

Centro de Investigacion Cientifica y de  
Educacion Superior de Ensenada

ANALISIS GENETICO POBLACIONAL  
DEL PEZ ESPADA *Xiphias gladius*  
EN EL OCEANO PACIFICO

TESIS  
DOCTORADO EN CIENCIAS

JOSE MANUEL GRIJALVA CHON

*Ensenada, Baja California, Mexico. Enero de 1993.*

RESUMEN de la Tesis de José Manuel Grijalva Chon presentada como requisito parcial para la obtención del grado de DOCTOR EN CIENCIAS en OCEANOLOGÍA con opción en ECOLOGÍA MARINA. Ensenada, Baja California, México. Enero de 1995.

## ANÁLISIS GENÉTICO POBLACIONAL DEL PEZ ESPADA (*Xiphias gladius*)

Con el objetivo de analizar la variabilidad genética y determinar si existe más de una población en el pez espada (*Xiphias gladius*) del Pacífico, se utilizaron las técnicas de ADN mitocondrial (ADNmt) y electroforesis de proteínas.

En el caso del ADNmt se analizaron 47 organismos del Pacífico Norte Occidental (Japón y Mar de China), 42 del Central (Hawai) y 59 del Oriental (México), utilizando 17 endonucleasas de restricción de seis bases. Se revelaron un total de 27 genotipos compuestos y el 50% o más de los individuos de cada área compartieron el genotipo más común. Las diversidades de nucleón y de nucleótido fueron 0.637 y 0.0019, respectivamente y la divergencia de la secuencia de nucleótidos media fue de 0.88% (intervalo 0.11-2.80%). Las diferencias de nucleótido y el valor de *Gst* mostraron valores muy bajos. No se detectaron diferencias en las frecuencias genotípicas de acuerdo a la prueba *G* y al análisis de Monte Carlo con 1000 réplicas. Esto nos llevó a la conclusión preliminar de que existía un suficiente flujo de genes a través del Pacífico Norte para evitar la diferenciación genética y que la hipótesis de que el pez espada representaba un simple stock genético no podía ser rechazada.

Por otro lado, el análisis electroforético de proteínas se llevó a cabo en 44 organismos de Hawai y en 50 de México. Este análisis se llevó a cabo con 16 sistemas proteínicos, los cuales codificaron 28 loci. Cinco de ellos fueron polimórficos: *ODH\**, *IDH-2\**, *GPI-A\**, *PROT-2\** y *PROT-3\**. La diversidad de gene promedio para las localidades combinadas fue de 0.028, mientras que la distancia genética sobre todos los loci fue de 0.004. El locus *GPI-A\** mostró una deficiencia de heterocigotos, mientras que *IDH-2\** mostró un exceso; el coeficiente de endogamia (*Fis*) promedio fue negativo. Se detectaron diferencias en las frecuencias alélicas entre ambas localidades y de acuerdo a la varianza estandarizada de estas frecuencias (*Fst*) el 9% de la variación total se debe a



la diferenciación genética entre México y Hawai. Estos resultados son incongruentes con el análisis del ADNmt. Nuestra hipótesis es que algún tipo de selección mantiene la heterogeneidad a pesar del flujo genético.



## ABSTRACT.

To analyze the genetic variability in Pacific swordfish (*Xiphias gladius*), and to prove the existence of more than one population, both mitochondrial DNA (mtDNA) and protein electrophoresis analysis were carried out.

In the case of mtDNA, 47 organisms from Western (Japan and China Sea), 42 from Central (Hawaii), and 59 from Eastern North Pacific were analysed, using 17 six-base pair restriction endonucleases. A total of 27 composite mtDNA genotypes were revealed, and 50% or more of individuals from each area shared the most common composite genotype. Pooled nucleon diversity and nucleotide diversity were 0.637 and 0.0019, respectively, and the mean nucleotide sequence divergence among genotypes was 0.88% (rank 0.11 to 2.80%). Both nucleotide differences between populations and *Gst* analysis revealed low values. No significant geographic variation in genotypic frequencies was revealed by *G*-test and Monte Carlo randomization analysis with 1000 replicates. The preliminary conclusion was that has had sufficient gene flow across the North Pacific to prevent genetic differentiation and the one stock hypothesis could not be rejected.

In the other hand, the protein electrophoresis analysis was carried out on 44 organisms from Hawaii and 50 from Mexico. Starch gel analysis of 16 protein systems, which encoded 28 presumptive loci, revealed five polymorphic loci: *ODH\**, *IDH-2\**, *GPI-A\**, *PROT-2\**, and *PROT-3\**. Pooled gene diversity was 0.029, whereas mean genetic distance over all loci was 0.004. *GPI-A\** showed heterozygote deficiency and *IDH-2\** showed heterozygote excess; the mean inbreeding coefficient (*Fis*) was negative. There were differences in allelic frequencies among localities, and according to its standardized variance (*Fst*), 9% of total variation was explained as genetic differentiation between Mexico and Hawaii. The results are inconsistent with mtDNA restriction analysis. I hypothesize that some kind of selection supports heterogeneity in the face of genetic flow.





CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE  
EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA.

DIVISIÓN DE OCEANOLOGÍA.  
DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA MARINA.

ANÁLISIS GENÉTICO POBLACIONAL DEL PEZ ESPADA  
(*Xiphias gladius*) EN EL OCÉANO PACÍFICO.

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para  
obtener el grado de DOCTOR EN CIENCIAS presenta:

JOSÉ MANUEL GRIJALVA CHON.

Ensenada, Baja California, México. Enero de 1995.

**DEDICATORIA.**

**Definitivamente este trabajo no hubiera sido posible si mis hijas, Jessica y Marisol, no me hubieran prestado algo que nunca les podré pagar: SU TIEMPO. A ellas dedico este trabajo.**



## AGRADECIMIENTOS.

- A la Universidad de Sonora por el impulso y apoyo recibido para la realización de mis estudios de doctorado.

- Al CICESE por abrirme sus puertas y por haberme apoyado económicamente, a través de la División de Oceanología, para la realización de mi estancia en la Universidad de Tokio.

- Al CONACyT por su apoyo económico.

- A mis directores de tesis, Dr. Oscar Sosa Nishizaki (CICESE) y Dr. Jorge de la Rosa Vélez (UABC, Facultad de Ciencias Marinas) por su entusiasmo, confianza y conocimientos recibidos.

- A mis sinodales, Dra. Ana María Ibarra (Centro de Investigaciones del Noroeste, La Paz, B.C.S.), Dra. María Teresa Viana (UABC, Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Ensenada, B.C.) y Dr. Raúl Castro (CICESE) por sus valiosos comentarios.

- A las siguientes personas por la ayuda prestada en la toma de muestras: Ing. Rubén de la Rosa Pacheco (Cámara Nacional de la Industria Pesquera, Sección Especializada en Pesca de Pez Espada), Dr. Robert Skillman y Sr. James Uchiyama (National Marine Fisheries Service, Honolulu Laboratory) y Dr. Seinen Chow (National Research Institute of Far Seas Fisheries, Shimizu, Japón).

- Al Dr. Kenichi Numachi por su amabilidad y los conocimientos recibidos durante mi estancia en el Instituto de Investigaciones Oceánicas de la Universidad de Tokio.

- Al Sr. Yutaka Akimoto y a la Dra. Hana Suzuki por su ayuda en el laboratorio durante el análisis del ADN mitocondrial, así como a los M.C. Clemente Jiménez y Miguel Angel Cervantes por su ayuda en el laboratorio durante el análisis de alozimas.

- A los Doctores John Graves (Virginia Institute of Marine Science, School of Marine Science), Blaise Eitner (National Marine Fisheries Service, La Jolla, California),



**Ken-ichi Numachi (Tokai University, Faculty of Science and Technology, Shimizu, Japón)**  
**y Seinen Chow (National Research Institute of Far Seas Fisheries, Shimizu, Japón)** por sus  
valiosos comentarios.

•Al Oc. César Octavio Almeda Jáuregui por sus valiosas asesorías en cuanto al  
manejo de los diferentes paquetes computacionales.

•A Reina Castro Longoria, mi esposa, para quien la frase “no se puede” no existe.



## PREFACIO.

Deseo en este espacio hacer algunos comentarios con relación a la estructura de esta tesis. En el Capítulo I se define el marco conceptual sobre el cual descansa la razón de ser de este trabajo. De esta forma empiezo con la definición de stock, sin tratar de dar detalles sobre la evolución del concepto en sí, ya que esto está suficientemente analizado y discutido en la literatura disponible. Existen varios métodos que se utilizan, o utilizaron, para la caracterización de stocks, sin embargo, sólo explico en detalle los métodos genéticos que se aplicaron en esta tesis. En el Capítulo II se presenta cual es la problemática a resolver y los objetivos del trabajo. Los Capítulos III y IV corresponden a la aplicación de los métodos genéticos para tratar de resolver el problema planteado para el pez espada. Cabe aclarar que estos capítulos corresponden a las versiones en Español de los manuscritos “Mitochondrial DNA analysis of North Pacific Swordfish (*Xiphias gladius*) population structure” y “Allozyme evidence of genetic heterogeneity within North Pacific swordfish (*Xiphias gladius*, L.)”, respectivamente. El manuscrito correspondiente al análisis del ADN mitocondrial se encuentra actualmente en prensa en la revista Marine Ecology Progress Series, mientras que el correspondiente al análisis de alozimas fue sometido al Journal of Fish Biology. Es por esto que en las introducciones de los Capítulos III y IV se encontrará información que es inevitablemente repetitiva con algunos datos expresados en los dos primeros capítulos de esta tesis. Esto se trató de evitar al máximo. En el Capítulo V, a manera de epílogo, expongo las conclusiones generales.

Para las personas que no están familiarizadas con los términos utilizados en genética de poblaciones, he anexado un glosario. Los términos escritos en **negritas** en el



texto son explicados en dicho glosario. Además, incluyo la traducción en Inglés de los términos ya que en algunos casos no existe un equivalente “oficial” para el Español y pienso que esto ayudará a ubicar dichos términos.



## CONTENIDO.

	<u>Página</u>	
I	INTRODUCCIÓN.	1
	I.1 El concepto de stock.	1
	I.2. Métodos genéticos para evaluación de stocks.	3
II	PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA.	10
	II.1 Generalidades biológico-pesqueras.	10
	II.2. Objetivo.	13
III	ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA POBLACIONAL A PARTIR DEL ADN MITOCONDRIAL.	14
	III.1 Introducción.	14
	III.2 Material y métodos.	16
	III.3 Resultados.	19
	III.4 Discusión.	21
IV	EVIDENCIA DE HETEROGENEIDAD GENÉTICA A PARTIR DE ALOZIMAS.	25
	IV.1 Introducción.	25
	IV.2 Material y métodos.	26
	IV.3 Resultados.	29
	IV.4 Discusión.	33
V	CONCLUSIONES GENERALES.	38
	LITERATURA CITADA	40

## CONTENIDO (Continuación).

		<u>Página</u>
APÉNDICE A.	Glosario.	57
APÉNDICE B.	Protocolos del análisis RFLP.	66
APÉNDICE C.	Patrones de los fragmentos de restricción resultantes del análisis del ADNmt. Los tamaños de los fragmentos son en pares de bases.	79
APÉNDICE D.	Matriz del porcentaje de la secuencia de divergencia (arriba de la diagonal) y del número de los fragmentos compartidos (abajo de la diagonal) entre los 27 haplotipos del pez espada. Los valores sobre la diagonal se refieren a los fragmentos para cada haplotipo.	80
APÉNDICE E.	Sistemas enzimáticos.	81

## LISTA DE FIGURAS.

<u>Figura</u>		<u>Página</u>
1	Pez espada, <i>Xiphias gladius</i> .	11
2	Mapa del Pacífico Norte mostrando los sitios de colecta y el tamaño de muestra.	17



## LISTA DE TABLAS.

<u>Tabla</u>		<u>Página</u>
I	Distribución de haplotipos en el pez espada del Pacífico Norte. Las letras de los genotipos compuestos denotan, de izquierda a derecha, los patrones de digestión para: <i>KpnI</i> , <i>BglII</i> , <i>DraI</i> , <i>PvuII</i> , <i>ApaI</i> , <i>SmaI</i> , <i>SacI</i> y <i>SacII</i> .	20
II	Diversidades de nucleón y de nucleótido en cinco especies de picudos. E.S.=error estándar.	22
III	Sistemas proteínicos y loci resueltos en el pez espada del Pacífico Norte. C.E.=Número asignado por la Comisión de Enzimas (IUBNC, 1984).	28
IV	Variación genética del pez espada del Pacífico Norte. Error estándar entre paréntesis.	30
V	Frecuencias alélicas, heterocigosis y frecuencias fenotípicas esperadas de acuerdo a la ley de Hardy-Weinberg en los cinco loci polimórficos. Número de organismos entre paréntesis. La diferencia en el tamaño de muestra se debe a la inactivación de las enzimas en algunos organismos.	31
VI	Distancia genética, prueba G de máxima verosimilitud para las frecuencias alélicas y la estadística F en los cinco loci polimórficos del pez espada.	32



# ANÁLISIS GENÉTICO POBLACIONAL DEL PEZ ESPADA (*Xiphias gladius*) EN EL OCÉANO PACÍFICO.

## I. INTRODUCCIÓN.

### I.1 El concepto de stock.

Desde los inicios de la Ciencia Pesquera en la segunda mitad del siglo pasado, hasta nuestros días, el concepto de stock ha sufrido cambios sustanciales. De una manera más simple, los recursos pesqueros o stocks podían definirse con una base geográfica, dependiendo del radio de acción de la flota o la distribución geográfica del recurso, o bien de acuerdo a la vulnerabilidad para un cierto tipo de arte de pesca (Gauldie, 1991). Sin embargo, estas formas de definir a los stocks representaban formas muy generales y dejaban fuera todos los aspectos que implican una identidad con un sentido más biológico.

Aunque todavía existen quienes consideran a los stocks como meras unidades de explotación (Royce, 1984), el interés mundial de poder definir a los stocks con una base biológica está reflejado en las memorias del Symposium sobre el Concepto de Stock (Berst y Simon, 1981). Ihssen *et al.* (1981) definen stock como un grupo intraespecífico de individuos que se reproducen al azar con integridad espacial y temporal. Desde un punto de vista pesquero, esta integridad se refiere a una homogeneidad en las tasas de reclutamiento, crecimiento y mortalidad (Cushing, 1968). Desde el punto de vista genético, la integridad implica un acervo genético en común que debe mantenerse diferenciado de otros stocks (Kutkuhn, 1981). Es importante mencionar que términos como deme, raza y subpoblaciones se han utilizado para describir unidades poblacionales equivalentes a stock (Horrall, 1981).

En la conceptualización moderna de stock, la genética es importante ya que la



identificación por otros métodos, como el análisis de parámetros poblacionales, marcado-recaptura, fisiología y comportamiento, morfometría, merística, estructuras calcificadas y citogenética tienen dificultades implícitas que les restan confiabilidad (Ihssen *et al.* 1981). Una de estas dificultades es que, en la variación fenotípica, el medio ambiente ejerce una influencia que en la gran mayoría de los casos es imposible de cuantificar (Ihssen *et al.* 1981; Allendorf *et al.* 1987).

A partir del inicio del último cuarto de este siglo se ha dado atención a la genética en la administración de los recursos pesqueros. Los estudios de genética de poblaciones han encontrado eco en pesquerías, ya que en algunos casos la separación entre las poblaciones o stocks de una especie no es muy evidente. A partir de los años cincuenta los métodos bioquímicos empiezan a incursionar dentro de la problemática de diferenciación de poblaciones, primero como estudios complementarios hasta ocupar hoy en día un lugar preponderante como herramienta de trabajo (Utter, 1991) y se ha demostrado con mucho la gama de problemas específicos que se pueden resolver (Wirgin y Waldman, 1994). Sin embargo, todavía en la década de los ochentas se reconocía una deficiencia en la interacción genética-recursos pesqueros (MacLean y Evans, 1981; Allendorf *et al.* 1987). Aunque se insistía que una buena administración de los recursos y los exitosos programas de conservación no debían de dejar de lado los aspectos genéticos (Ryman, 1981; Allendorf *et al.* 1987), parecía ser que esto sólo lo sabían los genetistas poblacionales. Afortunadamente esta mentalidad está cambiando a medida que se van desarrollando técnicas bioquímicas con mayor resolución en la identificación de genotipos y por el incrementado interés en el manejo adecuado y la conservación de los recursos pesqueros.

