp and sterile scalpel
- Work on UV light box (wear eye protection!)
- Cut agarose gel with fragmented DNA as close as possible in-between the 300 and 1300 bp.
- Wash dialysis tubes with MQ
- Put a dialysis-clip on one side of the tube
- Fill up with 400 µl 0.5 TBE buffer
- Add piece of agar with DNA fragments in dialysis tube (should be totally submerged in TBE buffer)
- Remove bubbles
- Put upper dialysis-clip
- Fill a gel running tray with new TBE buffer and add dialysis tube with agar in it. (add so that DNA can flow freely out of agar (on the negative (-) side) into the 0.5 TBE buffer (on the positive (+) side))
- Run 10 minutes on max speed
- Check on UV-transilluminator if DNA has migrated out of agar
- Put dialysis tube again in gel running tray and run for 10'' in opposite direction (DNA will stick to dialysis tube, so it will be freed)
- Remove upper dialysis-clip and squeeze agar with gloves to remove all buffer out of it
- Pipette TBE buffer with DNA fragments into 1,5 ml tube (max 400 µl). Use more than 1 tube if necessary

4. Phenol-Chloroform-Isoamylalcohol extraction and ethanol precipitation.

This step will clean the DNA from the enzyme and any other impurities. It is important that the fragments are clean again for the next steps.

- Add 1x the volume of phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1) to size selected DNA of previous step
- Mix well and let stand for a few minutes
- Spin 10' at 13000 rpm
- Transfer upper phase to a new tube (with very fine pipette, be careful just the upper-phase)
- Add 1x volume of chloroform/isoamylalcohol (24:1)
- Mix well
- Spin 10' at 13000 rpm
- Transfer upper phase to a new tube

Ethanol precipitation:

- Add 1/10 volume of 3M NaAc (pH 5.2) and 2x volume of cold 96% ethanol.
- Put at -20°C for at least 20' (longer is better....)
- Spin at 13000 rpm for 20'
- Dispose liquid by pipetting (glass pipette with pulled tip (use Bunsen burner))
- Wash pellet with 300-700 μl ice-cold 70% EtOH
- Spin at 13000 rpm for 20'
- Remove supernatant with glass pipette
- Dry for 5' in Speed-vac
- Resuspend in 40 μl MilliQ water (TE^{-4}) (let stand at RT)

View results on 1% agarose gel (2 μl digested DNA solution, 1 μl 6x loading dye)

5. Ligation of Mbo adaptor

This step adds an adaptor to the DNA fragments with a primer sequence so that the primer will be able to recognize this sites and amplification by PCR may be performed. For this, the ligation mixture of adaptor and the fragmented DNA is left overnight at room temperature (RT). The adaptor sequence depends on the enzyme used to digest the DNA. For this ligation we need 400-500 ng DNA per reaction. The MboI end is the same on both sides of the adaptor (ACTC).

To prepare the adaptor (*it is convenient to use freshly prepared adaptor; the adaptor goes bad rapidly*)

- 1.75 μl stock forward (500 pmol/ μl)
5' - ACT CGA TTC TCA ACC CGA AAG TAT AGA TCC CA - 3'
- 1.75 μl stock reverse (500 pmol/ μl)
3' - CT AAG AGT TGG GCT TTC ATA TCT AGG GTC TAG -5'
- 46.5 μl MQ water

- Heat up a beaker with water, put samples 3' at 90°C
- Let cool slowly in water to RT (at least 3-4 hours!!)
- Put tube on ice

Mbo I-adaptor ligation: (total volume = 25 μl)

Add (per reaction):

- 15 µl MQ water
- 2.5 µl 10x ligation buffer
- 3 µl DNA fragments (from digestion, after EtOH precipitation)
- 3 µl MboI adaptor (17,5 pM)
- 1.5 µl ligase T₄ (1 U/µl)
- Incubate overnight at RT in the dark (best temp at app 16-19°C)
- Store rest of adaptor in freezer (just usable for a few days)

6. PCR of DNA fragments with adaptor

The fragmented-ligated DNA fragments must be now amplified in order to increase the amount. The primer used in this step depends on the adaptor attached in the ligation. The primer used for this specific amplification (Thalassia testudinum) was the Mbo I-adaptor oligo, with the following sequence:

5' – CA ACC CGA AAG TAT AGA TCC CA – 3' (MboI short)

Per sample (add in this order):

- 5 µl 10x PCR buffer
- 33 µl MQ water
- 4 µl dNTP (2.5 nM) (free nucleotides)
- 1 µl MboI primer (20 pmol/µl) (annealing sequence that starts amplification)
- 5 µl MgCl₂ (25 nM)
- 0.5 µl Taq polymerase

Prepare master mix for 6 samples.

In each PCR tube:

- 1.5 µl DNA solution [Mbo I ligated] (20ng/µl). Put in tube first!
- 48.5 µl Master mix solution

The DNA solution is added in each PCR tube, and then the rest of the master mix is added to these tubes – 48.5 µl – to make a total of 50 µl per tube. Adding the master mix to the DNA at the end will prevent the reaction from starting too soon. Put the tubes in the thermalcycler when the lid is at 106°C and the block is at about 80°C. This is called a hot start and prevents primer dimmers and other PCR mismatches.

- Put PCR tubes on ice until PCR machine is ready to start

PCR conditions:

Lid temperature 104°C

- 2' at 95°C
- 30'' at 95°C *
- 30'' at 60°C *
- 3' at 72°C *
- 15' at 72°C
- ∞ at 4°C

Conditions with * are repeated and constitute the PCR cycles (25 in this case).

In each cycle the primer anneals to the single-stranded DNA and the TAQ enzyme completes the complementary sequence using the free nucleotides. When high temperature is reached again this double stranded DNA fragment becomes single-stranded and the process starts again. After 25 cycles we have (DNA)²⁵ (the amount originally present raised to the 25th potency).

- View result in 1% agarose gel
- There must be a clear smear between app 300 – 1300 bp. (No bands)
- Pool samples.
- Ethanol precipitation:
- Add 2x volume of cold 96% ethanol and 1/10 volume of 3M NaAc (pH 5.2)
- Put at –20°C for at least 20' (or longer, is better....)
- Spin at 13000 rpm (at 4°C) for 10'
- Dispose liquid by pipetting (glass pipette with pulled tip (use Bunsen burner))
- Wash pellet with 70% EtOH
- Dry for 5' in Speed-vac
- Resuspend in 100 µl MQ water (let stand at RT)

7. Filter preparation.

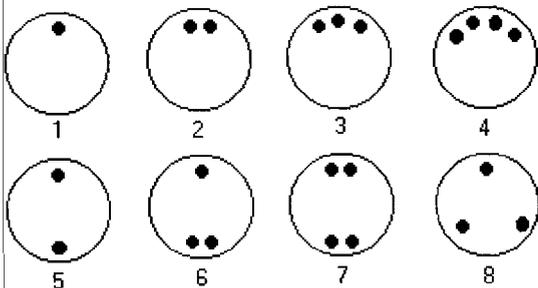
Within the fragmented-amplified DNA there are microsatellites. In order to find them it is necessary to get them annealed to complementary sequences (microsatellite motives) that are designed with this purpose. First this oligos (microsatellite motives) are fixed on a special type of filter paper (N⁺ Hybond) and then the fragmented DNA (PCR product) is added to them. Different oligo sequences are used in different filters, to look for microsatellites with different repetitive sequences (2, 3 and 4 base pairs repeats).

- Wear clean powder free gloves (wash first with water)
- Whatmann 3MM filter paper to work on
- Hybond- N⁺ filter paper (45µ pore size) (S&S Nytran SuPerCharge)
- Sharp 5/6 mm round cutter (tube cutter)
- Cut (as clean as possible) small circles of filter-paper (45µ pore size) with 5/6 mm round cutter (make a few for each reaction)
- Do not touch filters with fingers. Wear gloves (powder free!!) and use blunt forceps
- Number round filters according to ms-motives to be added (do this by pinching little holes with a needle in a certain code, see below) and number 8 Petri-dishes
- Put Whatmann paper on bottom of dishes

Nytran Super Charge (N⁺ Hybond) is a highly positive charged nylon membrane. These membranes are used for the immobilization of nucleic acids and proteins.