## I.2 Métodos genéticos para evaluación de stocks.

Para la caracterización de stocks o poblaciones, el método electroforético de proteínas ha sido el que ha ocupado un lugar importante debido a su versatilidad y resolución (Utter *et al.* 1974, 1987; Ihssen *et al.* 1981). Para la caracterización de poblaciones es importante medir las **frecuencias alélicas** (Utter *et al.* 1987). El fundamento del método electroforético se basa en las cargas eléctricas netas de las proteínas, las cuales responden al campo eléctrico que se hace fluir a través del gel. Estas cargas netas dependen del pH del amortiguador en el cual se encuentran las proteínas en solución (Richardson *et al.* 1986). En base a esto es importante tomar en cuenta las siguientes consideraciones (Leary y Booke, 1990):

a) La composición de **aminoácidos** y la carga eléctrica de una **proteína** son características genéticamente determinadas y la variación de esos atributos puede ser usada para obtener una idea de la divergencia genética que existe entre poblaciones.

b) Las proteínas pueden estar compuestas de múltiples cadenas polipeptídicas, influyendo esta estructura sobre el número de estados cargados que una proteína puede poseer en un individuo y por lo tanto sobre el número de componentes que podrán ser separados por electroforesis.

c) Es posible determinar con seguridad las posiciones de enzimas particulares en una electroforesis ya que ellas catalizan reacciones químicas altamente específicas y para lo cual se han formulado tinciones.

En relación al último punto, lo que observamos al final de una corrida electroforética es una serie de bandas indicando la presencia de una enzima particular. Las tinciones

bioquímicas formuladas que permiten visualizar esas bandas en el gel contienen el sustrato específico para la enzima y un colorante que precipita cuando ocurre la reacción (Hartl, 1988).

Existen cuatro métodos principales utilizados en la electroforesis de proteínas, siendo el medio de soporte (gel) la diferencia entre ellos (Murphy *et al.* 1990). Estos medios de soporte son: almidón, poliacrilamida, acetato de celulosa y agarosa. No es posible jerarquizar entre estos medios de soporte ya que cada uno tiene sus propias ventajas y desventajas y la opción depende de los recursos disponibles y de la experiencia y gusto personal (Murphy *et al.* 1990; Leary y Booke, 1990; Richardson *et al.* 1986). El método del gel de almidón ha sido el más utilizado hasta la fecha en estudios poblacionales de peces (por ejemplo: Alves y Coelho, 1994; Gold *et al.* 1994; Toline y Baker, 1994) y entre sus ventajas principales están el bajo costo y la capacidad de obtener varias rebanadas horizontales de un sólo gel que permiten analizar diferentes enzimas en una sola corrida (Aebersold *et al.* 1987).

La electroforesis de proteínas ha llegado a ser un método estándar y de relativa sencillez de uso, pudiendo generar rápidamente grandes volúmenes de datos de **genotipos** y frecuencias de alelos entre las presuntas poblaciones. La literatura en relación a la utilidad de este método en estudios de peces es basta. Allendorf y Utter (1979) presentan un buen análisis de la genética de poblaciones de peces con base en estudios electroforéticos, desde sus inicios hasta los años setenta. Este método ha sido extensivamente utilizado durante los ochentas, y aún en los noventas, para verificar el número de poblaciones de peces presentes en áreas determinadas del océano o zonas costeras (Richardson, 1982a, 1982b; Beckwitt,



1983; Grant, 1984; Shaklee, 1984; Ramsey y Wakeman, 1987; Crawford *et al.* 1988; Wakeman y Ramsey, 1988; Hedgecock *et al.* 1989; Alves y Coelho, 1994; Gold *et al.* 1994; Toline y Baker, 1994; entre otros). Esta técnica también ha sido útil para calcular la contribución porcentual de varias poblaciones de una misma especie que confluyen en un área determinada. Un ejemplo típico es el caso de los salmones, en donde existe una pesquería en alta mar que abarca varias poblaciones simultáneamente, lo que se conoce como pesquería mezclada (Pella y Milner, 1987; Grant *et al.* 1980; Beacham *et al.* 1985a, 1985b).

Los estudios de sistemática de peces también se vieron enriquecidos por las herramientas genéticas disponibles (Avise, 1974). Con ayuda de la técnica electroforética de proteínas has sido posible revisar las relaciones filogenéticas intrafamiliares (Johnson, 1975; Graves y Somero, 1982; Lee y Chao, 1990) e inclusive ha sido posible detectar nuevas especies (Shaklee *et al.* 1982; Leavery y Shaklee, 1991) y proponer subespecies (Fairbairn, 1981). Por otro lado, también ha sido posible resolver controversias en relación a la presencia de especies en áreas de pesca determinadas (Wilson y Alberdi, 1991).

El lugar que ocupa un gen en un cromosoma se conoce como locus (en plural loci) y los alelos son las diferentes formas de un gen en un locus determinado (Utter *et al.* 1987). Para que se puedan obtener datos confiables es necesario analizar al menos 50 individuos y 30 loci (Utter *et al.* 1987). La precisión en el cálculo de las frecuencias alélicas esta estrechamente relacionada con el número de organismos muestreados, por esto no se recomiendan tamaños de muestra pequeños.

Mientras que las distancias detectadas electroforéticamente entre poblaciones son



indicadores positivos de las diferencias genéticas, la ausencia de diferencias no puede ser atribuida a identidad genética al nivel del ADN (Utter *et al.* 1987). Esto se debe a que no todas las sustituciones de las bases en el ADN resultan necesariamente en sustituciones de aminoácidos en las proteínas, además no todos los cambios en aminoácidos llegan a ser detectados por la electroforesis (Awise, 1974; Utter *et al.* 1987; Hartl, 1988). Para resolver este problema, durante la década pasada se desarrollaron técnicas con un gran poder de resolución que implican el uso de **endonucleasas de restricción** (Ferris y Berg, 1987). Estas enzimas cortan el ADN en sitios específicos de reconocimiento, produciendo fragmentos de diferentes longitudes. En esta técnica el ADN utilizado es el que se encuentra en las mitocondrias.

El ADN mitocondrial (ADNmt) es una molécula circular de 15,000 a 18,000 pares de bases de longitud en los vertebrados y codifica dos ARN ribosomales, 22 ARN de transferencia, 13 polipéptidos y la región control de replicación (Ferris y Berg, 1987). Aunque el ADNmt contribuye con menos del 1% del genoma total de cada célula, posee dos características importantes: una elevada tasa de evolución y se hereda (con contadas excepciones) por vía materna (Brown *et al.* 1979). El ADNmt evoluciona de 5-10 veces más rápido que el ADN nuclear, proporcionando por lo tanto una visión amplificada de las diferencias entre poblaciones. Esta alta tasa evolutiva se ha atribuido a la combinación de dos factores: una elevada tasa de **mutación** y una elevada tasa de fijación de esas mutaciones. Esto puede ser favorecido por una deficiencia, o inclusive carencia, de una efectiva función editora en el complejo de replicación y de un sistema reparador eficiente (Brown *et al.* 1979). Este descubrimiento fue de vital importancia y con una gran utilidad



práctica. La técnica estándar de electroforesis de proteínas fue el único método utilizado en los años setenta para medir la distancia genética entre especies o poblaciones, sin embargo las diferencias tenían que acumularse sobre un largo período de tiempo evolutivo para que pudieran ser detectadas. Debido a la alta tasa de evolución del ADNmt, cambios pequeños generados relativamente poco tiempo atrás podían ahora ser detectados y medidos.

La herencia por vía materna es posible ya que las mitocondrias del espermatozoide se encuentran en la cauda, la cual queda fuera del óvulo en la fecundación. Esta transmisión permite el seguimiento de líneas maternas ya que el genoma mitocondrial no experimenta recombinación. Esto no significa que la participación paterna sea completamente excluida ya que Gyllesten *et al.* (1991) demostraron que en repetidas retrocruzas híbridas en ratones la frecuencia de transmisión paterna era del orden de 1 en 1000. En la naturaleza es difícil un caso similar de retrocruzas en esa magnitud, sin embargo este descubrimiento derrumbó el dogma de la herencia materna exclusiva del ADNmt.

La utilización del ADNmt como herramienta genética en estudios poblacionales se realiza por medio del método conocido como **Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción** o RFLP por sus siglas en inglés. Esto implica el uso de enzimas de restricción que reconocen una corta secuencia específica de bases (cuatro, cinco o seis) del ADN y rompen la cadena en un sitio de la secuencia. Las enzimas de restricción que reconocen secuencias grandes producirán un menor número de fragmentos, ya que estas secuencias estarán presentes en un menor número de veces en el genoma. Típicamente, las enzimas de restricción que reconocen una secuencia de seis bases producirán de uno a ocho fragmentos de ADNmt, mientras que las que reconocen cuatro bases producirán de tres a seis

veces más fragmentos que las hexonucleasas (Ferris y Berg, 1987; Tegelström, 1992). De esta forma, utilizando varios tipos de enzimas, se obtiene una serie de fragmentos de diferentes tamaños que se pueden separar por electroforesis. Obviamente, el número de fragmentos producidos será equivalente al número de sitios de reconocimiento que tenga una molécula de ADNmt de un organismo dado (Avisé y Lansman, 1983). Esto complementa la baja resolución de la técnica de electroforesis de proteínas. Dada la especificidad de las endonucleasas, cualquier cambio al nivel de bases dentro de la secuencia de reconocimiento, es decir una mutación puntual, es detectado, produciéndose una pérdida o una ganancia para la restricción enzimática. Comparando la ubicación de los sitios de restricción o bien comparando el tamaño de los fragmentos producidos, es posible obtener el grado de similitud (o divergencia) genética entre especies relacionadas o entre las diferentes poblaciones de una especie.

El primer estudio en peces que utilizó el análisis de restricción del ADNmt para definir poblaciones fue el de Graves *et al.* (1984), quienes no encontraron diferenciación genética entre los barriletes (*Katsuwonus pelamis*) del Atlántico y del Pacífico. Graves y Dizon (1986) propusieron que cualquier consideración administrativa de los barriletes que implique la separación de la población en diferentes unidades, debe estar basada en criterios no genéticos. Por esto se entiende que sólo se implicarían criterios jurisdiccionales y aspectos de conservación del recurso.

Después de 1984, el uso del ADNmt en estudios poblacionales de peces se ha venido incrementando poco a poco. Estos estudios han venido a confirmar resultados preliminares de identificación de stocks (Kornfield y Bogdanowicz, 1987; Hanzawa *et al.* 1987; Graves y



Dizon, 1989), a poner en evidencia las diferencias que por otros métodos no era posible discernir (Awise *et al.* 1986; Kornfield, 1986; Ward *et al.* 1989; Seyoum y Kornfield, 1992; Mulligan *et al.* 1992) o eliminar las diferencias que otros métodos proponían (Graves y Dizon, 1989; Shields *et al.* 1990; Numachi *et al.* 1990). Como es de suponerse, la versatilidad y grado de resolución de esta técnica también fue de gran importancia en la solución de los problemas de pesquerías mezcladas (Ferris y Berg, 1987; Bermingham *et al.* 1991; Birt *et al.* 1991; Nolan *et al.* 1991) y en estudios filogenéticos (Dowling y Brown, 1989; Bowen y Awise, 1990; Grewe *et al.* 1990).

Los datos obtenidos por electroforesis de proteínas y por el estudio del ADNmt son altamente complementarios (Allendorf *et al.* 1987). Pocos son los trabajos que comparan directamente ambas metodologías. La tendencia general ha sido probar la metodología del ADNmt tiempo después del análisis electroforético de proteínas. Esto es obvio si tomamos en cuenta que primero se desarrolló la técnica electroforética. El poder analizar ambas metodologías simultáneamente en una especie determinada permite la posibilidad de conocer el alcance de la electroforesis de proteínas en el reconocimiento de poblaciones de esa especie.



## II. PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA.

### II.1 Generalidades biológico-pesqueras del pez espada.

Un caso de sumo interés para resolver en pesquerías y que concierne a México es el pez espada, *Xiphias gladius* (Figura 1). Este pez es una de las doce especies de picudos, los cuales son de interés comercial y deportivo (Nakamura, 1983). El pez espada puede ser considerada una especie cosmopolita y su límite de distribución latitudinal está entre los 45°N y 45°S, con extensiones de hasta los 60°N (Nakamura, 1983).

Nakamura (1983) en su extensa revisión sobre los picudos, sitúa al pez espada como la única especie de la familia Xiphiidae, el resto de las especies las agrupa en la familia Istiophoridae. Además sugiere que la similitud entre ambas familias se debe a una simple convergencia adaptativa. Sin embargo, Nelson (1994) propone que los picudos se agrupen en la familia Xiphiidae y ésta a su vez se divida en dos subfamilias: Xiphiinae, en donde se incluye al pez espada; e Istiophorinae con todas las demás especies. Esta propuesta la hace con base en que las semejanzas entre ambas familias no son una mera convergencia sino rasgos que involucran una divergencia a partir de un ancestro en común.

La pesquería de picudos en aguas mexicanas data de inicios de los años sesenta, cuando la flota palangrera japonesa incursionó en nuestras aguas (Polanco-Jaime *et al.* 1987). De hecho, una de las cinco áreas de agregación del pez espada en el Océano Pacífico se encuentra en aguas frente a Baja California (Sakagawa, 1989). A la fecha se han realizado excelentes evaluaciones pesqueras del estado del recurso, sin embargo en ninguna de ellas la designación de stock tiene una base genética. Bartoo y Coan (1989) realizaron la evaluación

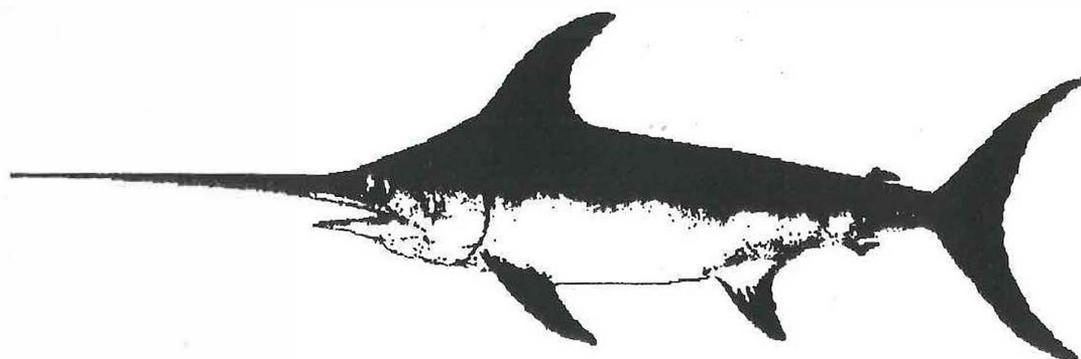


Figura 1. El pez espada, *Xiphias gladius*.



del recurso a partir de datos de captura por unidad de esfuerzo tomando como base dos hipótesis: el pez espada se compone de uno o tres stocks. En el caso de tres stocks, éstos estarían confinados al Pacífico Noroeste, Suroeste y Este, con la designación de los límites en una forma más bien arbitraria. La conclusión de estos autores es que para ambas hipótesis el estado del recurso es bueno. Skillman (1989a) consideró que el pez espada del Pacífico consistía de un stock, el cual se encontraba en una buena condición. Este autor propuso que el Pacífico Noroeste podía considerarse como un área índice ya que fue ahí en donde se concentraba la mayor abundancia del recurso. Más recientemente, Sosa-Nishizaki y Shimizu (1991) presentan cuatro áreas de agregación muy importantes, definidas con base en los datos de captura de la flota pesquera japonesa. Estas áreas se presentaron a) frente a Japón, en el Pacífico Central y Noroeste; b) frente a la Península de Baja California; c) frente a la costa Oeste de Sudamérica; y d) frente a la costa Este de Australia y Norte de Nueva Zelanda. Estas agregaciones presentaban períodos de expansión y contracción quedando sus límites relativamente cerca, a excepción del correspondiente a Australia y Nueva Zelanda, el cual se mantenía relativamente aislado. Un hecho importante que Sosa-Nishizaki (1990) reporta es que las hembras que se encontraban en Baja California no presentaban evidencias de madurez sexual avanzada ni se encontraron larvas de esta especie. Esto sugería que Baja California podría ser una zona de alimentación y premaduración, sin embargo es importante poder discernir el origen de los organismos presentes en aguas mexicanas. La solución de este problema tendrá fuertes implicaciones desde el punto de vista del manejo y administración de este recurso.