The ms motif treatments are as follow:

1. GA₁₂ (10 µl of a 150 ng/µl solution)
 2. GT₁₂ (10 µl of a 150 ng/µl solution)
 3. AGT₉ (10 µl of a 150 ng/µl solution)
 4. TGA₉ (10 µl of a 150 ng/µl solution)
 5. TGT₁₀ (10 µl of a 150 ng/µl solution)
 6. TCT₁₀ (10 µl of a 150 ng/µl solution)
 7. mix: GAG₈, GTG₈, CGT₈, GCC₇, GCT₈, TAA₁₂ *
 8. mix: TGTT₈, GTAT₈, GATA₈, GACA₈, GGAT₇, TCTT₈ *
- (* - 2µl of each, from a 25 ng/µl solution)



- Put numbered filters on a Hybond-N⁺ filter paper in the lid of the Petri-dish (both sides of filter are equal)
- Add 10 µl of ms-motif solution to each piece of filter paper (filters 1-6) or 2 µl of each motif of the mix (filters 7 and 8)
- Leave round filters to air-dry for ≈1 hr.
- Wash filter-paper circles with sterile MQ water. (Do not use same water for the washing, best to wash in 8 different little beakers)
- Put filter pieces back on Whatmann-paper in Petri-dish and let dry (filters should not be upside down)
- Put closed Petri dishes in oven and bake at 80°C for 2 hrs. (this will fix DNA on filter)
- Put all filter pieces of 1 motif (not more than 5) in 1,5 ml tubes with 1 ml hybridization buffer (5 x SSC, 50mM Na-phosphate pH=7, 7% SDS, 50% deionised formamide)
- Leave overnight in hybridization machine softly shaking at 37°C
- Take out filters (with blunt forceps) and put in small tubes with 1% SDS (900 µl sterile MQ water + 100 µl 10% SDS)
- Introduce tubes with filters in a boiling water bath for 10'
- Separate filters dry in tubes (one filter per tube) and store at -20°C

Hybridization buffer:

- 12,5 ml 20x SSC (sterile)
- 2,5 ml 1M Na-Phosphate pH=7.0 (sterile)
- 3,5 gr SDS (also Larium Sulfate)
- 25 ml formamide (deionised, see Maniatis)

Top off to 50 ml with sterile MilliQ water. (this solution does not dissolve at room temperature, it dissolves at 37°C).

20x SSC buffer

- 175.3 g NaCl
- 88.2 g Na Citrate dehydrate

Dissolve in approximately 800 ml dH₂O. Adjust to pH 7.0 with dilute HCl. Bring up to a final volume of 1L and autoclave. Store at room temperature.

The previous steps are aimed to the fixing of the ms-motives on the filter pieces. During the last steps all the products that did not fix properly on the filters will be washed away.

8. Hybridization of filters with fragmented DNA.

- Take tube with filter (of each motif one) and add 600 μ l of pre-heated hybridization buffer
- Introduce in hybridization machine and leave them softly moving for 10'
- Add 10 μ g (app. 3 μ l, depends on primer) of MboI F short primer (500nM) per tube
- Pre-hybridize in hybridization machine for 1 hr (slowly shaking at 37°C)
- Boil total of PCR product (10-20 μ g) at 96°C in a beaker with water for 10' (PCR product obtained in step 5), this will make the DNA single stranded
- Put directly on ice after taking out of PCR machine
- Add the PCR product (\pm 100 μ l) to the tubes that contain filter pieces with ms-motives (12.4 μ l of PCR product per tube)
- Hybridize for 2 days at 37°C, softly shaking or rotating (200 rpm)

DNA fragments that will be enriched have the Mbo forward and reverse primer site on each site, these sequences are complementary and will stick to each other and form long chains of amplified DNA. To avoid this Mbo F short primer is added in excess. The primer will bind to its primer site and so no chain reaction will happen.

In this section the Thalassia testudinum DNA will anneal to the ms motives fixed on the filter pieces. By putting the PCR product at 96°C before adding it to the filters it will become single stranded, the ice will prevent it from annealing again.

9. Isolation of DNA fragments (which contain ms-sequences) - Washing.

Check if Glycogen is fresh!!

Preheat 1.5 x SSC (Sodium Chloride Sodium Citrate solution)+ 1% SDS solution to 62°C

Prepare tubes

A (1 to 8) with 500 μ l 0.5 x SSC + 1% SDS wash

B (1 to 8) with 500 μ l 0.2 x SSC + 1% SDS wash

C (1 to 8) with 500 μ l 0.1 x SSC + 1% SDS wash

Keep tubes at 62°C

- Put all filters in a 50 ml blue-cap tube and add 10ml of warm (62°C) 1.5 x SSC + 1% SDS
- Let filters wash at 62°C in this solution in hybridization machine for 20'
- Dispose buffer and repeat (add 10 ml 1.5 x SSC + 1% SDS, wash in hybridization machine, rotating at 62°C for 20')
- Put filters in 1.5 ml tubes A₁₋₈ (separately) with 500 μ l of 0.5 x SSC + 1% SDS and leave in hybridization machine at 62°C for 30'
- Do the same as previous step (tubes B₁₋₈) but with 0.2 x SSC + 1% SDS (keep previous tube!)
- Do the same as previous step (tubes C₁₋₈) but with 0.1 x SSC + 1% SDS (keep previous tube!)

ANEXO 1: Protocolo de enriquecimiento de microsátélites para *Thalassia testudinum*.

- Remove filter and put in new tube (store at -20°C).

Keep tubes with solutions from previous three steps. The DNAs annealed to the ms-motives are in this solution.

Precipitate DNA:

- Add to these solutions: 1 μl glycogen (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
 100 μl of LiCl (10M)
 600 μl of isopropanol
- Leave overnight at -20°C
- The day after spin at maximum speed (13000 rpm) for 30'
- Remove supernatant carefully (with glass pipette)
- Wash pellet with 200 μl of 70% EtOH
- Dry in speed-vac for 5'.
- Re-suspend in 20 μl MQ water

These steps will wash the DNA (Thalassia DNA annealed to the ms motives originally fixed on the filters) from the filters and obtain it in a solution, so that it can again be extracted and amplified by PCR.

10. PCR – Amplification of target DNA fragments

Prepare 8 tubes (one for each ms motif treatment)

Add in each a mixture of the A, B and C washes from previous step (5 μl per fraction =15 μl)

Of this 15 μl mix, 2 μl will be used for the PCR

MboI short (primer 2) = 5' – CA ACC CGA AAG TAT AGA TCC CA – 3'

This MboI oligo is the same as before but 10 base pares of the 5' side are missing.

- PCR mix (per reaction): (total volume = 50 μl)
 - o 5 μl 10* buffer
 - o 0.5 μl Taq
 - o 3.0 μl MgCl₂
 - o 5 μl MboI kort (primer 2) (50 pmol/ μl)
 - o 4 μl dNTP's (5mM)
 - o 2 μl DNA mixture
 - o 30.5 μl MQ water

It could be that PCR does not work. Try different MgCl₂ concentrations and different Primer concentrations. DNA concentration is very low, almost not measurable. You could also try to lower the annealing temp.

PCR Conditions:

Hot start (lid at 106°C)

- 2' at 95°C
- 30'' at 95°C *
- 30'' at 60°C *
- 3' at 72°C *
- 15' at 72°C
- ∞ at 4°C

View results in a 1% agarose gel. A smear around 300 – 1500 bp should be visible and should be much thicker than before this procedure.

The PCR product from this step will be used for the bacteria cloning in the following step.

11. Cloning of bacteria - Preparation of bacteria medium

Prepare media a day before it will be used.

- Preparation of LB medium (per liter)
 - 10 g Peptone (or Tryptone)
 - 5 g yeast
 - 10 g NaCl

- 15 g agar
- (Check pH = 7 before adding agar (app. 2 drops 37% HCl))

- Prepare LB medium with agar for growing transformed cells (500 ml for 8 plates)
- After autoclaving the medium for 20', let cool to app 60°C and add:
 - 1 ml of Ampicilline (100mg/ml) per liter
- Put medium (app. 50 ml per dish) in Petri-dishes (square 12x12cm) and leave to cool

Work in flow chamber! (Turn on 30 min before starting)

When medium has cooled add to each plate:

- 80 µl 2% X-Gal
- 8 µl of 100mM IPTG
- Spread evenly with sterile glass spatula.
- Leave to dry for a few minutes and store upside-down.
(Protect from light – X-Gal and IPTG are light sensitive)

This LB medium will be used to grow bacteria in Petri-dishes. The cloned bacteria have been made ampicilline-resistant during the transformation (see below). Thus, the ampicilline added to the medium will prevent non-wanted bacteria from growing on it. The X-Gal and IPTG will make the successfully cloned bacteria (those which incorporated the target DNA during the transformation – see below) appear white, so they can be detected in the colonies afterwards. When the bacteria colonies are blue, it means that the transformation failed; if the bacteria colonies are white then the transformation worked well.

- Prepare LB liquid (and without antibiotics) for growing transformed cells in first 1,5 hour in 1,5 ml tube. App 500 µl per reaction, so 20 ml is enough
- Prepare 24 (182 samples per dish) square Petri-dishes using: LB with agar and ampicilline (without X-Gal and IPTG) for growing bacteria on filters. App 1,5 liter
- Prepare LB medium without agar and with 15% glycerol (222ml per liter) for growing bacteria for Glycerol stock in 96-well plates. App. 1 liter for 4800 positive clones

(These media will be used in other steps – see below)

12. Cloning of bacteria . Ligation

The target (Thalassia testudinum) DNA is supposed to be incorporated into the bacteria. These bacteria will grow and thus will “amplify” (i.e. reproduce) the target DNA sequences. In order to do this, the target DNA (PCR product from previous step) must be ligated to a larger DNA piece that will act like a plasmid, i.e. a ring-shaped DNA sequence with several genes incorporated, that will be taken by the bacteria. These “vectors” will bind to the target DNA fragments during a ligation procedure, using specific enzymes. During the ligation, some vectors will bind to themselves, whereas others will bind to the target (Thalassia) DNA fragments and will incorporate them into the ring. Later, these ring-shaped molecules will be taken by the bacteria, and the vectors that bind to themselves will produce blue bacteria colonies in the LB medium with IPTG, while the others will produce white colonies. These vectors are engineered and sold commercially and may be requested to display different characteristics. Here we used pGEMT Easy Vector System I.

The final “Vector” that will be incorporated into the bacteria is thus the original vector plus the target DNA fragments. The whole size of these vectors will be around 3000 bp. These circular DNA molecules contain different transcription sites, such as those for β-lactamase, or RNA-polymerase, including initiator and promoter codon sequences, some phage regions and binding sequences for particular primers (forward and reverse).

Conditions for the ligation: (per reaction)

- o 5 µl buffer (2x) (Comes with pGEM T Easy Vestor System I (Promega))
- o 1 µl vector (50 ng) “
- o 1 µl of T₄ ligase (1U/µl) “
- o 3 µl PCR product
- Leave overnight at 4°C

The ligation must be done with fresh PCR product, since it will proceed from an A (adenine) at the end of PCR fragments. As these fragments get old they might decay and lose these particular binding sites.

13. Cloning of bacteria . Transformation

In VMT lab.

Work sterile!!

- Put for each ms-motif 100µl of competent bacteria cells on ice. These are kept at -80°C in 100 µl aliquots. (Thawing will take app 5 minutes)
- Add 4 µl of each ligation-mixture from the previous step in its corresponding tube.
- Leave on ice 20'
- Give the bacteria a heat shock:
Immerse the tubes in a water bath at exactly 42°C for 50 seconds
- Add 900 µl of liquid LB medium (without antibiotics)

- Leave 1,5 hour in shaker (150 rpm) at 37°C for the bacteria to recover and start growing
- Mark Petri-dishes with treatment-labels and plate the bacteria on the dishes with LB-medium and agar (with X-gal, ampicilline and IPTG) by carefully pipetting 300 µl of bacteria mix and spreading with a spatula
- Leave them growing overnight at 37°C, put Petri-dishes upside-down and sealed with parafilm in stove
- Put in the fridge (4°C) this will increase blue color of bacteria

Bacteria are stored at -80°C and have been made competent by making them "permeable" to plasmids, that is, capable of taking in foreign DNA material. The bacteria are given a heat shock and this will result in the incorporation of the ligated vectors into them. Once they have incorporated this foreign DNA, they become ampicilline-resistant and they are able to reproduce and thus "amplify" the target DNA sequence included in the vector. After plating the bacteria, colonies will start growing. By placing at 4°C at the end of the growth period, blue colonies will become bluer and easier to detect. The white colonies will be the ones that successfully incorporated the target DNA. By this time, the bacteria are GMO (genetically modified organisms) so they should be handled with care (work should be done in VMT lab) and any waste should be sterilized before disposing.

14. Screening and picking positive colonies.

After the bacteria have grown in Petri-dishes over-night, the blue colonies may be distinguished from the white ones. White colonies must be picked and plated on N⁺ Hybond filters, or membranes, as well as in microtube plates so that they can later be labeled (with radioactive nucleotides) and the promising clones may be detected.

Before starting print on inkjet printer Excel grid (Schema~1.xls) on Hybond filter (cut A4 or letter sized filters, to fit in printer). Best is to print this with the ms-motif and the number of the plate on top of the grid. Do this with great care and use powder-free gloves. Each A4 filter contains 8 x 96 filter grids. Cut filters so that each piece of filter contains 2 x 96 grid (this will fit precisely on square Petri-dish (12x12 cm))

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
C	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
D	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
E	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
F	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
G	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
H	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
C	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
D	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
E	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
F	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
G	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
H	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96

Use the liquid LB medium with glycerol (222ml/liter) and ampicilline to fill microtube-plates (96 wells per plate). Use two plates per Petri-dish, total of 6 plates (576 colonies) per motif. Fill each microtube with 200 µl of the LB medium, with multichannel-pipette.

- Set Hybond-N⁺ filters on squared dishes with LB medium with agar
- Each filter is a grid with 96 cells, each with an x,y grid reference label (i.e., A1, A2, A3...A12, B1, B2.....B12,H1, H2....., H12). This grid corresponds to the positions of the microtubes in the microtube plate
- First pick a blue colony to measure background radiation (when labeling with probe), scratch with toothpick on top left corner of the printed grid Hybond filter
- Pick with a sterile toothpick a white colony from a Petri-dish and put in LB medium within microtube plate (rinse softly).
- Then scratch with same toothpick on the Hybond-N⁺ filter and put pick back in microtube plates to keep track. If plate is full remove all toothpicks with care.
- For each white colony picked, use the same grid reference in the filter and in the microtube plate.

For the Thalassia case, we plated 4608 white colonies in a total of 48 microtube plates (six plates per ms treatment).

- Put both dishes with Hybond -N⁺ filters and microtube plates in the growth chamber overnight at 37°C. Let the bacteria grow
- Take plates and filters out of the growth chamber and store in the fridge at 4°C

The Hybond-N⁺ filters will be used to label the target DNA with radioactive nucleotides and detect promising clones, while the bacteria in the microtube plates will be stored as stock for further development, once it is known which colonies might contain microsattellites.

15. Preparation of Hybond-N⁺ Filters

Prepare:

Denaturalization buffer: (for 60 filters app 1,5 liter)

87.66 gr NaCl (1,5M)

20 gr NaOH (0.5 M)

Fill up to 1 liter.