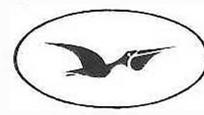
## II.2 Objetivo.

El objetivo de este estudio es analizar la estructura genética poblacional del pez espada, *Xiphias gladius*, en el Océano Pacífico Norte. Esto fue con el fin de conocer la variabilidad genética de este recurso pesquero y comprobar si en realidad existe más de un stock en esta región del Pacífico.

Este estudio se llevó a cabo en dos niveles:

A) El análisis del ADN mitocondrial que se llevó a cabo a través de la determinación del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), lo que permitió obtener una estimación fina de la extensión de la variabilidad genética entre las tres zonas del Pacífico norte estudiadas: Occidental (Japón y Mar de China), Central (Hawai) y Oriental (Baja California).

B) El análisis electroforético de proteínas en gel de almidón que permitió determinar el porcentaje de loci polimórficos, la heterocigosis, la variación en el equilibrio de Hardy-Weinberg, la heterogeneidad de las frecuencias alélicas, la distancia y el grado de diferenciación genética en dos localidades del Pacífico Norte: Central y Oriental.



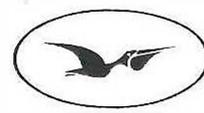
## II.2 Objetivo.

El objetivo de este estudio es analizar la estructura genética poblacional del pez espada, *Xiphias gladius*, en el Océano Pacífico Norte. Esto fue con el fin de conocer la variabilidad genética de este recurso pesquero y comprobar si en realidad existe más de un stock en esta región del Pacífico.

Este estudio se llevó a cabo en dos niveles:

A) El análisis del ADN mitocondrial que se llevó a cabo a través de la determinación del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), lo que permitió obtener una estimación fina de la extensión de la variabilidad genética entre las tres zonas del Pacífico norte estudiadas: Occidental (Japón y Mar de China), Central (Hawai) y Oriental (Baja California).

B) El análisis electroforético de proteínas en gel de almidón que permitió determinar el porcentaje de loci polimórficos, la heterocigosis, la variación en el equilibrio de Hardy-Weinberg, la heterogeneidad de las frecuencias alélicas, la distancia y el grado de diferenciación genética en dos localidades del Pacífico Norte: Central y Oriental.



### III. ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA POBLACIONAL A PARTIR DEL ADN MITOCONDRIAL.

#### III.1 Introducción.

El pez espada (*Xiphias gladius*) es un pez pelágico con una distribución mundial (Nakamura, 1983). Es una especie apreciada, conocida por su carne blanca y firme, sabor agradable y un alto valor en la proporción de carne:hueso (Sakagawa, 1989). Los mayores mercados para el pez espada son Europa oriental, Japón y los Estados Unidos (Sakagawa, 1989). En Japón es una especie cara y se utiliza como *sashimi* o se vende como filetes para ser cocido o frito (Ueyanagi *et al.* 1989). Las capturas de pez espada en el Océano Pacífico representaron el 43% de la captura anual mundial de 43,274 toneladas métricas para el período de 1975-1987 (FAO, 1977, 1983, 1988).

Para evaluar el estatus del pez espada en el Océano Pacífico, varios autores han intentado delimitar fronteras entre stocks putativos. Skillman (1989a) sugirió que había un simple stock. Bartoo y Coan (1989) llevaron a cabo un análisis pesquero basado en la existencia de uno y tres stocks. Sakagawa (1989) mencionó cinco áreas de alta abundancia relacionadas con zonas frontales y Sosa-Nishizaki (1990) sugirió la existencia de cuatro unidades pesqueras en el Pacífico. Estos estudios fueron basados en el análisis de la distribución de las capturas y la necesidad de otros métodos de identificación de stocks ha sido altamente recomendada (Skillman, 1989b).

La utilidad del ADN mitocondrial (ADNmt) para evaluar la estructura de los stocks en peces marinos ya ha sido demostrada (Ovenden, 1990). En los vertebrados, el ADNmt es



una molécula circular cerrada de 15,000 a 18,000 pares de bases (pb). Cada molécula codifica dos ARN ribosomales, 22 ARN de transferencia, 13 proteínas y la región de replicación (Ferris y Berg, 1987). Aunque el ADNmt comprende menos del 1% del genoma total de cada célula, presenta dos características muy importantes: una alta tasa de evolución y una vía materna de transmisión. El hecho de que los genes del ADNmt evolucionan de 5-10 veces más rápido que sus contrapartes nucleares proporciona una visión amplificada de la diferenciación poblacional (Brown *et al.* 1979).

Existen pocos estudios sobre genética poblacional del pez espada. Alvarado-Bremer (1992) realizó un análisis de RFLP de la molécula total del ADNmt con unos pocos organismos capturados en el Océano Atlántico. Este autor propuso la existencia de una estructura poblacional tomando como base los valores de la **divergencia de la secuencia** obtenida (>1.6%), pero su promedio fue bajo, ~0.79%. A una mayor escala, Magoulas *et al.* (1992), trabajando también con toda la molécula, encontraron evidencia de diferenciación entre los peces espada provenientes del Mar Mediterráneo y del Océano Atlántico. Por otro lado, Chow (1992), utilizando el análisis de RFLP en el gen del Citocromo *b* del ADNmt, no encontró evidencia de diferenciación entre los océanos Pacífico e Indo-Pacífico. Finnerty y Block (1992) secuenciaron el gen del Citocromo *b* de un pequeño número de organismos de los océanos Atlántico, Pacífico y Mediterráneo y encontraron baja variación intraespecífica. Por otro lado, análisis de **alozimas** para esta especie no han sido reportados en la literatura.

El objetivo de este capítulo es medir la variabilidad genética intraespecífica y probar que existe una homogeneidad genética en el pez espada del Pacífico Norte.



### III.2 Material y métodos.

Se colectaron 148 organismos de tres áreas del Pacífico Norte (Figura 2). En el Pacífico Occidental (Japón y Mar de China) se capturaron 47 organismos por la flota comercial palangrera durante enero a marzo de 1992. En el Pacífico Central (Hawai) se colectaron 42 organismos durante un crucero de pesca científica exploratoria durante abril-mayo de 1992, utilizando palangre. En el Pacífico Oriental (Baja California) se capturaron 59 organismos por la flota comercial durante el período de noviembre de 1991 a febrero de 1992, utilizando redes agalleras de deriva. Las muestras del Pacífico Occidental fueron mantenidas a bordo entre  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $-70^{\circ}\text{C}$  (dependiendo de la embarcación) y a  $-70^{\circ}\text{C}$  en el laboratorio, mientras que las restantes (Hawai y México) se preservaron en etanol.

El ADN total se aisló a partir de 50-100 mg de músculo esquelético. Las muestras se homogenizaron en 500  $\mu\text{l}$  de amortiguador STE (Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 10 mM, EDTA 50 mM). La pared celular se rompió con 25  $\mu\text{l}$  de SDS al 20% y las moléculas de proteínas fueron desnaturalizadas con 25  $\mu\text{l}$  de proteinasa K en solución (20 mg/ml) durante una incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. Después de un tratamiento con fenol-cloroformo-isoamilalcohol, el ADN fue precipitado con etanol. Este precipitado fue redisolto en 200  $\mu\text{l}$  de amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM).

Las muestras de ADN fueron digeridas con 17 endonucleasas de restricción de seis bases (*ApaI*, *BamHI*, *BglI*, *BglII*, *DraI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *KpnI*, *PstI*, *PvuII*, *SacI*, *SacII*, *SalI*, *SmaI*, *XbaI*, *XhoI*). Se utilizaron de 10 a 12 unidades de cada enzima en las mezclas de reacción, siguiendo las instrucciones de los fabricantes (Takara Shuzo, Toyobo y



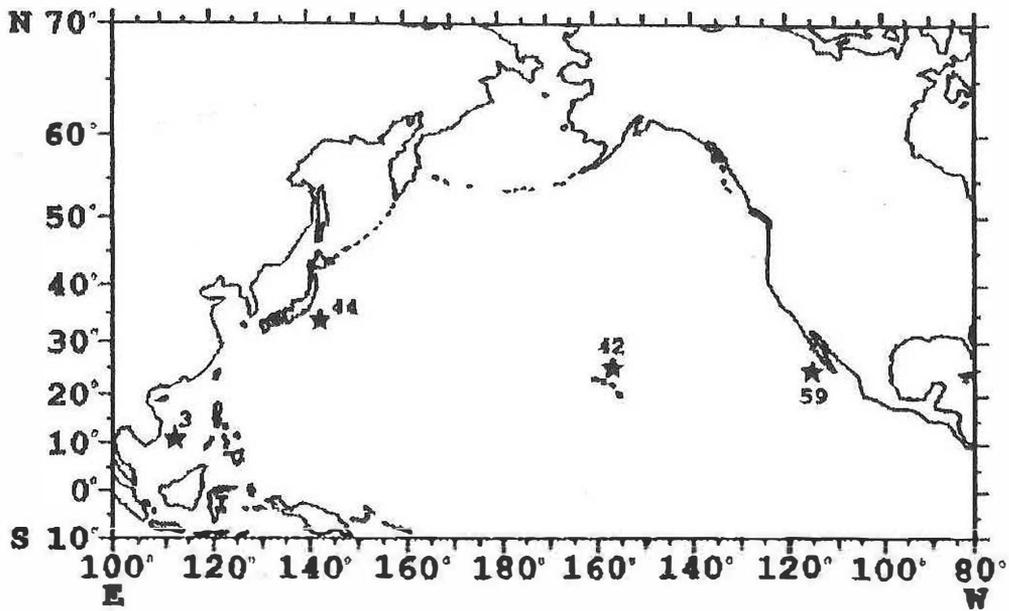


Figura 2. Mapa del Pacífico Norte mostrando los sitios de colecta y el tamaño de muestra.

New England Biolabs). Las reacciones fueron finalizadas agregando 2  $\mu$ l de una solución colorante conteniendo urea 7 M, bromofenol azul al 0.1%, EDTA 10 mM y sucrosa al 50%. Los fragmentos de ADN fueron separados por tamaño en geles horizontales de agarosa al 0.8% utilizando amortiguador TAE 1 $\times$  (50 $\times$ : Tris-HCl 2M pH 8, ácido acético 1 M, EDTA 50 mM), corriendo a 75-80 V (45 mA) por dos horas. El estándar de tamaños utilizado fue ADN Lambda digerido con *Hind*III. Después de la electroforesis se llevó a cabo una **transferencia Southern** para pasar los fragmentos a una membrana de nailon (Hybond-N, Amersham). Para este paso se utilizó una cámara de soporte con presión negativa, fijando los fragmentos de ADN a la membrana con luz UV (Sambrook *et al.* 1989).

Se utilizó como sonda la molécula circular cerrada de ADNmt de salmon (*Oncorhynchus keta*), purificada por centrifugación gradiente de CsCl de acuerdo a Numachi *et al.* (1990) y marcada con digoxigenina-dUTP por el método de **promotores al azar**, siguiendo las instrucciones del fabricante (Boehringer Mannheim GmbH). En el apéndice B se detallan los protocolos de laboratorio.

La variabilidad genética intrapoblacional fue medida en dos formas: la **diversidad de nucleón** (Nei y Tajima, 1981) y la **diversidad de nucleótido** (Nei, 1987). En ambos casos, el error estándar se calculó de acuerdo a Nei (1987). Estas diversidades fueron calculadas para cada área por separado y en la combinación de las tres. Se estimó el número de sustituciones netas de **nucleótidos** entre las áreas muestreadas de acuerdo a Nei (1987). Para probar la homogeneidad de las frecuencias de **haplotipos** entre las zonas muestreadas se utilizaron dos métodos: la prueba G (Sokal y Rohlf, 1981) y la aproximación aleatoria de Monte Carlo (Roff y Bentzen, 1989) con 1000 réplicas. Se calculó el porcentaje de la



divergencia de secuencia entre los haplotipos a partir de los patrones de los fragmentos de restricción, utilizando el método de las diferencias de longitud (Nei, 1987). Se realizó el análisis *Gst* de diferenciación de gene entre las muestras (Nei, 1987), considerando los haplotipos como alelos.

### III.3 Resultados.

De las 17 enzimas de restricción utilizadas, tres (*Bam*HI, *Xho*I y *Eco*RI) no cortaron el ADNmt del pez espada. Seis enzimas (*Xba*I, *Hind*III, *Eco*RV, *Pst*I, *Bgl*II y *Sal*I) dividieron la molécula en dos o más fragmentos pero no revelaron variación. Ocho enzimas, *Bgl*II, *Apa*I, *Dra*I, *Sac*I, *Kpn*I, *Pvu*II, *Sac*II y *Sma*I mostraron de dos a seis patrones de fragmentos de restricción diferentes (Apéndice C). Se estimó que el tamaño de la molécula de ADNmt del pez espada es de  $16,423 \pm 740$  pb. En esta estimación no se tomó en cuenta a *Dra*I debido a que bandas pequeñas o comigrantes no pudieron ser detectadas. En el patrón C de *Pvu*II inferimos una banda comigrante por el color intenso. Aunque los fragmentos pequeños no pudieron ser visualizados, se asumió que los patrones resultantes son producto de simples **sustituciones de nucleótidos**.

Con base en los patrones de restricción de las enzimas que mostraron **polimorfismo**, se distinguieron 27 haplotipos. Sólo cuatro haplotipos fueron comunes en las tres áreas muestreadas y  $\geq 50\%$  de los individuos de cada área presentó el haplotipo más común (Tabla I). El resto de los haplotipos ocurrieron en baja frecuencia. Tanto la prueba G como la de Monte Carlo indicaron homogeneidad de las frecuencias genotípicas entre las áreas ( $P > 0.1$

Tabla I. Distribución de haplotipos en el pez espada del Pacífico Norte. Las letras de los genotipos compuestos denotan, de izquierda a derecha, los patrones de digestión para *KpnI*, *BglI*, *DraI*, *PvuII*, *ApaI*, *SmaI*, *SacI* y *SacII*.

HAPLOTIPOS	GENOTIPO COMPUESTO	ESTE	CENTRO	OESTE
1	AAAAAAAA	39	21	28
2	AAAAAABA	5	2	5
3	AAACABBA	3	3	1
4	AAAAABBA	1	1	2
5	AAAAAEAA	1	2	
6	AAAAACA	1	1	
7	AABAAADA	1	1	
8	AABABAAA	1		
9	AADABAAA	1		
10	ACAAAAAA	1		
11	AEAAABBA	1		
12	AAAABAAA	1		
13	AAAACAAA	1		1
14	AABAAABA	1		1
15	AAAADAAA	1		1
16	AABAAACA		1	1
17	AABAAAAA		2	3
18	ADAAAAAA		1	2
19	AAAFAAA		1	
20	AAABCAAB		1	
21	ABAAAAAA		1	
22	ACACABBA		1	
23	AACAAAAA		1	
24	CAAAAAAA		1	
25	BAAAAAAA		1	
26	AADAAABA			1
27	AFAAAAAA			1
Num. de organismos		59	42	47
Num. de genotipos		15	17	12

en ambos casos).

En la Tabla II se muestran las diversidades de nucleón y de nucleótido; los valores combinados fueron de 0.64 y de 0.0019, respectivamente. El porcentaje de la divergencia de secuencia entre los haplotipos varió de 0.11 a 2.80, promediando  $0.88 \pm 0.47$  (ver apéndice D para mayor detalle). El número de sustituciones netas de nucleótidos fue de -0.0016 para Pacífico Occidental vs Oriental; -0.0020 para Occidental vs Central; y de -0.0019 para Central contra Oriental. La *Gst* media estimada fue de 0.046.