Neutralization buffer: (For 60 filters app. 1,5 liter)

87.66 gr NaCl

60.5 gr TRIS (0.5M)

Add HCl (37%) to pH 7.5

Fill up to 1 liter.

2 x SSC: (for 60 filter app 6 liter.)

- Prepare tray with denaturalization buffer
- Put on tray 3 pieces of 3MM Whatmann paper
- Add to this paper denaturalization buffer so that it is totally drenched in it, but so, that it does not flow around
- Put filter on top (printed side up) and put on reciprocal shaker, let stand for 5 minutes (Do not touch filters with fingers, use powder free gloves)
- Move filters to a new tray with filter paper drenched in neutralization buffer (0.5 M Tris / 1.5 M NaCl - pH = 7.5). Printed sides up. Leave 5'
- Wash (in fluid) vigorously with 2* SSC in a beaker or tray for 10'. This is to remove all dead cell material. DNA should be already bound to filter
- Take filters out of washing solution and let dry (app 1 hour) on thick filter paper
- Put filters in the oven in between small Whatmann paper pieces (this to prevent curling and sticking) and bake at 80°C for 2 hours

Once the bacteria (baring the inserted vector) have grown on the Hybond N⁺ filters, their DNA must be extracted. For this, the bacteria must be destroyed and their DNA must be bound to the filter. The previous steps will leave only the DNA (bacterial DNA + Vector with target DNA), which will later be labeled with a radioactive probe.

16. Hybridization with radioactive probe

Hybridization buffer.

- 150 ml 20x SSC
 - 50 ml Denhardt reagent (DH) 50x (Maniatis 9.49)
 - 5 ml 10% SDS
 - 295 ml MQ water
- Put filter in glass hybridization tubes, 6 single filters will fit
 - Wet filters with 6x SSC, and remove excess of buffer
 - Write ms-motif on each tube
 - Add to filter 25 ml hybridization-buffer at 65°C (preheated in water-bath)
 - Leave rotating in the hybridization chamber at 65°C for 1 hour

Denhardt's reagent 50x:

-5 gr Ficoll wt400
-5 gr Polyvinylpyrrolidone
-5 gr BSA
Fill up to 500 ml.
Filter and store in falcon tubes
at -20°C (max. 3 months)

This pre-hybridization step will block all the membrane pores, so that when the radioactive probe is added, it will only attach to the DNA on the membrane, and not to the free membrane pores.

- Prepare radioactive probe to do the labeling (Using MBI Fermentas T4 Polynucleotide Kinase):
- Do 1 labeling reaction extra (does not matter what motif, this to check if labeling worked)
 - o 2 µl 10 x buffer A
 - o To 19 µl MQ water
 - o 1 µl of ms-motif solution (for single motifs 1 x 150 ng/µl, for mixes 1 µl of each motif (25ng/µl)
 - o 2 µl γ -P³² ATP (20pmol)
 - o 1µl enzyme (T4 Polinucleotide Kinase (10 U))
- Incubate at 37°C for 30' in water bath
- Take mix out of the water bath and add 1 µl EDTA (0.5M)

Test labeling:

- Take 1 essay tube (12ml, plastic) and insert a 1 ml syringe
- Insert a bit of Angel Hair in the bottom of the syringes and compress it (this is to prevent that Sephadex G50 will flow out of the tube)
- Add Sephadex G50 with a glass pipette to the syringe in order to build up a column
- Spin 30'' at 1500 rpm
- Repeat the same until column is completed (this is when solid Sephadex reaches the 1ml mark)
- Add to extra ms-motif 100 µl of 1x TE, this to make pipetting easier
- Add the radioactive mix of extra ms-motif to Sephadex

Sephadex G50, traps DNA's of small sizes. 1-20bp in small pores. This will trap all the ³²P-ATP that did not bind, but it will also bind a fraction of the probes (size ≈20bp). That is why a test is done with one ms-motif.

G50 column in the syringe and spin for 90" at 1500 rpm.

- Liquid on bottom of the 12ml tube is the labeled ms-motif, test with Geiger-Counter if this fraction is radioactive (should be very high (PEEEEEP)).

The radioactive mix is prepared with γ - P^{32} ATP, that is, ATP that has been marked with radioactive phosphorus in the γ position. During the preparation of the probe, the T4 polynucleotide kinase will bind the P^{32} to the free nucleotides on the DNA chains of the ms motives, and will leave only ADP. Thus, the result will be radioactively labeled ms motives. This mixture must be filtered through the Sephadex column, in which all the non-used ATP and ADP will remain, while only the labeled ms motives will go through to be collected on the other end.

After the Hybond filters have pre-hybridize for 1 hour, add:

- Radioactive ms-motif probe to the hybridization tubes with corresponding motif and leave hybridizing for 3 hours (rotating, at 65°C)
- Take out filters and wash for 15' shaking in a large amount of 6 x SSC at RT
- Give filters a final rinse with 6 x SSC at 65°C for 1'
- Prepare reflection-shields by wrapping them in plastic foil
- Take out filters of rinsing solution and place on the reflection-screen (protected with plastic foil) for X-ray plaque
- Cover filters (that are wet) again with foil and second reflection shield (be careful shield has 1 good side)
- Stick 2 fluorescent stickers in a unique pattern in-between filters (these will make it easier to recognize the different films). Before adding film load them by holding them a few seconds in UV light

Darkroom.

- Add sensitive film in-between 2 reflection shields, to the plaque
- Store X-ray plaque at -80°C overnight

The radioactive probes will attach to some of the DNA fragments in the filter. Since the radioactive probes are ms motives, and the DNA fragments inserted in the bacteria are also ms motives, presumably complementary sequences will anneal and the radioactive probes that are successfully annealed will remain in the filters. Since the filters are exposed to sensitive film, radioactivity will leave a mark (a blob) in the position where the radioactive probe ended up. Then these positions may be worked out in relation to grid reference numbers in filters, and filter labels, and positive colonies may be detected.

17. Detection and growth of positive colonies in X-ray plaques.

- Develop film in developer-machine
- Superimpose developed X-ray plaques on screen with filters and identify filter cells corresponding with dark blobs in plaques

If film is too dark try:

- Shorter illumination.
- Illumination with 1 shield
- One extra 6 x SSC wash (too much probe on filter)

If film is too clear try:

- Longer illumination time.
- Try with a new label???

Or there are no positive clones

- Prepare sterile bottles with 4.5 ml of LB medium (with ampicilline). Use as many bottles as positive colonies detected in x-ray plaque
- Mark bottles
- Add 5 µl of bacteria colonies originally stored in LB medium with glycerol, in microtube plates. Use only those bacteria colonies that resulted positive in the radioactive labeling
- Set the bottles in the oscillator at 200 rpm and 37°C.
- Leave them growing over night, until medium looks cloudy and thick.

18. Plasmid DNA extraction from bacteria

- Do a mini prep to extract the inserted DNA from the bacteria
- View results (only from 5-8 tubes chosen at random) on a 1% agarose gel (Single, clear marks should be seen, their strength depending on the amount of super-coiled, circular and linear DNA)

The vector inserted in the bacteria is now in the form of a plasmid. Mini preps have been developed to extract plasmid DNA. These are carried out according to the protocol of the mini prep kit, which comes with all the solutions, tubes and instructions for usage. First, 1.5 ml of the bacteria culture are put in eppendorff tubes and spinned down. The pellet is kept and resuspended, and lysis buffer is added. Then neutralization buffer and acetic acid are added. The solution is spinned again and liquid phase is transferred to filter tubes provided in the kit. These are spinned and now the DNA remains attached to these filters and the liquid is discarded. The DNA on the small filters is washed and detached from the filters by rinsing and spinning with 100 µl of water. This solution now contains the extracted DNA. It is kept in eppendorff tubes and stored in the freezer at -20°C. Now these DNA fragments may be sequenced to find the microsattellites.

19. Sequencing

The sequencing must be done in both directions, forward and reverse. Before putting the samples in the automatic sequencing machine, a PCR must be performed to amplify the insert, that is, the target DNA only, not including the sequence of the rest of the vector (which is achieved by a specific primer during the PCR). In the sequencing PCR different nucleotides are marked with particular fluorescent dyes. PCRs are run separately with a forward primer and a reverse primer in separate tubes, so that for each sample we'll have two sequences – and two tubes, forward and reverse. The florescent dyes are added to the dNTPs that are used for the master mix of the PCR.

Add per reaction: (total volume of 12.5µl)

- o 1.25 µl 10x sequence buffer
- o 0.33 µl dNTPs
- o 0.67 µl ddUTP
- o 0.67 µl ddGTP
- o 0.67 µl ddCTP
- o 0.67 µl ddATP
- o 0.33 µl DNA polymerase
- o 1.9 µl MQ water
- o 1 µl primer (forward or reverse, depending on reaction)
- o 5 µl DNA product

PCR conditions:

- 5' at 96°C
- 30'' at 96°C *
- 30'' at 50°C *
- 4' at 60°C *

* 30 cycles

Ethanol precipitation:

- Add 4µl of Stop solution (NaOAc + EDTA) and 1 µl glycogen to PCR (sequencing) product
- Spin at 3600 rpm for 1.5 hours at 3°C
- Dispose liquid
- Add cold 96°C EtOH, spin at 3600 for 15' and dispose liquid
- Repeat previous step
- Dry for 1 hr in vacuum chamber
- Resuspend in 40 µl of loading solution
- Transfer to tubes appropriate for sequencing machine
- Add 1 drop of mineral oil
- Sequence

20. Design Primers

Use primer design program of the web, we used Primer3.

Notes for primer design:

- Final product between 100 and 200 bp (maximum 350)
- Avoid primers forming loops
- Build short primers (between 18 and 27 bp – optimum= 20bp)
- Proportion of GC around 50% (optimum)
- Melting temperature between 20 and 80°C (but better between 50, 55 or 60°C)
- Melting temperature for both primers should be similar
- Compare final sequence with the rest of the fragment to avoid homology with other parts

ANEXO 2

Tinción con nitrato de plata para geles de poliacrilamida

Silver stain detection of SSRs in denaturing polyacrilamide gels
Adaptation of Creste *et al.* 2001, based on Beidler *et al.* (1982)

Running gel :

Stock solutions :

Acidic Ethanol	0.5% Glacial acetic acid in 95 % Ethanol (500µl in 100ml)
Acrylamide : urea solution	29 g acrylamide 1 g Bis acrylamide 100 ml H ₂ O (MilliQ) 50 ml 10 x TBE 210 g urea H ₂ O (nanopure) to 500ml Filter with Whatmann paper, store at 4°C (brown bottle)
Denaturing buffer 49 ml	98% deionized formamide, 1 ml (10mM) 0.5M EDTA pH 8 0.125 gr (0.25%) Bromphenolblue 0.125 gr (0.25%) Xylenecyanol

- Treat smaller plate with 4 µl Bind Silane in 1 ml of acidic ethanol.
- After 5 min clean with 95% ethanol.
- Treat large plate with 1 ml of Sigmacote, after 5 min clean with MilliQ.
- Prepare gel (6% PA, 7 M urea) by mixing 90 ml of acrylamide : urea solution with 90µl 25% ammonium persulfate and 90µl TEMED (1µl per ml of gel)
- Pour gel, allow 60 min. to polymerize.
- Pre-run gel at 80-85 W (85 mA, 1900 V) for 60 min., until gel reaches 50°C in 1x TBE running buffer.
- Add 30 µl Loading Dye to 20µl amplification reaction, denature for 3 min at 95°C, place samples on ice.
- Apply sample (5-8µl) to gel.
- Run gel at 80-85W for 100-150 min. at 45-50°C.

Staining gel :

Stock solutions:

Fixing solution:	10% ethanol, 1% acetic acid	(5x usable)
Pre-treating solution:	1,5% nitric acid	(5x usable)
Staining solution:	0.2% AgNO ₃ , 1.5 ml 37% formaldehyde	(6x usable)
Developing solution:	30 g Na ₂ CO ₃ ; Fill up to 1 liter water Grade I (MilliQ) Before use add; 1.5 ml 37% formaldehyde and 1 ml Thio Sulfate (20 mg/ml) (make fresh and Cold) Fill up to 1 liter.	
Stop solution:	5% acetic acid.	(5x usable)

- Fix gel for 10 min with fixing solution 1 liter.
- Wash gel for with H₂O (MilliQ) for 1 min.
- Pre-treat gel (oxidize) with 1 l of pre-treating solution for 3 min. shaking gently.
- Rinse gel with 1 l of H₂O (MilliQ) for 1 min.
- Impregnate gel with 1 l of staining solution, for 25 min. shaking gently.
- Rinse gel app. 15 sec (1x) with H₂O (MilliQ).
- Develop gel by applying developing solution (app. 12°C) and gently shake for 10- 15 min until the bands appear with desirably intensity, remove solution.
- Stop developing reaction with 1 L of stop solution, for 5 min.
- Wash gel with 1 L H₂O (MilliQ).
- Let dry overnight.
- Scan gel.

References:

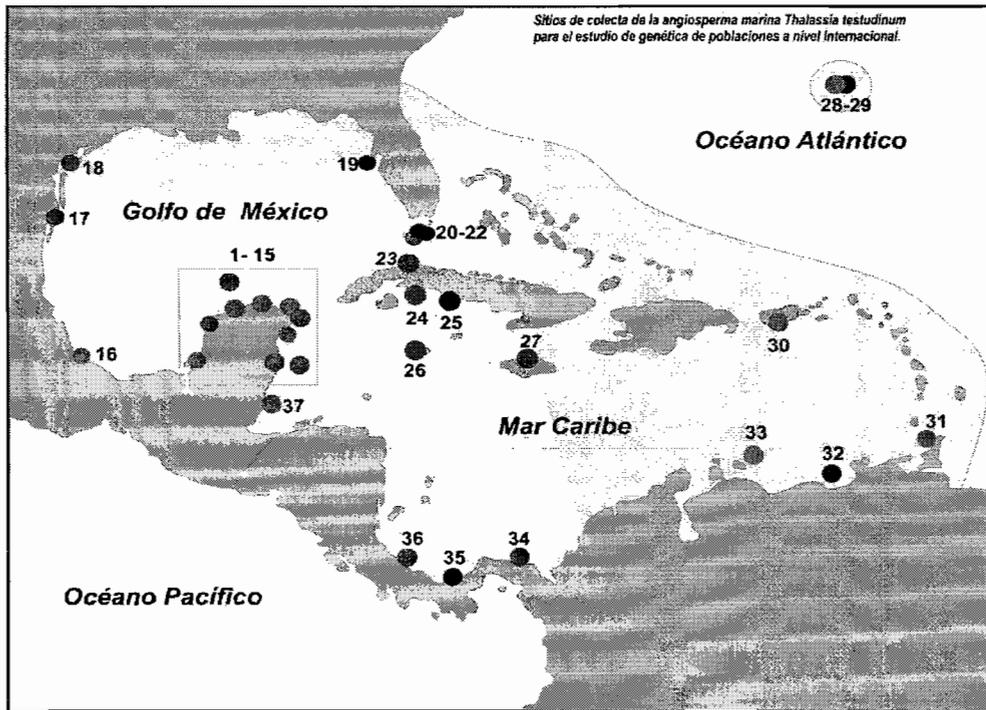
Beidler JL, Hilliard PR, Rill RL. 1982. Ultra sensitive staining of nucleic acids with silver. *Analytical Biochemistry* 196:374-380.

Creste S, Tulmann Neto A, Figueira A. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequence gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter* 19:299-306.