#### III.4 Discusión.

El tamaño de la molécula del ADNmt del pez espada está dentro del rango reportado para otros peces y los valores de la divergencia de secuencia entre los haplotipos corresponden al nivel intraespecífico en peces marinos (Becker *et al.* 1988; Billington y Hebert, 1991). A partir de nuestros datos, no podemos rechazar la hipótesis de homogeneidad genética en el pez espada del Pacífico Norte. Las diferencias en frecuencias genotípicas revelan estructura poblacional (Chakraborty y Leimar, 1987). En este sentido, la señal poblacional en una población estructurada puede estar definida por el genotipo dominante. El pez espada del Pacífico Norte no está estructurado (de acuerdo a nuestros datos) y el análisis de frecuencia de los haplotipos no mostró diferencias estadísticamente significativas. Además, sólo el 4.6% de la diversidad total es atribuible a las diferencias genéticas entre las áreas. Adicionalmente, los valores negativos de las sustituciones netas de nucleótidos entre las áreas indican una relación muy cercana entre ellas (Nei y Tajima,



Tabla II. Diversidades de nucleón y de nucleótido en cinco especies de picudos. E.S. = error estándar.

	DIVERSIDAD DE NUCLEÓN	E.S.	DIVERSIDAD DE NUCLEÓTIDO (%)	E.S.
<b>Pez espada*</b> ( <i>Xiphias gladius</i> )				
Este	0.56	0.05	0.17	0.15
Central	0.75	0.08	0.26	0.23
Oeste	0.63	0.17	0.16	0.15
Combinado	0.64	0.02	0.19	0.13
<b>Marlín rayado**</b> ( <i>Tetrapturus audax</i> )				
Pacífico	0.74		0.54	
<b>Marlín azul**</b> ( <i>Makaira nigricans</i> )				
Atlántico-Pacífico	0.86		1.99	
Pacífico	0.45		0.33	
<b>Pez vela**</b> ( <i>Istiophorus platypterus</i> )				
Atlántico-Pacífico	0.62		0.87	
Pacífico	0.00		0.00	
<b>Marlín blanco**</b> ( <i>Tetrapturus albidus</i> )				
Atlántico	0.70		0.35	

\* Este estudio

\*\* Graves y McDowell (1992)

1981). Estos resultados apoyan la hipótesis de homogeneidad genética en el pez espada del Pacífico Norte.

En ausencia de aislamiento reproductivo por barreras geográficas o por diferencias en períodos de desove, la capacidad natatoria de los peces puede vencer el aislamiento por distancia en grandes áreas oceánicas. La similitud genética encontrada en la albacora (*Thunnus alalunga*) y en el bonito (*Katsuwonus pelamis*) por Graves *et al.* (1984) y Graves y Dizon (1989) entre los océanos Pacífico y Atlántico se puede explicar por la alta capacidad de movimiento de esas especies. Esta alta capacidad migratoria en los atunes se ha demostrado por estudios de marcado (Joseph *et al.* 1988).

Los picudos también poseen una alta capacidad de movimiento. Un caso notable es un marlín azul (*Makaira nigricans*) marcado en aguas frente a Baja California y recuperado cerca de Nueva Zelanda, a casi 6,000 km de distancia (Pepperell, 1990). Aunque no existen resultados de programas de marcado en el Océano Pacífico, suponemos, en base a los movimientos de la especie en el Océano Atlántico (Miyake y Rey, 1989), que se pueden mover sobre largas distancias.

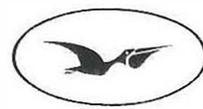
Scott y Tibbo (1968) sugirieron que el pez espada se alimenta sobre un amplio rango de profundidad. Este comportamiento fue confirmado por telemetría acústica y ecogramas (Carey y Robinson, 1981; Carey, 1990) y aparentemente el pez espada se alimenta sobre las aguas de la pendiente (Carey, 1990). Si este comportamiento es la regla, entonces la movilidad del pez espada estaría limitada en una escala oceánica y se esperaría una estructuración de la población. Sin embargo, nuestros datos sugieren que el intercambio de genes es suficiente para evitar una estructuración genética.



Graves y McDowell (1992) analizaron la estructura genética poblacional de picudos, encontrando altos niveles de estructura de stock en comparaciones interoceánicas en el marlín azul y pez vela (*Istiophorus platypterus*). Para el marlín rayado del Pacífico (*Tetrapturus audax*) ellos encontraron una alta variación, sugiriendo más de una población. Entre los picudos, el pez espada tiene una baja diversidad de nucleótido (Tabla II), sin embargo esta comparación se debe de tomar con cuidado ya que se utilizaron un número diferente de endonucleasas de restricción.

El pez espada puede estar estructurado a un nivel interoceánico como el marlín azul y el pez vela. Esto lo sugiere las diferencias de los resultados de *DraI* de Alvarado-Bremer (1992) y de *EcoRV*, *BglI* y *PvuII* de Magoulas *et al.* (1992). Creemos que un estudio comparativo utilizando las mismas enzimas de restricción podría mostrar resultados interesantes. Para obtener una idea completa de la estructura poblacional de este recurso en el Océano Pacífico se debe de realizar un análisis con organismos provenientes del Pacífico Sur.

La estructura genética poblacional es una pieza fundamental de información para cualquier especie que requiere manejo (Baverstock y Moritz, 1990). En el Pacífico el pez espada había sido previamente dividido en varias áreas (stocks) considerando sólo los datos pesqueros. Sin embargo, no es posible delimitar fronteras administrativas con diferentes estrategias de manejo, ya que la presión de pesca en un área puede afectar al resto de las áreas. En este sentido, los programas de manejo del pez espada, al menos en el Pacífico Norte, deben incluir un acuerdo internacional entre las naciones involucradas en esta pesquería, considerando los nuevos datos sobre la estructura genética poblacional.



## IV. EVIDENCIA DE HETEROGENEIDAD GENÉTICA A PARTIR DE ALOZIMAS.

### IV.1 Introducción.

El pez espada (*Xiphias gladius*) es una especie cosmopolita y se encuentra en todos los océanos tropicales y templados (Nakamura, 1983). Es un pez apreciado como alimento y esta sujeto a una pesquería multinacional en todo su rango de distribución (Sakagawa, 1989). En 1991, la captura global fue de 67,142 t, de las cuales se pescaron en el Pacífico 29,245 t o aproximadamente el 44% (FAO, 1993).

Se han propuesto una variedad de estructuras poblacionales para el pez espada, que van desde uno a cuatro stocks tomando como base los datos de la pesquería del Pacífico (Bartoo y Coan, 1989; Skillman, 1989a y Sosa-Nishizaki y Shimizu, 1991). El análisis RFLP del ADN mitocondrial presentado en el Capítulo 3 apoya la hipótesis de un stock único.

Los análisis de alozimas se han utilizado extensivamente para estudiar la estructura poblacional en peces, especialmente recursos pesqueros, debido a su relativa facilidad (Utter *et al.* 1974, 1987; Ihssen *et al.* 1981). Aunque los estudios sobre ADNmt han demostrado una mayor resolución para detectar subestructura poblacional (Ferris y Berg, 1987), ambos métodos son complementarios ya que cubren diferentes tipos de herencia: la electroforesis de proteínas analizan datos fenotípicos a partir de loci y alelos **diploides** (en la mayoría de los casos) transmitidos por reproducción sexual; y la metodología del ADNmt analiza fragmentos de ADN **haploide** heredado (usualmente) por vía materna y de rápida evolución (Allendorf *et al.* 1987). Sin embargo, existe evidencia de resultados incongruentes utilizando ambas metodologías, es decir, en algunos caso el análisis del ADNmt no ha sido



capaz de detectar estructuración poblacional (Ferguson *et al.* 1991; Stott *et al.* 1992; Ward *et al.* 1994). Debido a que el estudio de las variantes alélicas nucleares involucra un intercambio sexual entre los individuos, es posible inferir la salud poblacional por medio de la variación genética (Nevo, 1978). Esta salud poblacional puede estar influenciada por selección natural y/o deriva genética. Además, en el caso de un recurso pesquero, las prácticas de captura pueden afectar tales rasgos evolutivos (Nelson y Soulé, 1987).

La intención de este estudio fue conocer la variación genética diploide del pez espada y probar la homogeneidad genética a la luz del análisis alozimático.

#### IV.2 Material y métodos.

Para el estudio de variación alozimática se utilizaron muestras de músculo blanco, hígado y corazón de 44 individuos provenientes de Hawai y 50 de México (ver Capítulo 3 para detalles de muestreo). Las muestras se conservaron a bordo a  $-20^{\circ}\text{C}$  y en el laboratorio a  $-70^{\circ}\text{C}$ . En algunos organismos ocurrió desactivación de enzimas debido quizá al lapso de tiempo transcurrido entre la colecta y el análisis de las muestras (1-1.5 años).

Las muestras, aproximadamente 5 g, fueron homogenizadas en un volumen igual de una solución consistente de Tris-HCl 0.1 M pH 8, NAD, NADP y polivinilpirrolidona (100:0.1:0.1:1, v:w:w:w), utilizando un homogenizador eléctrico de acero inoxidable (Tissumizer Tekmar). En el caso del hígado se agregó 0.5 ml de tolueno. Las muestras homogenizadas se centrifugaron a  $20,000 \times g$  por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y los sobrenadantes fueron transferidos a tubos con tapa y almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$ .



El análisis de alozimas comprendió 16 sistemas proteínicos, los cuales codificaron 28 presuntos loci (Tabla III). Se siguió, en general, la metodología descrita por Aebersold *et al.* (1987) con la única excepción de que no utilizamos agar en el procedimiento de tinción. El medio de soporte fue gel de almidón (Sigma S4501) al 12%. En el Apéndice E se describen en detalle las soluciones amortiguadoras y los sistemas enzimáticos utilizados.

Para la interpretación de los **zimogramas** se siguieron los criterios de Grant y Utter (1980) y Grant *et al.* (1984). Se tomó en cuenta la nomenclatura de Shaklee *et al.* (1990), de esta forma los loci se designaron en forma ascendente empezando con el número 1 para el locus más cercano al cátodo. Los alelos para los loci polimórficos fueron designados con letras minúsculas, empezando con la letra "a" para los alelos más cercanos al ánodo.

Los datos se analizaron con el programa Biosys-1 de Swofford y Selander (1981). Un locus fue considerado polimórfico si la frecuencia del alelo más común no excedió 0.95. La **heterocigosis** media sobre todos los loci se calculó de acuerdo a la fórmula insesgada de Nei (1978). La hipótesis de equilibrio de Hardy-Weinberg se probó para todos los loci polimórficos por medio de una prueba de ji cuadrada, agrupando los genotipos cuando se observaron más de dos alelos. Se aplicaron las correcciones de Lavene para muestras pequeñas y de Yates para continuidad (Swofford y Selander, 1981). Se calcularon las probabilidades exactas de la significancia sólo para verificar la concordancia con la prueba de ji cuadrada.

Se calculó la **distancia genética** (Nei, 1978) entre las localidades, así como el *F<sub>is</sub>* o coeficiente de endogamia y el *F<sub>st</sub>* o varianza estandarizada de las frecuencias alélicas para medir la cantidad de diferenciación entre las subpoblaciones (Wright, 1965). Se probó la



Tabla III. Sistemas proteínicos y loci resueltos en el pez espada del Pacífico Norte.  
C.E.= Número asignado por la Comisión de Enzimas (IUBNC, 1984).

PROTEINAS	C.E.	LOCUS	TEJIDO	AMORTI- GUADOR	TINCION
Isocitrato deshidrogenasa	1.1.1.42	<i>IDHP-1*</i>	Corazon	A	3
		<i>IDHP-2*</i>	Higado		
Lactato deshidrogenasa	1.1.1.27	<i>LDH-1*</i>	Corazon	A	1
		<i>LDH-2*</i>	Corazon		
Glucosa-6-fosfato isomerasa	5.3.1.9	<i>GPI-A*</i>	Corazon	A	1
		<i>GPI-B*</i>	Corazon		
Enzima malica	1.1.1.40	<i>MEP*</i>	Corazon	A	2
Fosfoglucomutasa	5.4.2.2	<i>PGM*</i>	Musculo	A	2
Aspartato aminotransferasa	2.6.1.1	<i>AAT-1*</i>	Higado	A	2
		<i>AAT-2*</i>	Higado		
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	1.1.1.49	<i>G6PDH*</i>	Corazon	B	2
Xantina deshidrogenasa	1.1.1.204	<i>XDH*</i>	Higado	C	2
Glutamato deshidrogenasa	1.4.1.3	<i>GDH*</i>	Higado	C	2
Fosfatasa acida	3.1.3.2	<i>ACP-1*</i>	Higado	D	1
		<i>ACP-2*</i>	Higado		
Octanol deshidrogenasa	1.1.1.73	<i>ODH*</i>	Higado	D	1
Sorbitol deshidrogenasa	1.1.1.14	<i>SDH-1*</i>	Higado	D	2
		<i>SDH-2*</i>	Higado		
Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa	1.1.1.8	<i>G3PDH*</i>	Higado	D	2
Proteinas generales	-----	<i>PROT-1*</i>	Corazon	D	4
		<i>PROT-2*</i>	Corazon		
		<i>PROT-3*</i>	Musculo		
		<i>PROT-4*</i>	Musculo		
Esterasa	3.1.1.-	<i>EST*</i>	Higado	E	1
Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	1.2.1.12	<i>GAPDH-1*</i>	Corazon	E	2
		<i>GAPDH-2*</i>	Corazon		
		<i>GAPDH-3*</i>	Corazon		
		<i>GAPDH-4*</i>	Corazon		

## Amortiguador:

- A) Tris-citrato II continuo, pH 8.0 (Selander *et al.* 1971).  
 B) Tris-maleato, pH 7.4 (Selander *et al.* 1971)  
 C) Tris-EDTA-borato, pH 8.0 (Shaw y Prasad, 1970).  
 D) Tris-citrato, pH 8.0 (Tracey *et al.* 1975).  
 E) Aminopropil-morfolina, pH 6.1 (Clayton y Tetriak, 1972).

## Tinción:

- 1) Shaw y Prasad (1970)  
 2) Shecal y Anderson (1974).  
 3) Abreu-Grobois (1983).  
 4) Rosa-Velez (1986).



hipótesis nula  $F_{is}=0$  por medio de  $\chi^2=F_{is}^2n$ , con  $k(k-1)^2$  grados de libertad, en donde  $k$  denota al número de alelos (Li y Horvitz, 1953). Se probó la hipótesis nula  $F_{st}=0$  por medio de  $\chi^2=F_{st}^2n$ , con  $(s-1)(k-1)$  grados de libertad, en donde  $s$  denota el número de localidades geográficas y  $k$  el número de alelos (Workman y Niswander, 1970). La heterogeneidad de las frecuencias alélicas en los loci polimórficos entre las localidades se probó utilizando la prueba G log-verosimilitud con la corrección de Yates de continuidad (Zar, 1984). El número de migrantes por generación se estimó por medio de  $N_e m = (F_{st}^{-1} - 1) / 4$  (Hartl, 1988).

#### IV.3 Resultados.

De 28 loci resueltos, cinco fueron polimórficos: *ODH\**, *IDH-2\**, *GPI-A\**, *PROT-2\** y *PROT-3\**. En la Tabla IV se muestra la variación genética en ambas localidades. El número de alelos por locus fue de 1.21 (México) y 1.32 (Hawai). La heterocigosis observada por locus fluctuó entre 0.000 y 0.592 (Tabla V), con una media de 0.031 en México y de 0.025 en Hawai. La diversidad media de gene para las localidades combinadas fue de 0.029.

En México, dos loci estuvieron fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg: *GPI-A\** mostró una deficiencia de heterocigotos e *IDH-2\** mostró un exceso (Tabla V). Este resultado se vió reflejado en los valores de  $F_{is}$  para esos loci (Tabla VI).