ANEXO 3

Poblaciones colectadas para estudio Gran Caribe y Golfo de México completa

Poblaciones colectadas en el Gran Caribe, y Golfo de México para el estudio de genética de poblaciones de *Thalassia testudinum*. Los puntos de color rojo representan las poblaciones seleccionadas para el estudio del Capítulo 1 y 2, los puntos en negro son poblaciones que si fueron colectadas pero no serán utilizadas en esta tesis pero que serán analizadas en el futuro, esto debido a la falta de tiempo.



Pais	Población	Pais	Población
1. México	Chinchorro	20. EUA	Craig Key (Florida Keys)
2. México	Majahual	21. EUA	Fiesta Key (Florida Bay)
3. México	Punta Allen	22. EUA	Rabbit Key (Florida Bay)
4. México	Cozumel	23. Cuba	Rincón de Guanabo
5. México	Puerto Morelos	24. Cuba	Rancho Luna
6. México	Punta Sam	25. Cuba	Playa Ancón
7. México	Isla Mujeres	26. Islas Caimán	Caimán
8. México	Ria Lagartos	27. Jamaica	Discovery Bay
9. México	Santa Clara	28. Bermuda	Sitio 1
10. México	Alacranes Isla Pérez	29. Bermuda	Sitio 2
11. México	Alacranes Isla Desterrada	30. Puerto Rico	La Parguera
12. México	Celestún	31. Trinidad Tobago	Ben Accord Lagoon
13. México	Ciudad del Sol	32. Venezuela	Isla Margarita
14. México	Laguna de Términos (Cd del Carmen)	33. Curaçao	Spaansche Water
15. México	Veracruz (Costa de Oro)	34. Panamá	Galeta
16. México	Rio Nizuc	35. Panamá	Bocas del Toro
17. EUA	Lower Laguna Madre (Texas)	36. Costa Rica	Cahuita
18. EUA	Upper Laguna Madre, Red Fish Bay (Texas)	37. Belice	Twin Cayes
19. EUA	Tampa Bay, Bokeela (Florida)		

ANEXO 4

Plan de muestreo para colaboradores de CARICOMP

Plan de muestreo:

Estimado colega,

Aquí le mando una explicación de cómo colectar *Thalassia testudinum* para el estudio genético; “Análisis de la variabilidad genética del angiosperma marina *Thalassia testudinum*, Banks ex Köning, con el uso de microsátélites”.

Es muy importante leer todo el proceso antes de iniciar el muestreo.

La idea general es colectar pastos en las 2 estaciones de pastos marinos de CARICOMP: la estación TÍPICA y la estación ALTA. Si solamente hay una estación, es necesario establecer otra estación a una distancia no menor a 500 m, ni mayor a 2 km de la primera estación. Si sí hay 2 estaciones de CARICOMP pero están a una distancia mayor de 2 km por favor colectar en un sitio nuevo dentro de los márgenes mencionados. En cada estación se colectarán 15 haces (grupos foliares con un pedazo de vástago corto. Fig 1a) de *T. testudinum* sumando un total de 30 muestras. Les mando 35 bolsas Ziploc en donde guardar las muestras obtenidas en el campo, y 35 tubos con Silcagel para guardar las muestras procesadas. Además 5 bolsas y 5 tubos para colectar unas muestras extra de otras especies de pasto marino que crecen en el sitio o unas muestras extra de *Thalassia testudinum* si no hay otras especies de pastos marinos. La duración de trabajo es mas o menos 1 hora por estación.

Equipo necesario:

- Cuchillo con una hoja de mas o menos 20 cm., para colecta.
- *Bolsas numeradas para mantener el orden de colecta en el campo.
- *Cuerda de 2 metros con un plomo a cada lado y un corcho a un lado.
- *35 tubos de plástico con Silicagel para guardar muestras procesadas.
- Equipo de buceo o de buceo libre.
- Papel para secar.
- Bisturí o cuchillo filoso, para procesar muestras
- Cubeta con agua de mar para guardar las bolsas que contienen las muestras.
- Agua limpia y si se puede alcohol.
- Si se puede GPS.
- *Etiquetas para numerar los frascos
- Lápiz y papel.

* Se incluye en el paquete de muestreo que le envío.

Colecta:

En cada estación se colectarán 15 haces de *Thalassia testudinum*. Los haces se cosechan cortando, con el cuchillo con la hoja de 20 cm, debajo del suelo el vástago corto (rizoma vertical) y removiendo la sección de vástago corto con las hojas y el material muerto (Fig 1a). La distancia entre cada haz será de 2 metros, para obtener un total 15 haces en ≈ 28 metros. Lo mas fácil es separar los puntos de muestreo usando la cuerda con plomos incluida en el paquete de muestreo, (el corcho a un lado sirve para no perder la cuerda). Lo mejor es colectar en zigzag en lugar de una línea recta (ver figura 2). A cada haz le corresponde una bolsa marcada con número (incluida en paquete), esto para mantener el orden de colecta (es muy importante). Esta colecta se hace en las dos estaciones. En la primera estación se usan las bolsas de numero 1 al 15; la primer muestra de la línea es No. 1 y la ultima es No. 15 \rightarrow es muy importante mantener este orden en las bolsas. En la segunda estación se hace lo mismo que en la primera pero usando las bolsas con el número 16 al 30. Si por ejemplo se colectan muestras en dirección Norte a Sur en la estación 1, también se colecta en esta dirección en la estación 2. Las bolsas con números 31 al 35 son para colectar muestras de otras especies de pastos si las hay, si no, por favor colecte muestras de *Thalassia testudinum* extra (el orden no es importante, solamente se anota en el formato de colecta el lugar de colecta). Es muy importante que después de colectar las muestras se guarden las bolsas con muestra en la sombra y preferible en una cubeta con agua de mar, para que permanezcan frescas todo el tiempo ya que sol y el calor dañan el ADN.

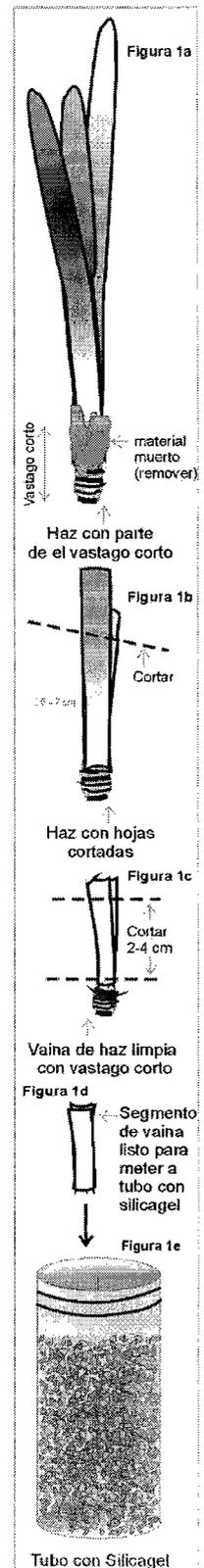
Si es posible se toman las coordenadas con un GPS, o se dan estimaciones de las coordenadas.

Procesar las muestras :

Este proceso se hace al regresar a tu lugar de trabajo (laboratorio, estación de campo). Se debe de hacer este trabajo en menos de 6 horas después de colectar, de lo contrario, se descompone el ADN.

Para evitar que las muestras estén contaminadas con ADN de otras especies (como epibiontes y/o bacterias) se escoge el tejido de la planta más nuevo y limpio. Esta es la parte de la vaina que está más abajo y adentro de el haz (la parte mas blanca).