La distancia genética entre las poblaciones fue muy baja, varió entre 0.000 y 0.078, con una media de 0.004 sobre todos los loci. El análisis de heterogeneidad de las frecuencias alélicas mostró diferencias significativas (Tabla VI), llegando a ser la G total muy significativa ( $G=23.815$ ,  $P<0.001$ ). Los promedios ponderados de  $F_{is}$  y de  $F_{st}$  fueron

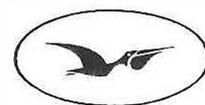


Tabla IV. Variación genética del pez espada del Pacífico Norte. Error estándar entre paréntesis.

	MÉXICO	HAWAI
Núm. de organismos	50	44
Núm. de loci examinados	28	28
Núm. de loci polimórficos	3	2
Porcentaje de loci polimórficos*	10.71	7.14
Núm. de alelos por locus	1.21 (0.08)	1.32 (0.10)
Heterocigosis promedio		
Observada	0.031 (0.021)	0.025 (0.013)
Esperada	0.027 (0.016)	0.026 (0.012)

\* criterio 0.95



Tabla V. Frecuencias alélicas, heterocigosis y frecuencias fenotípicas de acuerdo a la ley de Hardy-Weinberg en los cinco loci polimórficos. Número de organismos entre paréntesis. La diferencia en el tamaño de las muestras se debe a la inactivación de las enzimas en algunos organismos.

LOCUS	LOCALIDAD	FRECUENCIAS ALELICAS			HETEROCIGOSIS		FRECUENCIAS FENOTÍPICAS			$\chi^2$ CUADRADA
		A	B	C	OBSERVADA	ESPERADA	FENOTIPO	OBSERVADAS	ESPERADAS	
ODH*	MEXICO [39]	0.051	0.949		0.103	0.099	A AB B	0 4 35	0.780 3.844 35.078	0.000 (n.s.)
	HAWAI [42]	0.000	1.000		0.000	0.000	A AB B	0 0 42		
GPI-A*	MEXICO [50]	0.000	0.930	0.070	0.060	0.132	B BC C	45 3 2	43.212 6.576 0.212	9.296 (**)
	HAWAI [41]	0.012	0.963	0.024	0.073	0.072	A AB AC B BC C	0 1 0 38 2 0	0.000 0.975 0.025 38.037 1.951 0.012	0.000 (n.s.)
IDH-2*	MEXICO [49]	0.296	0.704		0.592	0.421	A AB B	0 29 20	4.186 20.629 24.186	6.810 (**)
	HAWAI [42]	0.000	1.000		0.000	0.000	A AB B	0 0 42		
PROT-2*	MEXICO [50]	0.010	0.990		0.020	0.020	A AB B	0 1 49	0 1 49	0.000 (n.s.)
	HAWAI [42]	0.083	0.917		0.167	0.155	A AB B	0 7 35	0.253 0.494 35.253	0.000 (n.s.)
PROT-9*	MEXICO [50]	0.020	0.980		0.040	0.040	A AB B	0 2 48	0.010 1.980 48.010	0.000 (n.s.)
	HAWAI [41]	0.171	0.829		0.341	0.287	A AB B	0 14 27	1.123 11.753 28.123	0.619 (n.s.)

n.s. = no significativo

\* =  $p < 0.05$

\*\* =  $p < 0.01$



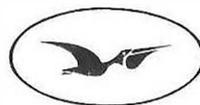
Tabla VI. Distancia genética, prueba G de máxima verosimilitud para las frecuencias alélicas y la estadística F en los cinco loci polimórficos del pez espada.

	D	G	<i>Fis</i>	$\chi^2$	<i>Fst</i>	$\chi^2$
<i>ODH</i> *	0.001	0.615	-0.054	0.236	0.026	4.212 (*)
<i>GPI-A</i> *	0.000	1.837	0.338	20.792 (**)	0.008	2.912
<i>IDH-2</i> *	0.078	15.023 (***)	-0.420	16.052 (***)	0.174	31.668 (***)
<i>PROT-2</i> *	0.002	1.489	-0.082	0.619	0.030	5.520 (*)
<i>PROT-3</i> *	0.014	4.851 (*)	-0.183	3.047	0.066	12.012 (***)
<b>TOTALES</b>		<b>23.815 (***)</b>	<b>-0.153</b>	<b>40.746 (***)</b>	<b>0.090</b>	<b>56.324 (***)</b>

\* =  $0.01 < P < 0.05$

\*\* =  $0.001 < P < 0.01$

\*\*\* =  $P < 0.001$



fueron -0.153 y 0.09, respectivamente, ambos diferentes de cero ( $P < 0.001$ ). Considerando el valor de  $F_{st}$ , el número estimado de migrantes por generación fue de 2.5.

#### IV.4 Discusión.

Las dos zonas muestreadas del Pacífico Norte exhibieron una baja heterocigosis y una significativa heterogeneidad en las frecuencias alélicas. La heterocigosis del pez espada, 0.029, es baja comparada con el promedio reportado para peces marinos, el cual es de 0.055 (Smith y Fujio, 1982) y para osteictios en general: 0.051 (Nevo, 1978) y 0.048 (Winans, 1980). Se ha reportado que para el marlín azul del Pacífico, otro picudo, la heterocigosis media es de 0.06 (Shaklee *et al.* 1983).

Por otro lado, la heterogeneidad de las frecuencias alélicas es un resultado inesperado. Además, el análisis de ambas localidades combinadas (México+Hawai) dió como resultado una deficiencia de heterocigotos en  $GPI-A^*$  ( $\chi^2=6.404$ ,  $p=0.011$ ), debido al efecto de **Wahlund**, confirmando la naturaleza independiente de ambas localidades. En esta heterogeneidad de frecuencias alélicas  $IDH-2^*$  jugó un papel muy importante y descartamos la posibilidad de haber hecho una mala interpretación debida a "artefactos" electroforéticos. De acuerdo a Richardson *et al.* (1986), IDH es una proteína susceptible a mostrar sub-bandas anodales relacionadas con el tiempo de conservación de la muestra, pudiendo confundirse estas anomalías electroforéticas con un polimorfismo genético. Este bandeo artificial estuvo presente en nuestras muestras como una banda extra de menor intensidad. Debido a que IDH es una proteína dimérica, los organismos heterocigotos presentaron un patrón de tres bandas, lo cual eliminó las posibilidades de una interpretación equivocada.



Los resultados del Capítulo 3 no pudieron rechazar la hipótesis nula de que el pez espada consiste de una sola población. La opinión generalizada es que el análisis del ADNmt es una aproximación más sensitiva que las alozimas para definir la estructura poblacional (Ferris y Berg, 1987). De hecho, muchos estudios basados en ADNmt han confirmado resultados preliminares de identificación de stocks o han demostrado las diferencias que por otras metodologías no habían sido detectadas (Awise, 1986; Kornfield, 1986; Hanzawa *et al.* 1987; Kornfield y Bogdanowicz, 1987; Ward *et al.* 1989).

Recientemente se han reportado resultados incongruentes al utilizar el ADNmt y las alozimas. Ferguson *et al.* (1991) no encontraron evidencia de estructura poblacional en la trucha *Salvelinus fontinalis* utilizando el ADNmt, sin embargo, la variación alozimática mostró una significativa diferenciación entre las localidades muestreadas. Stott *et al.* (1992) concluyeron que el lenguado *Hippoglossoides platessoides* se compone de una población en la costa Atlántica Canadiense, aunque el análisis del ADNmt mostró una menor resolución que las alozimas. De la misma forma, Ward *et al.* (1994) reporta para el atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*) del Pacífico al menos dos grupos o poblaciones de acuerdo al análisis de alozimas, contrastando con la homogeneidad propuesta por el análisis del ADNmt.

Los resultados obtenidos aquí podrían explicarse hipotetizando un reciente **cuello de botella**, el cual puede tener un efecto mayor sobre el ADNmt que sobre los genes nucleares (Ferris y Berg, 1987). Sin embargo, es muy difícil localizar en el tiempo a un cuello de botella para el pez espada debido a que, por un lado, se ha reportado en la literatura que para un valor específico de distancia genética, obtenido a partir de alozimas, el intervalo del tiempo de divergencia puede ser muy amplio (Hillis y Moritz, 1990). Por otro lado, el uso

del ADNmt como un reloj molecular implica muchas dificultades (Hillis y Moritz, 1990). Para calcular divergencias y linajes en peces generalmente se usa la tasa mutacional media del ADNmt de mamíferos, sin embargo esto no es válido ya que existe evidencia que demuestra que la tasa media de sustituciones de bases del ADNmt en peces puede ser mucho más lenta que en los mamíferos (Martin *et al.* 1992; Rand, 1994).

Otra posible explicación descansa en la proporción de sexos poblacional. Birky *et al.* (1989) mencionaron que los genes organelares pueden mostrar una población más subdividida que los genes nucleares debido a que los primeros tienen una tasa de migración efectiva menor por la herencia uniparental y que esto se puede revertir si las hembras se encuentran en exceso. La proporción de sexos en nuestras muestras indican un sesgo hacia las hembras y datos de varias campañas de pesca en Baja California durante 1992 y 1993 indican consistentemente altas proporciones hembra:macho (Castro-Longoria<sup>1</sup>). Sin embargo, la proporción de sexos observada en aguas de Baja California (<5.8:1) no es lo suficientemente sesgada para explicar la diferencia observada. De acuerdo con Birky *et al.* (1989), el número de hembras siempre debe de ser mayor de siete por macho para que los genes nucleares muestren una mayor subdivisión que los genes organelares.

Debido a que el flujo genético sugerido por  $N_e m$  fue mayor que el valor requerido para prevenir la diferenciación debido a la deriva genética, la tercera alternativa puede ser algún tipo de selección. Aunque, de acuerdo a Lewontin (1991), no es posible discriminar entre seleccionismo y neutralismo con datos del tipo estático (como los nuestros), existe

---

<sup>1</sup>Castro-Longoria, R. CICESE, Lab. de Ecología Pesquera. Apdo. Postal 2732. Ensenada, B.C., México. Comunicación personal, Febrero de 1994.



evidencia en la literatura de que la selección puede influir en la variación genética (por ejemplo: Mitton y Koehn, 1975; Buroker, 1979; Ropson *et al.* 1990; Brown y Chapman, 1991).

Karl y Avise (1992) mostraron resultados interesantes en ostras (*Crassostrea gigas*). El análisis de alozimas sugería una uniformidad geográfica a lo largo de las costas del Golfo de México y del Atlántico de los Estados Unidos. Sin embargo, el análisis RFLP de ADN nuclear de copia única proponía dos regiones geográficas que estuvieron en concordancia con el análisis del ADNmt. Después de analizar todas las causas posibles, ellos concluyeron que la selección balanceadora fue la causa más probable del mantenimiento de la homogeneidad de los caracteres proteínicos electroforéticos.

De acuerdo a Karl y Avise (1992), la selección natural mantuvo una homogeneidad a pesar del flujo genético restringido. Si la selección natural puede operar en un sentido, también lo podría hacer en el sentido opuesto. En nuestro caso, la hipótesis es que la selección natural (quizá del tipo direccional) mantiene una heterogeneidad proteínica significativa entre las poblaciones a pesar del flujo genético evidenciado por  $N_e m$ . El probar esta hipótesis va más allá del objetivo de esta investigación.

Para propósitos de manejo es importante establecer claramente la presencia o ausencia de diferenciación genética de los recursos pesqueros entre las áreas geográficas. De todos es conocido que la ausencia de diferencia genética sugerida por los análisis de alozimas no se pueden atribuir a una identidad genética al nivel del ADN (Utter *et al.* 1987). Sin embargo, cuando a partir de un análisis alozimático las diferencias se hacen evidentes, existe la posibilidad de que en realidad exista una diferenciación en algún grado. De acuerdo



a los presentes resultados, la estructura genética poblacional del pez espada en el Pacífico Norte es más complicada que lo previamente descrito en el Capítulo 3. Desde el punto de vista del manejo de los recursos pesqueros, es necesario corroborar el estatus de las poblaciones de pez espada en todo el Océano Pacífico con un análisis de restricción del ADNmt que implique el uso de endonucleasas de cuatro bases para incrementar la posibilidad de detectar polimorfismos, además del análisis alozimático. Además se debe incluir una estrategia de muestreo que analice la variación temporal. De esta forma, es evidente que en estudios poblacionales es muy importante utilizar más de un método genético para describir la estructura poblacional.



## V. CONCLUSIONES GENERALES.

El uso de las dos técnicas de mayor uso (alozimas y ADNmt) en la caracterización genética de poblaciones en el pez espada proporcionó información complementaria pero contradictoria. En el genoma mitocondrial, debido a su modo de herencia, no existe recombinación genética y por lo tanto el tamaño efectivo de la población de los genes organelares es menor al correspondiente para los genes nucleares (Nei, 1987). Esta disminución del tamaño efectivo poblacional es particularmente útil desde el punto de vista práctico, ya que significa que el genoma mitocondrial, al resultar más afectado por las reducciones poblacionales, funciona como un registro de eventos pasados. Además, su velocidad mutacional y el alto grado de polimorfismo hace que sea especialmente útil para el estudio de la estructuración geográfica de las especies. Todas estas características hicieron que el ADNmt fuera considerado una herramienta muy efectiva para resolver las dudas relacionadas con la identificación de stocks.

La técnica de electroforesis de alozimas se ha considerado típicamente como una herramienta de baja resolución en estudios poblacionales debido a su inhabilidad de detectar toda la variación relacionada con la síntesis de proteínas. De esta forma, el uso de las alozimas se ha generalizado como una prueba *a priori*. Sin embargo, en nuestro caso el análisis RFLP de la molécula de ADNmt en el pez espada resultó ser el método de baja resolución, por lo que el resultado inesperado obtenido con las alozimas es una nueva evidencia de la utilidad de esta técnica.

Dada la diferenciación genética entre México y Hawai a partir de las frecuencias alélicas de los genes nucleares y del valor de  $F_{st}$ , es posible pensar que el pez espada posee



una estructura poblacional compleja en el Océano Pacífico. Esto no le resta validez al ADNmt como una herramienta útil para el estudio de diferenciación de stocks. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que la respuesta diferencial de los genes organelares y nucleares a las fuerzas evolutivas y a los cambios drásticos poblacionales (naturales o inducidos por el hombre) pueden generar resultados inesperados cuando se desconocen dichas fuerzas y cambios.

Dowling *et al.* (1990) mencionan que en especies que presentan valores de divergencia de secuencia menores al 2%, el uso de enzimas de restricción de seis bases no será muy útil para detectar los niveles de variación genética. Estos autores recomiendan el uso combinado de endonucleasas de cuatro y seis bases. Sin embargo, si la respuesta de los genes organelares y nucleares es diferencial, entonces existe la posibilidad de que en el pez espada del Pacífico Norte, un análisis RFLP con endonucleasas de cuatro y seis bases no aportaría información sustancialmente diferente a la reportada en el Capítulo 3 con respecto a la frecuencia de los haplotipos dominantes.

Con relación a la administración de recursos pesqueros, la toma de decisiones es un paso muy importante que requiere de un completo análisis previo con un fundamento sólido. Este análisis previo, o dicho de otra forma, el estudio biológico-pesquero, debe comprender no sólo las herramientas tradicionales para la caracterización de stocks, sino también las nuevas técnicas disponibles en el campo de la Biología Molecular. Con esta nueva filosofía en el campo del manejo de los recursos pesqueros se espera que el Hombre pueda aprovechar al máximo los recursos con un mínimo impacto.



**LITERATURA CITADA.**

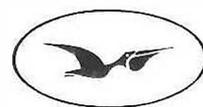
- Aebersold, P.B., G.A. Winans, D.J. Teel, G.B. Milner y F.M. Utter. 1987. Manual for starch gel electrophoresis: A method for the detection of genetic variation. NOAA Tech. Rept. NMFS 61. 19 pp.
- Abreu-Grobois, A. 1983. Population genetics of *Artemia*. Tesis Doctoral. Univ. College of Swansea, Great Britain. 438 pp.
- Alvarado-Bremer, J.A. 1992. Stock differentiation of Atlantic swordfish using mitochondrial DNA analysis. ICCAT, Coll. Vol. Sci. Pap., SCRS/91/48, 39(2): 607-614.
- Allendorf, F.W. y F.M. Utter. 1979. Population genetics. p. 407-454. En: Fish Physiology VIII (Hoar, W.S., D.J. Randall y J.R. Brett, eds.). Academic Press, Inc. New York. 786 pp.
- Allendorf, F.W., N. Ryman y F.M. Utter. 1987. Genetics and fishery management: Past, present, and future. p. 1-19. En: Population Genetics and Fishery Management (Ryman, N. y F. Utter, eds.). University of Washington Press. Seattle. 420 pp.
- Alves, M.J. y M.M. Coelho. 1994. Genetic variation and population subdivision of the endangered cyprinid *Chondrostoma lusitanicum*. J. Fish Biol., 44: 627-636.
- Avise, J.C. 1974. Systematic value of electrophoretic data. Syst. Zool., 23: 465-481.
- Avise, J.C. 1986. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. Phil. Trans. R. Soc. Lond., B312: 325-342.

- Avise, J.C. y R.A. Lansman. 1983. Polymorphism of mitochondrial DNA in populations of higher animals. p. 147-164. En: Evolution of Genes and Proteins (Nei, M. y R.K. Koehn, eds.), Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. 331 pp.
- Avise, J.C., G.S. Helfman, N.C. Saunders y L.S. Hales. 1986. Mitochondrial DNA differentiation in North Atlantic eels: Population genetic consequences of an unusual life history pattern. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 4350-4354.
- Bartoo, N.W. y A.L. Coan, Jr. 1989. An assessment of the Pacific swordfish resource. p. 137-151. En: Proceedings of the Second International Billfish Symposium, Kaina-Kona, Hawaii, 1-5 August 1988. Part 1 (Stroud, R.H., ed.), National Coalition for Marine Conservation, Inc. Savannah, Georgia. 361 pp.
- Baverstock, P.R. y Moritz, C. 1990. Sampling design. p. 13-24. En: Molecular Systematics (Hillis, D.M. y C. Moritz, eds.). Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. 588 pp.
- Beacham, T.D., R.W. Withler y A.P. Gould. 1985a. Biochemical genetic stock identification of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) in Southern British Columbia. Can J. Fish. Aquat. Sci., 42: 437-448.
- Beacham, T.D., R.W. Withler y A.P. Gould. 1985b. Biochemical genetic stock identification of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) in Southern British Columbia and Puget Sound. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 42: 1474-1483.
- Becker, I.I., W.S. Grant, R. Kirby y F.T. Robb. 1988. Evolutionary divergency between sympatric species of southern African hakes, *Merluccius capensis* and *M paradoxus*. II. Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA. Heredity, 61: 21-30.

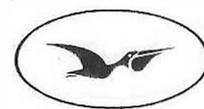
- Beckwitt, R. 1983. Genetic structure of *Genyonemus lineatus*, *Seriphus politus* (Sciaenidae) and *Paralabrax clathratus* (Serranidae) in Southern California. *Copeia*, 1983: 691-696.
- Bermingham, E., S.H. Forbes, K. Friedland y C. Pla. 1991. Discrimination between Atlantic salmon (*Salmo salar*) of North American and European origin using restriction analysis of mitochondrial DNA. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48: 884-893.
- Berst, A.H. y R.C. Simon (eds.). 1981. Proceedings of the Stock Concept Symposium. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 38: 1457-1921.
- Billington, N. y P.D.N. Hebert. 1991. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48: 80-94.
- Birky, C.W. Jr., P. Fuerst y T. Maruyama. 1989. Organelle gene diversity under migration, mutation, and drift: Equilibrium expectations, approach to equilibrium, effects of heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes. *Genetics*, 121: 613-627.
- Birt, T.P., J.M. Green y W.S. Davidson. 1991. Mitochondrial DNA variation reveals genetically distinct sympatric populations of anadromous and nonanadromous Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48: 577-582.
- Bowen, B.W. y J.A. Avise. 1990. Genetic structure of Atlantic and Gulf of Mexico populations of sea bass, menhaden, and sturgeon: influence of zoogeographic factors and life-history patterns. *Mar. Biol.*, 107: 371-381.
- Brown, B.L. y R.W. Chapman. 1991. Gene flow and mitochondrial DNA variation in the killfish, *Fundulus heteroclitus*. *Evolution*, 45: 1147-1161.

- Brown, W.M., M. George, Jr., y A.C. Wilson. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 76: 1967-1971.
- Buroker, N.E. 1979. Overdominance of a muscle protein (*Mp-1*) locus in the Japanese oyster, *Crassostrea gigas* (Ostreidae). *J. Fish. Res. Board Can.*, 36: 1313-1318.
- Carey, F.G. 1990. Further acoustic telemetry observations of swordfish. p: 103-122. En: *Proceedings of the Second International Billfish Symposium, Kaina-Kona, Hawaii, 1-5 August 1988. Part 2* (Stroud, R.H., ed.). National Coalition for Marine Conservation, Inc. Savannah, Georgia. 321 pp.
- Carey, F.G. y B.H. Robinson. 1981. Daily patterns in the activities of swordfish, *Xiphias gladius*, observed by acoustic telemetry. *Fish. Bull.*, 79: 277-292.
- Chakraborty, R. y O. Leimar. 1987. Genetic variation within a subdivided population. p. 89-120. En: *Population Genetics and Fishery Management* (Ryman, N. y F. Utter, eds.). University of Washington Press. Seattle. 420 pp.
- Chow, S. 1992. Identification of billfish species using mitochondrial cytochrome *b* gene fragment amplified by polymerase chain reaction. ICCAT Working Document SCRS/92/66.
- Clayton, J.W. y D.N. Tretiak. 1972. Amine-citrate buffers for pH control in starch gel electrophoresis. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 29: 1169-1172.
- Crawford, M.K., C.B. Grimes y N.E. Buroker. 1988. Stock identification of weakfish, *Cynoscion regalis*, in the middle Atlantic region. *Fish. Bull.*, 87: 205-211.
- Cushing, D.H. 1968. *Fisheries Biology. A Study in Population Dynamics*. University of Wisconsin Press. Madison. 200 pp.

- Dowling, T.E. y W.M. Brown. 1989. Allozymes, mitochondrial DNA, and levels of phylogenetic resolution among four minnow species (*Notropis*: Cyprinidae). *Syst. Zool.*, 38: 126-143.
- Dowling, T.E., C. Moritz y J.D. Palmer. 1990. Nucleic acids II: Restriction site analysis. p. 250-317. En: *Molecular Systematics* (Hillis, D.M y C. Moritz, eds.). Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. 588 pp.
- Fairbairn, D.J. 1981. Biochemical genetic analysis of population differentiation in Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) from the Northwest Atlantic, Gulf of St. Lawrence, and Bering Sea. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 38: 669-677.
- FAO. 1977. Anuario Estadístico de Pesca: Capturas y Desembarques. 42: 323 pp.
- FAO. 1983. Anuario Estadístico de Pesca: Capturas y Desembarques. 52: 357 pp.
- FAO. 1988. Anuario Estadístico de Pesca: Capturas y Desembarques. 62: 479 pp.
- FAO. 1993. Anuario Estadístico de Pesca: Capturas y Desembarques. 72: 654 pp.
- Ferguson, M.M., R.G. Danzmann y J.A. Hutchings. 1991. Incongruent estimates of population differentiation among brook charr, *Salvelinus fontinalis*, from Cape Race, Newfoundland, Canada, based upon allozyme and mitochondrial DNA variation. *J. Fish Biol.*, 39A: 79-85.
- Ferris, S.D. y W.J. Berg. 1987. The utility of mitochondrial DNA in fish genetics and fishery management. p: 277-299. En: *Population Genetics and Fishery Management* (Ryman, N y F. Utter, eds.). University of Washington Press. Seattle. 420 pp.



- Finnerty, J.R. y B.A. Block. 1992. Direct sequencing of mitochondrial DNA detects highly divergent haplotypes in blue marlin (*Makaira nigricans*). *Mol. Mar. Biol. Biotech.*, 1: 206-214.
- Gauldie, R.W. 1991. Taking stock of genetic concepts in fisheries management. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48: 722-731.
- Gold, J.R., T.L. King, L.R. Richardson, D.A. Bohlmeier y G.C. Matlock. 1994. Allozyme differentiation within and between red drum (*Sciaenops ocellatus*) from the Gulf of Mexico and Atlantic Ocean. *J. Fish Biol.*, 44: 567-590.
- Grant, W.S. 1984. Biochemical population genetics of Atlantic herring, *Clupea harengus*. *Copeia*, 1984: 357-364.
- Grant, W.S. y F.M. Utter. 1980. Biochemical genetic variation in walleye pollock, *Theragra chalcogramma*: Population structure in the Southeastern Bering Sea and the Gulf of Alaska. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 37: 1093-1100.
- Grant, W.S., G.B. Milner, P. Krasnowski y F.M. Utter. 1980. Use of biochemical genetic variants for identification of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) stocks in Cook Inlet, Alaska. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 37: 1236-1247.
- Grant, W.S., D.J. Teel, y T. Kobayashi. 1984. Biochemical population genetics of Pacific halibut (*Hippoglossus stenolepis*) and comparison with Atlantic halibut (*H. hippoglossus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 41: 1083-1088.
- Graves, J.E. y A.E. Dizon. 1986. Mitochondrial DNA genetic similarity of Atlantic and Pacific skipjack tuna and its management implications. p. 237-241. En: Proceedings of

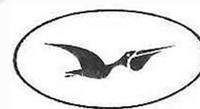


- the ICCAT Conference on the International Skipjack Year Program (Symons, P.E.K., P.M. Miyake y G.T. Sakagawa, eds.). Int. Comm. Conserv. Atlantic Tunas, Madrid.
- Graves, J.E. y A.E. Dizon. 1989. Mitochondrial DNA sequence similarity of Atlantic and Pacific albacore tuna (*Thunnus alalunga*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 46: 870-873.
- Graves, J.E. y J.R. McDowell. 1992. Genetic analysis of billfish population structure. ICCAT Working Document SCRS/92/50.
- Graves, J.E. y G.N. Somero. 1982. Electrophoretic and functional enzymic evolution in four species of Eastern Pacific barracudas from different thermal environments. *Evolution*, 36: 97-106.
- Graves, J.E., S.D. Ferris y A.E. Dizon. 1984. Close genetic similarity of Atlantic and Pacific skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) demonstrated with restriction endonucleases analysis of mitochondrial DNA. *Mar. Biol.*, 79: 315-319.
- Grewe, P.M., N. Billington y P.D.N. Hebert. 1990. Phylogenetic relationships among members of *Salvelinus* inferred from mitochondrial DNA divergence. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 47: 984-991.
- Gyllensten, U., D. Wharton, A. Joseffson y A.C. Wilson. 1991. Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature*, 352: 255-257.
- Hanzawa, N., H. Yonekawa y K. Numachi. 1987. Variability of mitochondrial DNA in Japanese dace, *Tribolodon hakonensis* (Cyprinidae). *Jpn. J. Genet.*, 62: 27-38.
- Hartl, D.L. 1988. *A Primer of Population Genetics*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. 305 pp.

- Hedgecock, D., E.S. Hutchinson, G. Li, F.L. Sly y K. Nelson. 1989. Genetic and morphometric variation in the Pacific sardine, *Sardinops sagax caerulea*: Comparisons and contrasts with historical data and with variability in the Northern anchovy, *Engraulis mordax*. Fish. Bull., 87: 853-871.
- Hillis, D.M. y C. Moritz. 1990. An overview of applications of molecular systematics. p. 502-515. En: Molecular Systematics (Hillis, D.M. y C. Moritz, eds.). Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. 588 pp.
- Horrall, R.M. 1981. Behavioral stock-isolating mechanisms in Great Lakes fishes with special reference to homing and site imprinting. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 38: 1481-1496.
- Ihssen, P.E., H.E. Booke, J.M. Casselman, J.M. McGlade, N.R. Payne y F.M. Utter. 1981. Stock identification: materials and methods. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 38: 1838-1855.
- IUBNC (International Union of Biochemistry, Nomenclature Committee). 1984. Enzyme Nomenclature 1984. Academic Press. Orlando, Florida. 646 pp.
- Johnson, M.S. 1975. Biochemical systematics of the atherinid genus *Menidia*. Copeia, 1975: 662-691.
- Joseph, J., W. Klawe y P. Murphy. 1988. Tuna and billfish: fish without a country. Inter-American Tuna Commission. La Jolla, California. 69 pp.
- Karl, S.A. y J.C. Avise. 1992. Balancing selection at allozyme loci in oysters: implications from nuclear RFLPs. Science, 256: 100-102.



- Kornfield, I. 1986. Application of electrophoresis and mitochondrial DNA studies to herring stocks. p. 21-26. En: Identifying fish subpopulations (Hedgecock, D., ed.), Calif. Sea Grant College Program, Rep. T-CSCP-013. 51 pp.
- Kornfield, I. y S.M. Bogdanowicz. 1987. Differentiation of mitochondrial DNA in Atlantic herring, *Clupea harengus*. Fish. Bull., 85: 561-568.
- Kutkuhn, J.H. 1981. Stock definition as a necessary basis for cooperative management of Great Lakes fish resources. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 38: 1476-1478.
- Lavery, S. y J.B. Shaklee. 1991. Genetic evidence for separation of two sharks, *Carcharhinus limbatus* and *C. tilstoni*, from Northern Australia. Mar. Biol., 108: 1-4.
- Leary, R.F. y H.E. Booke. 1990. Starch gel electrophoresis and species distinctions. p. 141-170. En: Methods for Fish Biology (Schreck, C.B. y P.B. Moyle, eds.). Am. Fish. Soc. Bethesda, Maryland. 684 pp.
- Lee, S.C. y W.C. Chao. 1990. Biochemical systematics of some serranids from Taiwan (Pisces, Serranidae). Z. zool. Syst. Evolut.-forsch., 28: 183-190.
- Lewontin, R.C. 1991. Twenty-five years ago in Genetics: Electrophoresis in the development of evolutionary genetics: Milestone or millstone? Genetics: 128: 657-662.
- Li, C.C. y D.G. Horvitz. 1953. Some methods of estimating the inbreeding coefficient. Amer. J. Hum. Genet., 5: 107-117.
- MacLean, J.A. y D.O. Evans. 1981. The stock concept, discreteness of fish stocks, and fisheries management. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 38: 1889-1898.
- Magoulas, A., G. Kotoulas, J.M. De la Serna, G. De Metrio, N. Tsimenides y E. Zouros. 1992. Genetic structure of swordfish (*Xiphias gladius*) populations of the



Mediterranean and the eastern side of the Atlantic: analysis by mitochondrial DNA markers. ICCAT Working Document SCRS/92/84.

Martin, A.P., G.J.P. Naylor y S.R. Palumbi. 1992. Rates of mitochondrial DNA evolution in sharks are slow compared with mammals. *Nature*, 357: 153-155.

Mitton, J.B. y R.K. Koehn. 1975. Genetic organization and adaptative response of allozymes to ecological variables in *Fundulus heteroclitus*. *Genetics*, 79: 97-111.

Miyake, P.M. y J.C. Rey. 1989. Status of Atlantic broadbill swordfish stocks. p. 115-136. En: Proceedings of the Second International Billfish Symposium, Kaina-Kona, Hawaii, 1-5 August 1988. Part 1. (Stroud, R.H.,ed.). National Coalition for Marine Conservation, Inc. Savannah, Georgia. 361 pp.

Mulligan, T.J., R.W. Chapman y B.L. Brown. 1992. Mitochondrial DNA analysis of walleye pollock, *Theragra chalcogramma*, from the Eastern Bering Sea and Shelikof Strait, Gulf of Alaska. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 49: 319-326.

Murphy, R.W., J.W. Sites, Jr., D.G. Buth y C. H. Hauffer. 1990. Proteins I. Isozyme electrophoresis. p. 45-126. En: Molecular Systematics (Hillis, D.M. y C. Moritz, eds.). Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. 588 pp.

Nakamura, I. 1983. Systematics of billfishes (Xiphiidae and Istiophoridae). *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.*, 28: 255-396.

Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583-590.

Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York. 512 pp.