Se procesa una muestra a la ves, empezar con la muestra de bolsa numero 1 y seguir el orden (así se evitan equivocaciones). Al haz colectado se le quita (Fig 1a) la parte de los restantes de la vaina muerta y las hojas muertas. Después (Fig 1b) se corta (con bisturí o cuchillo filoso) la parte verde de las hojas restantes, quedando un pedazo de vaina de unos 2.5 - 7 cm. (depende de la longitud de la vaina). De este pedazo de vaina nuevo y limpio (color claro) se le hacen 2 cortes (Fig 1c), un corte es para remover el vástago corto y el segundo corte se hace en el otro extremo, para que quede un pedazo de unos 2 – 4 cm. (depende de tamaño de parte clara). Este pedacito (Fig 1d) se lava con agua dulce (por unos 5 segundos), inmediatamente después se enjuaga con alcohol (2 segundos) inmediatamente después se enjuaga el pedacito otra vez con agua limpia por unos segundos y se seca con papel (para quitarle el exceso de agua). Este pedacito se mete en uno de los tubos con Silicagel (Fig 1d \rightarrow Fig 1e). Se cierra bien el tubo, para que no le entre humedad. Al tubo se le pone la etiqueta con el numero correspondiente de la bolsa, el sitio (típica / alta o



sitio 1 / 2) y el lugar (por ejemplo: Puerto Morelos, México). Es muy importante mantener el orden de los números, la muestra de la bolsa No. 1 se pone en el tubo con etiqueta número 1, bolsa No. 2 en el tubo con número 2, etc.. El ADN de las muestras en los tubos con la Silicagel puede conservarse por mucho tiempo de esta manera.

Hay que tener cuidado con el Silicagel, **no lo inhales o ingieras, es dañino!**
(Seca la nariz y boca)

Las colectas de otras especies se procesan de la misma manera; siempre se preserva la vaina en el Silicagel, se anota sitio de colecta y especie en cuestión.

Para terminar se llena el formato que le envío con todos los datos y si es posible hacer un dibujo (mapa) explicando mas o menos la situación en el campo y la ubicación de los sitios.

Por favor mandar las muestras a la siguiente dirección:

**UNAM- Instituto de Ciencias del Mar y Limnología
c/o Bravo Internacional
At'n: Lic. Homero Prida.
Aduana Interior del Estado de México
Toluca - México**

Importante:

Enviar como:

Muestras sin valor comercial.

Únicamente para uso de investigación.

Es muy importante enviar las muestras a este lugar, en la única vía por la cual podemos importar muestras al país.

Y esto es todo.

Muchas Gracias, se los agradezco mucho.....

Kor-Jent van Dijk

Si tienen alguna duda favor de contactarme:

M.C. Jent Kornelis van Dijk
Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (UNAM)
Unidad Académica Puerto Morelos
Apartado Postal 1152
Cancún, Q. Roo
C.P. 77500, México
jent@mar.icmyl.unam.mx
Tel: +52 99887-10219 (ext. 33)
Fax: +52 99887-10138



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
UNIDAD ACADÉMICA PUERTO MORELOS**

APARTADO POSTAL 1152
CANCÚN, Q.ROO
C.P. 77500, CANCÚN, Q. ROO.

PUERTO MORELOS, Q.R.
TEL: (998) 871-02-19
FAX: (998) 871-01-38

MÉXICO, D.F.
(5) 622-85-96
(5) 622-85-97

Puerto Morelos, México. 28 julio del 2004

Estimado Colega:

Agradezco su atención de ayudarme en mi trabajo de tesis doctoral “Estudio de variabilidad genética del pasto marino *Thalassia testudinum*, Banks ex Kőning en el Atlántico Occidental, con el uso de microsateĺites”, tomando unas muestras de pastos marinos en su área de CARICOMP. A estas muestras se les analizar el ADN para hacer un estudio de genética poblacional en el Caribe y el Golfo de México. Tenga la seguridad de que recibir el crédito que merece en los agradecimientos de mi tesis. En caso que se publicara un trabajo en una revista científica como resultado de este material, su nombre aparecerá dentro el grupo de autores, como es de costumbre con los trabajos de CARICOMP. A continuación le mando una explicación de cómo coleccionar estas muestra y como procesarlas.

Gracias por su participación,

Con un cordial saludo,

M. en C. Jent Kornelis van Dijk
Unidad Académica Puerto Morelos

Fecha: _____

Sitio de colecta: _____

Coordenadas: _____

Profundidad: _____

Nombre colector: _____

Comentarios sobre sitio: _____

Dibujo de sitio

Fecha: _____

Sitio de colecta: _____

Coordenadas: _____

Profundidad: _____

Nombre colector: _____

Comentarios sobre sitio: _____

Dibujo de sitio

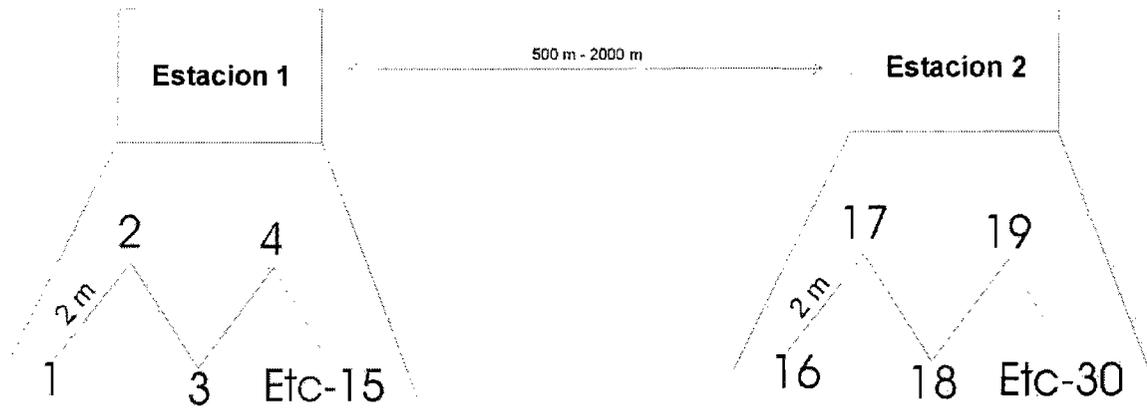


Figura 2

Muestra NR

- 1 9
- 2 10
- 3 11
- 4 12
- 5 13
- 6 14
- 7 15
- 8

Muestra NR

- 16 24
- 17 25
- 18 26
- 19 27
- 20 28
- 21 29
- 22 30
- 23

Muestras extra:

- 31
- 32
- 33
- 34
- 35

ANEXO 5

Permiso de Colecta SAGRAPA



SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA,
DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN

COMISION NACIONAL DE ACUACULTURA Y PESCA
DIRECCION GENERAL DE ORDENAMIENTO
PESQUERO Y ACUÍCOLA

- 2 -

3039

I. Objetivos específicos:

- a) Buscar cuando menos 5 microsatelites como marcador molecular, con loci polimórficos en *T. testudinum*.
- b) Analizar con estos marcadores, los genotipos de *T. testudinum* en diferentes sitios de México.
- c) Determinar la conectividad genética, y el flujo de genes de *T. testudinum* a nivel geográfico.
- d) Relacionar la diversidad genética de las poblaciones con su esfuerzo de reproducción sexual.

3a. Este permiso es intransferible y se otorga a favor de la Dra. Brigitta Ine Van Tussenbroek, Jefa de la Unidad Académica de Puerto Morelos del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM, en su calidad de investigadora responsable del proyecto, quien a su vez contará con la colaboración del Cand. a Dr. Jent Kornelis van Dijk (alumno de doctorado), del Programa de Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Académica Puerto Morelos, del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM y el Biol. Daniel Gasca Flores, Técnico Académico Asoc. de la misma Unidad Académica.

4a. La vigencia del permiso será del 17 de septiembre del 2004 al 16 de septiembre del año 2005.

Para la continuación de las siguientes fases del proyecto, se requerirá la presentación del informe de avance del proyecto anual y la solicitud de un nuevo permiso, misma que deberá presentarse con una antelación mínima de 21 días hábiles a la fecha de conclusión de la vigencia del presente permiso.