- Nei, M. y F. Tajima. 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics*, 97: 145-163.
- Nelson, J.S. 1994. *Fishes of the World*. John Wiley & Sons, Inc. New York. 600 pp.
- Nelson, K. y M. Soulé. 1987. Genetical conservation of exploited fishes. p. 345-368. En: *Population Genetics and Fishery Management* (Ryman, N. y F. Utter, eds.). University of Washington Press. Seattle. 420 pp.
- Neva, E. 1978. Genetic variation in natural populations: Patterns and theory. *Theor. Pop. Biol.*, 13: 121-177.
- Nolan, K., J. Grossfield y I. Wirgin. 1991. Discrimination among Atlantic coast populations of American shad (*Alosa sapidissima*) using mitochondrial DNA. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48: 1724-1734.
- Numachi, K., T. Kobayashi, K. Chang y Y. Lin. 1990. Genetic identification and differentiation of the formosan landlocked salmon, *Oncorhynchus masou formosanus*, by restriction analysis of mitochondrial DNA. *Bull. Inst. Zool., Academia Sinica*, 29: 61-72.
- Ovenden, J.R. 1990. Mitochondrial DNA and marine stock assessment: a review. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, 41: 835-853.
- Pella, J.J. y G.B. Milner. 1987. Use of genetic marks in stock composition analysis. p. 247-276. En: *Population Genetics and Fishery Management* (Ryman, N. y F. Utter, eds.). Washington Sea Grant Program. Seattle. 420 pp.
- Pepperell, J.G. 1990. Movements and variations in early year-class strength of black marlin (*Makaira indica*) off eastern Australia. p. 51-66. En: *Proceedings of the Second*

International Billfish Symposium, Kaila-Kona, Hawaii, 1-5 August 1988. Part 2 (Stroud, R.H., ed.). National Coalition for Marine Conservation, Inc. Savannah, Georgia. 321 pp.

Polanco-Jaime, E., R. Mimbela-Sandoval, L. Meléndez-Moreno, P. Gonzales-Quintanilla, M.A. Flores, A. Perez-Vazquez, N. Aguilar-Ley, R. Pérez-Enriques, R. Calderón-Avilés, J.L. Guerra-Raya, J. Romo-Avila, H. Gómez-Angulo, J.J. Mimbela-Sandoval, H. Cabrera-Muro, M. Diego-Peralta, J. García y J.G. Ochoa. 1987. Pesquerías mexicanas: estrategias para su administración. Secretaría de Pesca. México, D.F. 1061 pp.

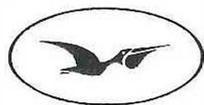
Ramsey, P.R. y J.M. Wakeman. 1987. Population structure of *Sciaenops ocellatus* and *Cynoscion nebulosus* (Pisces: Sciaenidae): Biochemical variation, genetic subdivision and dispersal. *Copeia*, 1987: 682-695.

Rand, D.M. 1994. Thermal habit, metabolic rate and the evolution of mitochondrial DNA. *Trends Ecol. Evol.*, 9: 125-131.

Richardson, B.J. 1982a. Geographical distribution of electrophoretically detected protein variation in Australian commercial fishes. I. Jack mackerel, *Trachurus declivis* Jenyns. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.*, 33: 917-926.

Richardson, B.J. 1982b. Geographical distribution of electrophoretically detected protein variation in Australian commercial fishes. II. Jackass morwong, *Cheilodactylus macropterus* Bjoch & Schneider. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.*, 33: 927-931.

Richardson, B.J., P.R. Baverstock y M. Adams. 1986. Allozyme Electrophoresis. Academic Press. Sydney. 410 pp.



- Roff, D.A. y P. Bentzen. 1989. The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms:  $\chi^2$  and the problem of small samples. *Mol. Biol. Evol.*, 6: 539-545.
- Ropson, I.J., D.C. Brown y D.A. Powers. 1990. Biochemical genetics of *Fundulus heteroclitus* (L.). VI. Geographical variation in the gene frequencies of 15 loci. *Evolution*, 44: 16-26.
- Rosa-Vélez, J. de la. 1986. Variabilidad genética poblacional en ostiones de la especie *Crassostrea virginica* del Golfo de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis Doctoral. 124 pp.
- Royce, W.F. 1984. Introduction to the Practice of Fishery Science. Academic Press, Inc. San Diego, California. 428 pp.
- Ryman, N. (ed.). 1981. Fish Gene Pools. *Ecol. Bull. (Stockholm)*, (34): 111 pp.
- Sakagawa, G.T. 1989. Trends in fisheries of swordfish in the Pacific Ocean. p. 61-79. En: *Proceedings of the Second International Billfish Symposium, Kaina-Kona, Hawaii, 1-5 August 1988. Part 1.* (Stroud, R.H., ed.). National Coalition for Marine Conservation, Inc. Savannah, Georgia. 361 pp.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch y T. Maniatis (Eds.). 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3 Volumen. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Scott, W.B. y S.N. Tibbo. 1968. Food and feeding habits of swordfish, *Xiphias gladius*, in the Western North Atlantic. *J. Fish. Res. Board. Can.*, 25: 903-919.

- Selander, R.K., M.H. Smith, S.Y. Yang, W.E. Johnson y J.B. Gentry. 1971. Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus*. I. Variation in the old-field mouse (*Peromyscus polionotus*). Stud. Genet. VI Univ. Texas Publ., 7103: 49-90.
- Seyoum, S. y I. Kornfield. 1992. Identification of the subspecies of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae) using restriction endonucleases analysis of mitochondrial DNA. Aquaculture, 102: 29-42.
- Shaklee, J.B. 1984. Genetic variation and population structure in the damselfish, *Stegastes fasciolatus*, throughout the Hawaiian Archipelago. Copeia, 1984: 629-640.
- Shaklee J.B., F.W. Allendorf, D.C. Morizot y G.S. Whitt. 1990. Gene nomenclature for protein-coding loci in fish. Trans. Amer. Fish. Soc., 119: 2-15.
- Shaklee, J.B., C.S. Tamaru y R.S. Waples. 1982. Speciation and evolution of marine fishes studied by the electrophoretic analysis of proteins. Pac. Sci., 36: 141-157.
- Shaklee, J.B., R.W. Brill y R. Acerra. 1983. Biochemical genetics of Pacific Blue Marlin, *Makaira nigricans*, from Hawaiian waters. Fish. Bull., 81: 85-90.
- Shaw, C. R. y R. Prasad. 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes - A compilation of recipes. Biochem. Genet., 4: 297-320.
- Shcaal, B.A. y W.W. Anderson. 1974. An outline of techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from the American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. Tech. Rep. Ser. Georgia Mar. Sci. Cent., (74-3): 18 pp.
- Shields, B.A., K.S. Guise y J.C. Underhill. 1990. Chromosomal and mitochondrial DNA characterization of a population of dwarf cisco (*Coregonus artedii*) in Minnesota. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 47: 1562-1569.



- Skillman, R.A. 1989a. Status of Pacific billfish stocks. p. 179-195. En: Proceedings of the Second International Billfish Symposium, Kaina-Kona, Hawaii, 1-5 August 1988. Part 1 (Stroud, R.H., ed.). National Coalition for Marine Conservation, Inc. Savannah, Georgia. 361 pp.
- Skillman, R.A. 1989b. Stock identification and billfish management. p. 207-214. En: Proceedings of the Second International Billfish Symposium, Kaina-Kona, Hawaii, 1-5 August 1988. Part 1 (Stroud, R.H., ed.). National Coalition for Marine Conservation, Inc. Savannah, Georgia. 361 pp.
- Smith, P.J. y Y. Fujio. 1982. Genetic variation in marine teleosts: High variability in habitat specialists and low variability in habitat generalists. *Mar. Biol.*, 69: 7-20.
- Sokal, R.R. y F.J. Rohlf. 1981. *Biometry*. W.H. Freeman and Company. New York, U.S.A. 859 pp.
- Sosa-Nishizaki, O. 1990. A study on the swordfish *Xiphias gladius* stocks in the Pacific Ocean. Universidad de Tokio, Facultad de Agricultura. Tesis Doctoral. 244 pp.
- Sosa-Nishizaki, O. y M. Shimizu. 1991. Spatial and temporal CPUE trends and stock unit inferred from them for the Pacific swordfish caught by the Japanese tuna longline fishery. *Bull. Nat. Res. Inst. Far Seas Fish.*, No. 28: 75-90.
- Stot, W., M.M. Ferguson, y R.F. Tallman. 1992. Genetic population structure of American Plaice (*Hippoglossoides platessoides*) from the Gulf of St. Lawrence, Canada. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 49: 2538-2545.

- Swofford, D. y R. Selander. 1981. BIOSYS-1 - A Fortran program for the comprehensive analysis of electrophoresis data in population genetics and systematics. *J. Hered.*, 72: 281-283.
- Tegelström, H. 1992. Detection of mitochondrial DNA fragments. p. 89-113. En: *Molecular Genetic Analysis of Populations. A Practical Approach* (Hoelzel, A.R., ed.). IRL Press. Oxford. 315 pp.
- Tracey, M.L., K. Nelson, D. Hedgecock, R.A. Shleser y M.L. Pressick. 1975. Biochemical genetics of lobsters: Genetic variation and the structure of American lobster (*Homarus americanus*) populations. *J. Fish. Res. Board Can.*, 32: 2091-2101.
- Toline, C.A. y A.J. Baker. 1994. Genetic differentiation among populations of the Northern redbelly dace (*Phoxinus eos*) in Ontario. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 51: 1218-1228.
- Ueyanagi, S., R.S. Shomura, Y. Watanabe y J.L. Squire. 1989. Trends in fisheries for billfishes in the Pacific. p. 31-45. En: *Proceedings of the Second International Billfish Symposium, Kaina-Kona, Hawaii, 1-5 August 1988. Part 1* (Stroud, R.H., ed.). National Coalition for Marine Conservation, Inc. Savannah, Georgia. 361 pp.
- Utter, F.M. 1991. Biochemical genetics and fishery management: an historical perspective. *J. Fish. Biol.*, 39(A): 1-20.
- Utter, F., P. Aebersold y G. Winans. 1987. Interpreting genetic variation detected by electrophoresis. p. 21-45. En: *Population Genetics and Fishery Management* (Ryman, N. y F. Utter, eds.). University of Washington Press. Seattle. 420 pp.
- Utter, F.M., H.O. Hodgins y F.W. Allendorf. 1974. Biochemical genetic studies of fishes: potentialities and limitantions. p. 213-238. En: *Biochemical and Biophysical*

Perspectives in Marine Biology. Vol. 1 (Malins, D.C. y J.R. Sargent, eds.). Academic Press. London. 343 pp.

- Wakeman, J.M. y P.R. Ramsey. 1988. Population structure and genetic variation in the Red Drum. *Cont. Mar. Sci.*, 30: 49-56.
- Ward, R.D., N. Billington y P.D.N. Hebert. 1989. Comparison of allozyme and mitochondrial DNA variation in populations of walleye, *Stizostedion vitreum*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 46: 2074-2084.
- Ward, R.D., N.G. Elliot, P.M. Grewe y A.J. Smolenski. 1994. Allozyme and mitochondrial DNA variation in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) from the Pacific Ocean. *Mar. Biol.*, 118: 531-539.
- Wilson, R.R., Jr. y P.D. Alberdi, Jr. 1991. An electrophoretic study of Spanish Sardine suggests a single predominant species in the Eastern Gulf of Mexico, *Sardinella aurita*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48: 792-798.
- Winans, G.A. 1980. Geographic variation in the milkfish *Chanos chanos*. I. Biochemical evidence. *Evolution*, 34: 558-574.
- Wirgin, I.I. y J.R. Waldman. 1994. What DNA can do for you. *Fisheries*, 19: 16-27.
- Workman, P.L. y J.D. Niswander. 1970. Population studies on Southwestern indian tribes. II. Local genetic differentiation in the Papago. *Amer. J. Hum. Genet.*, 22: 24-29.
- Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19: 395-420.
- Zar, J.H. 1984. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall. Englewood Cliffs, New Jersey. 718 pp.



## APÉNDICE A. Glosario.

Las fuentes consultadas se enlistan al final de este apéndice. Los términos equivalentes en Inglés se presentan en **negritas** al final de cada definición.

**ADN** - Acido desoxirribonucleico. Un polímero de subunidades llamadas desoxirribonucleótidos el cual es el material genético fundamental de las células. Básicamente se compone de bases nitrogenadas (purinas y pirimidinas) que forman eslabones con grupos fosfatos y azúcares (pentosas)<sup>1</sup>. **DNA**.

**ADN nuclear de copia única** - Un gen o secuencia de ADN que ocurre sólo una vez por genoma<sup>1</sup>. **Single copy nuclear DNA**.

**Alozimas** - Cualquiera de las formas múltiples de una enzima multimérica, en la cual las subunidades son codificadas por alelos del mismo gen. Los individuos homocigotos para un alelo en particular producen un sólo tipo de proteínas, pero esta enzima será diferente de un individuo a otro dependiendo del alelo en particular llevado por el locus en cuestión. Los individuos heterocigotos mostrarán, en general, formas adicionales de la enzima ya que llevan dos alelos diferentes<sup>1</sup>. **Allozymes**.

**Alelo** - Una de dos o más formas alternas de un gen que ocupa el mismo locus en un cromosoma particular y que difiere de otros alelos de ese locus en uno o más sitios mutacionales<sup>1</sup>. **Allele**.

**Alelos idénticos por descendencia** - Alelos derivados de un mismo ancestro, siendo copias exactas del mismo y que por lo tanto tienen la misma función y la misma secuencia de

nucleótido, a menos que haya ocurrido una mutación<sup>2</sup>. **Alleles identical by descent.**

**Aminoácido** - Unidades a partir de las cuales se construye una proteína, existiendo un total de 20. El orden lineal de los aminoácidos en una proteína está determinado genéticamente<sup>1</sup>. **Aminoacid.**

**ARN** - Acido ribonucleico. Es un polinucleótido que consiste esencialmente de cadenas con un esqueleto repetitivo de fosfatos y azúcares a los cuales se les unen bases nitrogenadas. El ARN es único entre las macromoléculas biológicas ya que puede codificar información genética, sirve como un abundante componente estructural de las células y también posee actividades catalíticas<sup>1</sup>. **RNA.**

**Base** - Son compuestos nitrogenados en forma de anillo. Se les conoce como "base" porque pueden combinarse con H<sup>+</sup>. Las bases presentes en los ácidos nucleicos son de dos tipos: pirimidinas (citocina, timina y uracilo) y purinas (guanina y adenina)<sup>3</sup>. **Base.**

**Cromosoma** - Estructuras presentes en el núcleo celular y que contienen a la mayoría de los genes<sup>2</sup>. Se componen de ADN y proteínas<sup>4</sup>. Esencialmente los cromosomas se involucran en dos actividades: las relacionadas con la transmisión de la información genética de célula a célula, de una generación a otra, y la relacionada con la liberación ordenada de esta información para controlar las funciones celulares y del desarrollo<sup>1</sup>.

**Chromosome.**

**Cuello de botella** - Fluctuaciones en frecuencias alélicas cuando una gran población pasa a través de una contracción (reducción en el número de individuos) y se expande de nuevo con una composición genética alterada como una consecuencia de la deriva genética<sup>4</sup>. **Bottleneck.**

**Deriva genética** - Fluctuaciones irregulares (al azar) en la frecuencia de alelos en una población de una generación a otra debido al tamaño finito poblacional o a la intensidad fluctuante de la selección. Estas fluctuaciones en la frecuencia de alelos puede conducir a la fijación de unos y a la extinción de otros sin importar su valor adaptativo<sup>1</sup>. **Genetic drift**.

**Diploide** - Condición presentada por organismos con dos conjuntos de cromosomas homólogos (uno derivado del padre y otro de la madre) en los cuales cada tipo de cromosoma (autosoma), excepto el cromosoma sexual del sexo heterogamético, esta representado dos veces<sup>1</sup>. **Diploid**.

**Distancia genética** - En genética de poblaciones es una medida cuantitativa de la relación genética entre dos individuos o poblaciones y partir de la cual se puede construir un árbol evolutivo. La medida es en términos de la probabilidad de poseer un gen o caracter dado en común. La diferencia genética acumulativa entre dos poblaciones es un resumen de su historias evolutivas y es proporcional al tiempo de separación e inversamente relacionada a la inmigración entre ellas<sup>1</sup>. **Genetic distance**.