5a. El área de actividades de campo autorizada serán las aguas de jurisdicción federal del Mar Caribe, específicamente en las costas de la Península de Yucatán, en las siguientes localidades:

	Nombre de la localidad	Estado
1	Xcalac	Quintana Roo
2	Banco Chinchorro	Quintana Roo
3	Majahual	Quintana Roo
4	Tulum	Quintana Roo
5	Puerto Morelos	Quintana Roo



SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA,
DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN

COMISION NACIONAL DE ACUACULTURA Y PESCA
DIRECCION GENERAL DE ORDENAMIENTO
PESQUERO Y ACUÍCOLA

- 3 -

3039

6	Cancún (Nizuc)	Quintana Roo
7	Isla Mujeres	Quintana Roo
8	Ría Lagartos	Yucatán
9	Santa Clara	Campeche
10	Celestun	Yucatán
11	Ciudad del Sol	Campeche
12	Laguna de Términos	Campeche
13	Coatzacoalcos	Veracruz
14	Costa de Oro (Ver.)	Veracruz
15	Cozumel	Quintana Roo
16	Isla Convoy	Quintana Roo
17	Arrecife alacranes	Yucatán
18	Punta Allen (Sian Kaan)	Quintana Roo

6a. Este permiso autoriza la realización de las siguientes actividades:

- I. La colecta de 136 grupos foliales de la especie de pasto marino *Thalassia testudinum*, por medio de buceo o uso de esnorquel, por población autorizada.
- II. La colecta se realizará en la zona adyacente a las playas, manglares o arrecifales a profundidades de 1 a 4 mts, y se cortará por bajo del sustrato, dejando los tejidos subterráneos intactos, y por lo tanto causando un daño mínimo a la pradera.
- III. 100 grupos foliales colectados de la especie de pasto marino *Thalassia testudinum*, servirán para determinar la relación de sexos (masculino: femenino) en diferentes etapas de floración para determinar el desarrollo de las estructuras reproductivas.
- IV. La utilización de embarcaciones rentadas a pescadores o a servidores turísticos de las localidades autorizadas para la colecta o cuando sea posible se solicitará a las Direcciones de las Áreas Naturales Protegidas.

7a. Para el Ejercicio del presente permiso la titular deberá establecer una adecuada coordinación con los siguientes directores de las siguientes Áreas Naturales Protegidas: C. Jaime González Cano, Director y encargado de la Dirección del Parque Nacional Arrecife de "Puerto Morelos" (tel. 01/998-849 7526 imcun@conanp.gob.mx); C. Ma. Carmen García Rivera, "Banco Chinchorro" y Parque Nacional "Arrecifes de Xcalak" (01/998/ 849 4852 chinchor@conanp.gob.mx); C. Francisco Ursúa Guerrero, "Sian Ka'an" (tel. 01/998/ 849 7554 Siankaan@conanp.gob.mx); René Kantún Palma, "Ría



SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA,
DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN

COMISION NACIONAL DE ACUACULTURA Y PESCA
DIRECCION GENERAL DE ORDENAMIENTO
PESQUERO Y ACUÍCOLA

3039

- 4 -

Lagaratos" y Parque Nacional "Arrecife Alacranes" y José Rodríguez de la Gala "Ría Celestún". (01999/ 938 0708 ó 926/ 0077/ 926 4618 lagartos@conanp.gob.mx, celestun@conanp.gob.mx); C. Francisco Remolina Suárez, "Yum Balam" (01 998/ 849 4495 yumbalam@conanp.gob.mx); C. Humberto Reyes Gómez "Laguna de Términos" (01/938 382 6270 reyes@conanp.gob.mx); C. Jaime González Cano, Costa Occidental de Isla Mujeres, Punta Cancún y Punta Nizuc", "Isla Contoy", y "Arrecifes de Puerto Morelos" (01/ 998 849 7526 imcun@conanp.gob.mx); C. Roberto Cudney Bueno, "Arrecifes de Cozumel" (01/ 987 872 4275/ 872 4689 acozumel@conanp.gob.mx); y C. Alfredo Arellano Guillermo, "Tulum" (01/998 849 7525/ 497554 xiregion@conanp.gob.mx), para presentar el programa de actividades y lista de participantes y fechas que se pretenden ingresar a las Áreas Naturales Protegida pudiendose asignar personal de las ANP's que los acompañen durante los trabajos de campo y deberá enviar por escrito y utilizando cualquier medio el programa de trabajo a la Delegación Federal de la SEMARNAT en el Estado de Q. Roo (tel. 01 983- 8350222/ 8350226).

- 8a. El investigador responsable de la ejecución del proyecto queda obligado a:
- I. Conservar el presente permiso durante las operaciones de campo y mostrarlo a las autoridades competentes que se lo soliciten.
 - II. Permitir y facilitar las tareas de inspección que en su caso llegaran a realizar las autoridades competentes.
 - III. Enviar un informe preliminar de las actividades de investigación realizadas, así como una descripción general de la información obtenida y su disponibilidad. De la misma forma, deberán enviar copia de los resultados finales o de cualquier resultado generado al amparo de este permiso a mas tardar el 16 de octubre del año 2005.
 - IV. El personal y las embarcaciones consideradas en las actividades de colecta científica, deberán portar durante los trabajos de campo algún distintivo de la Unidad Académica Pto. Morelos del ICMYL; así como un banderín que contenga la leyenda "Investigación en Proceso". (para evitar denuncias e interpretaciones erroneas)

9a. Queda estrictamente prohibido:

- I. El uso de redes de arrastre en bahías y esteros.



COMISION NACIONAL DE ACUACULTURA Y PESCA
DIRECCION GENERAL DE ORDENAMIENTO
PESQUERO Y ACUÍCOLA

3039

SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA,
DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN

- 5 -

- II. La colecta de cualquiera de las especies incluidas en la Norma Oficial Mexicana Nom-059-ECOL-2001, que determina las especies y subespecies de flora y fauna silvestres, terrestres y acuáticas en peligro de extinción, amenazadas, sujetas a protección especial, y probablemente extintas en el medio silvestre, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 6 de marzo de 2002.
- 10a. Este permiso se concede sin perjuicio de los permisos o autorizaciones que requieran de otras autoridades competentes.
- 11a. El presente permiso y sus efectos, se extinguirán por cualquiera de las causas señaladas en los artículos 16, 17, 18 de la Ley de Pesca o por incumplimiento de las obligaciones que le impone el mismo.

A T E N T A M E N T E
S U F R A G I O E F E C T I V O . N O R E L E C C I O N
D I R E C T O R G E N E R A L



PRISCILIANO MELENDREZ BARRIOS

- C.c.p. Ramón Corral Ávila, Comisionado Nacional de Acuacultura y Pesca.- Presente.
- C.c.p. Dr. Guillermo Compeán Jiménez, Director en Jefe del Instituto Nacional de la Pesca.- Presente.
- C.c.p. Vicealmirante CG. DEM Alberto Castro Rosas, Jefe del Estado Mayor General, Eje Oriente H. Escuela Naval militar No. 861 Col. Cipreses Del. Coyoacán, 04830 México, D.F.
- C.c.p. Dr. Rafael Solana Sansores, Director General de Investigación Pesquera en el Atlántico, Instituto Nacional de la Pesca.-presente.
- C.c.p. Dr. Felipe Ramírez Ruiz de Velasco, Director General de Vida Silvestre, SEMARNAT.- Presente.
- C.c.p. Lic. Luis Miguel López Moreno, Director General de Política Pesquera y Acuícola.- Presente
- C.c.p. Cap. de Navío C.G.D.E.M. Virgilio Octavio Juárez Medina, Director General de Inspección y Vigilancia de la CONAPESCA.- Presente
- C.c.p. Ing. Rene Almeida, Delegado Federal de la SAGARPA en el Estado de Quintana Roo.- Chetumal, Q. Roo.
- C.c.p. Biol. J. Manuel Cárdenas Magaña, Subdelegado Federal de Pesca de la SAGARPA en el Estado de Quintana Roo.- Chetumal, Q. Roo.
- C.c.p. Encargado de la Dirección del CRIP-Puerto Morelos del I.N.P.- Presente
PMB*DMRM