**Divergencia de secuencia** - La diferencia porcentual en la secuencia de nucleótidos entre dos cadenas de ácidos nucléicos relacionados. También se aplica en la secuencia de aminoácidos entre dos proteínas<sup>1</sup>. **Sequence divergence**.

**Diversidad de nucleón** - Es una medida de polimorfismo al nivel del ADN. Es equivalente a la heterocigosis o diversidad de gene utilizada en el estudio de polimorfismo proteínico<sup>5</sup>. **Nucleon diversity**.

**Diversidad de nucleótido** - Es el número promedio de diferencias de nucleótido por sitio



entre dos secuencias de ADN escogidas al azar<sup>5</sup>. **Nucleotide diversity.**

**Endonucleasas de restricción** - Cualquier clase de endonucleasas de sitio específico (restrictasas) que reconocen secuencias específicas de ADN y lo dividen en o cerca de esos sitios para producir fragmentos con pesos moleculares discretos<sup>1</sup>. **Restriction endonucleases.**

**Equilibrio Hardy-Weinberg** - Un equilibrio de genotipos alcanzado en poblaciones de tamaño infinito (en las cuales no existe migración, selección o mutación) después de al menos una generación con reproducción panmítica. Con dos alelos *A* y *B* con frecuencias *p* y *q*, respectivamente, las frecuencias de los genotipos *AA*, *AB* y *BB* en el equilibrio de Hardy-Weinberg son de  $p^2$ ,  $2pq$  y  $q^2$ , respectivamente.<sup>6</sup> **Hardy-Weinberg equilibrium.**

**F<sub>is</sub>** - Conocido también como coeficiente de endogamia. Es una medida de la tasa de endogamia o el grado en el cual un individuo es endogámico. (1) *F<sub>is</sub>* individual.- Es la probabilidad de que dos alelos en un locus de un individuo se derivan de un gen ancestral en común o, alternativamente, una medida de la disminución proporcional del número promedio esperado de loci heterocigóticos en un individuo, comparados con el número promedio en sus ancestros. (2) *F<sub>is</sub>* poblacional.- Es la probabilidad de que dos genes en un locus tomados al azar en algún miembro de una población sean idénticos por descendencia, o la disminución promedio de la heterocigosis poblacional sobre todos los loci<sup>1</sup>. **Inbreeding coefficient.**

**F<sub>st</sub>** - Conocido también como coeficiente de diferenciación genética. (1) Es la magnitud relativa de la diferenciación genética entre las subpoblaciones<sup>5</sup>. (2) Es la reducción de

la heterocigosis de una subpoblación debida la deriva genética al azar<sup>7</sup>. **Coefficient of gene differentiation.**

**Frecuencias alélicas** - La medida de la frecuencia de un alelo en una población, es decir, la proporción de todos los alelos de un gen específico en la población<sup>1</sup>. **Allele frequency.**

**Gen** - La unidad básica de la herencia Mendeliana el cual representa una secuencia de ADN (o ARN en algunos virus) correspondiendo usualmente a una unidad (rara vez dos o más) de transcripción. La secuencia particular de nucleótidos a lo largo de la molécula de ácido nucleico representa una unidad funcional de la herencia. Como un resultado de la mutación se pueden producir formas alternas, las cuales se conocen como alelos. En organismos diploides los genes ocurren como pares de alelos. Los miembros de un par se segregan durante la meiosis por lo que la progenie recibe sólo un miembro del par de cada padre<sup>1</sup>. **Gene.**

**Genotipo** - Es la suma total de la información genética contenida en los cromosomas. El genotipo no determina un fenotipo único sino un rango de capacidades fenotípicas referidas como una "norma de reacción" individual al ambiente. La contribución de un genotipo particular en el acervo genético de la siguiente generación esta determinado por la viabilidad y éxito reproductivo de sus portadores<sup>1</sup>. **Genotype.**

**Haploide** - Células o individuos con un simple genoma o conjunto cromosómico<sup>1</sup>. **Haploid.**

**Haplotipos** - Un patrón determinado de fragmentos de ADN, producto de un análisis de restricción. Una vez que los haplotipos o nucleomorfos son identificados se calculan sus frecuencias relativas de igual forma que las frecuencias alélicas en un locus electroforético<sup>1</sup>. **Haplotype.**



**Heterocigosis** - La condición de poseer un par de alelos disímiles en un locus<sup>4</sup>. La heterocigosis proporciona un almacén de reservas genéticas y plasticidad potencial que permite que una gran proporción de individuos exhiban combinaciones de propiedades fenotípicas cercanas al óptimo<sup>1</sup>. **Heterozygosity.**

**Homeostasis** - La tendencia de un sistema (individuo, población, proceso) de mantener un equilibrio dinámico. En el caso de disturbio el equilibrio es restaurado por sus propios mecanismos reguladores<sup>1</sup>. **Homeostasis.**

**Mutación** - Cualquier alteración heredable, ya sea un simple cambio de bases en el ADN (o ARN) o un rearrreglo a mayor escala, en el material genético de una célula o virus<sup>1</sup>. **Mutation.**

**Nucleótidos** - Cualquiera de las unidades monoméricas que constituyen el armazón de los ácidos nucleicos o polinucleótidos. Un nucleótido consiste de una base nitrogenada (purina o pirimidina), una pentosa (D-ribosa en ARN y 2'-desoxi-D-ribosa en ADN) y un grupo fosfato (PO<sub>4</sub>). La combinación de una base nitrogenada y de un azúcar se conoce como ribonucleósido (cuando la pentosa es D-ribosa) y desoxirribonucleósido (cuando la pentosa es 2'-desoxi-D-ribosa). Los nucleótidos se forman por la agregación de un grupo fosfato a los nucleósidos para llegar a ser ribonucleótidos (en ARN) o desoxirribonucleótidos (en ADN).<sup>1</sup> **Nucleotide.**

**Polimorfismo** - La ocurrencia regular y simultánea, en la misma población, de dos o más alelos (o genotipos) en el mismo locus<sup>1</sup>. **Polymorphism.**

**Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción** - Mutaciones en sitios de restricción que causan que una enzima de restricción no corte el ADN en ese sitio (y

mutaciones que generan nuevos sitios de restricción), produciendo fragmentos de ADN de diferentes longitudes entre los individuos<sup>4</sup>. **Restriction fragment length polymorphism.**

**Promotores al azar** - Mecanismo mediante el cual una corta secuencia de nucleótidos se alinea con una banda de ADN, proporcionando un extremo libre 3'-OH para que una ADN polimerasa inicie la síntesis de una nueva cadena<sup>1</sup>. **Random priming.**

**Proteína** - Compuestos orgánicos nitrogenados de forma y composición compleja. Se construyen a partir de subunidades moleculares conocidas como polipéptidos los cuales a su vez se componen de aminoácidos, de los cuales hay 20 tipos diferentes. Estos aminoácidos, en números repetitivos de 200 o más, se unen para formar largas cadenas<sup>1</sup>.

**Protein.**

**Reloj molecular** - Es una hipótesis que postula que la tasa de evolución molecular es aproximadamente constante sobre el tiempo entre los diferentes linajes evolutivos y que refleja el tiempo de divergencia entre los taxa. Esto implica que las mutaciones de genes ocurren a un intervalo suficientemente regular que permite el fechado de las dicotomías filogenéticas<sup>1</sup>. **Molecular clock.**

**Retrocruza** - La cruce de un heterocigoto con uno de sus padres o con un individuo con un genotipo muy similar a los padres. Las generaciones se simbolizan como B<sub>1</sub> para la primera, B<sub>2</sub> para la segunda, etc. La retrocruzas segunda y posteriores se realizan cruzando los individuos B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, etc. con el mismo padre<sup>1</sup>. **Backcross.**

**Selección natural** - Es el resultado de dos actividades impuestas sobre todos los organismos vivientes: (1) la necesidad de la reproducción y (2) la necesidad de una interacción



permanente con el ambiente. La interacción de los dos factores dan como resultado una reproducción diferencial. La selección natural da dirección a los cambios (mutaciones, recombinaciones), orienta las oportunidades, filtra las adaptaciones genotípicas y promueve lentamente los cambios evolutivos<sup>1</sup>. **Natural selection.**

**Sonda** - Un segmento de ADN o ARN marcado radioactivamente o en forma no radiactiva que se utilizan para localizar secuencias similares en una colección heterogénea de secuencias<sup>4</sup>. **Probe.**

**Sustituciones de nucleótidos** - La presencia de diferentes nucleótidos en posiciones equivalentes de secuencias homólogas de ADN o ARN<sup>1</sup>. **Nucleotide substitution.**

**Transferencia Southern** - Es la transferencia de fragmentos de ADN de banda única, separados en un gel de agarosa, a un filtro de nitrocelulosa (o de otra matriz), la cual es posteriormente analizada por hibridación con una sonda radioactiva o no radioactiva. Los híbridos son detectados por autoradiografía o cambio de color, según sea el caso<sup>1</sup>. **Southern blotting.**

**Wahlund, efecto de** - Una deficiencia de heterocigotos en una población, de acuerdo a lo esperado con el equilibrio de Hardy-Weinberg. Ocurre cuando dos poblaciones divergentes (previamente aisladas y sujetas a fuerzas que conducen a una diferenciación de frecuencias alélicas entre ellas) ocurren simpátricamente y se muestrean como una simple población<sup>1</sup>. **Wahlund effect.**

**Zimograma** - Es el patrón de un gel electroforético de alozimas visualizado por medio de una tinción histoquímica<sup>6</sup>. **Zymogram.**

## Referencias.

1. Rieger, R., A. Michaelis y M.M. Green. 1991. **Glossary of Genetics: Classical and Molecular.** Springer-Verlag. Berlin. 553 pp.
2. Utter, F., P. Aebersold y G. Winans. 1987. **Interpreting genetic variation detected by electrophoresis.** p. 21-45. En: **Population Genetics and Fishery Management.** (Ryman, N. y F. Utter, eds.). University of Washington Press. Seattle. 420 pp.
3. Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y J.D Watson. 1983. **Molecular Biology of the Cell.** Garland Publishing, Inc. New York. 1146 pp.
4. Hoelzel, A.R. y G.A. Dover. 1991. **Molecular Genetic Ecology.** Oxford University Press. New York. 75 pp.
5. Nei, M. 1987. **Molecular Evolutionary Genetics.** Columbia University Press. New York. 512 pp.
6. Hillis, D.M. y C. Moritz (eds.). 1990. **Molecular Systematics.** Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. 588 pp.
7. Hartl, D.L. 1988. **A Primer of Population Genetics.** Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. 305 pp.

## APÉNDICE B. Protocolos del análisis RFLP.

En las metodologías que se describen a continuación los procesos de reacción se llevan a cabo en tubos Eppendorf de 1.5 ml (esterilizados). Esto implica que las cantidades manejadas son muy pequeñas y que por lo general las pequeñas gotas de los reactivos quedan adheridas a la pared de los tubos. Lo más recomendable y práctico para que las gotas se concentren en el fondo es el uso de las pequeñas “micro” centrífugas para tubos Eppendorf con capacidad para seis tubos. Un simple “toque” de centrífuga es suficiente para que las gotas bajen. Este paso está indicado por la palabra “microcentrífuga”. Los reactivos y soluciones necesarias se detallan al final de este apéndice. Estos protocolos corresponden a los utilizados en el Laboratorio de Dinámica de Poblaciones del Instituto de Investigaciones Oceánicas de la Universidad de Tokio, bajo la dirección del Dr. Ken-ichi Numachi (actualmente el Dr. Numachi se encuentra adscrito a la Facultad de Ciencia y Tecnología Marina de la Universidad Tokai en Shimizu, Japón).

### I. EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL.

- 1.- Poner en cada tubo 500 µl de buffer homogenizador.
- 2.- Poner la muestra de tejido, eliminando el exceso de alcohol.
- 3.- Homogenizar manualmente para romper la fibra muscular.
- 4.- Agregar 25 µl de SDS al 20%. Agitar brevemente.

- 5.- Microcentrífuga.
- 6.- Agregar 25  $\mu$ l de Proteinasa K (20 mg/ml).
- 7.- Incubar en un baño de agua a 37°C.
- 8.- Checar la muestra después de una hora, si es necesario agregar 20  $\mu$ l de Proteinasa K.
- 9.- Incubar toda la noche en baño de agua a 37°C.
- 10.- Microcentrífuga.
- 11.- Agregar 60  $\mu$ l de NaCl 5 M.
- 12.- Microcentrífuga.
- 13.- Agregar 500  $\mu$ l de fenol-cloroformo.
- 14.- Agitación circular lenta por 20 minutos.
- 15.- Centrifugar a 13,000 rpm por 20 minutos a 3-4°C.
- 16.- Transferir la capa superior a un tubo limpio sin disturbar la interfase, utilizando una punta (de pipeta Eppendorf) de boca ancha. Descartar el resto.
- 17.- Agregar 1 ml de etil-éter.
- 18.- Agitación circular rápida por 10 minutos.
- 19.- Microcentrífuga.
- 20.- Descartar la capa superior (etil-éter).
- 21.- Repetir los pasos 17 al 20.
- 22.- Agregar 500  $\mu$ l de etanol al 99.5%.
- 23.- Mezclar manualmente de 2 a 3 minutos.
- 24.- Congelar a -80°C por una hora o a -20°C por cuatro horas.

- 25.- Centrifugar a 13,000 rpm por 20 minutos a 3-4°C.
- 26.- Descartar la fase líquida sin disturbar el pelet.
- 27.- Agregar 500 µl de etanol al 70%.
- 28.- Centrifugar a 13,000 rpm por 20 minutos a 3-4°C.
- 29.- Descartar la fase líquida sin disturbar el pelet.
- 30.- Secar al vacío por 10 minutos.
- 31.- Agregar 200 µl de solución amortiguadora TE. Dejar disolver por media hora a temperatura ambiente.
- 32.- Almacenar a -20°C (hasta por un año).

## II. ELECTROFORESIS EN MINIGEL.

Esta parte es útil para comprobar el estado de la muestra y la concentración relativa de ADN entre las muestras.

- 1.- Preparar agarosa al 0.8% en amortiguador TAE ×1 (0.8 g en 100 ml).
- 2.- Disolver completamente en baño de agua a 65°C o en horno microondas.
- 3.- Vertir en los moldes. Si se disolvió en horno microondas esperar que la temperatura baje un poco.
- 4.- Sembrar el gel con una mezcla de 5 µl del extracto de ADN más 2 µl de colorante. En un extremo sembrar una mezcla de 1 µl de marcador PUC (50 ng/µl) más 2 µl de colorante.
- 5.- Aplicar la corriente eléctrica (100 v) por aproximadamente media hora.
- 6.- Colocar los geles en una solución de Bromuro de etidio, con agitación por 10 minutos si

la solución es nueva, de lo contrario 20-30 minutos.

7.- En un transiluminador UV tomar la fotografía con película Polaroid 667.

### III. DIGESTIÓN CON ENDONUCLEASAS.

1.- Típicamente en la digestión se mezclan 8  $\mu$ l del extracto de ADN, 1  $\mu$ l de la endonucleasa y 1  $\mu$ l del amortiguador correspondiente. Para cada reacción se utilizan de 10 a 12 unidades de enzima. El volumen del extracto de ADN puede variar dependiendo de la concentración de la muestra, la cual se verifica en la fotografía del minigel. Si la muestra está muy concentrada entonces se diluye con agua ultrapura. Si la muestra es de baja concentración, entonces se aumenta el volumen del extracto, manteniendo las proporciones con la endonucleasa y el amortiguador.

2.- Microcentrífuga.

3.- Mezclar en el vortex o con golpes de dedo por unos segundos.

4.- Microcentrífuga.

5.- Incubar a 37°C por cuatro horas.

6.- Microcentrífuga.

7.- Parar la digestión agregando 2  $\mu$ l de colorante.

8.- Almacenar a -20°C.

### IV. ELECTROFORESIS Y TRANSFERENCIA SOUTHERN.

1.- Preparar los geles con agarosa al 0.8%.



- 2.- Sembrar el gel con las muestras digeridas. Colocar el marcador en los extremos y en la parte media.
- 3.- Aplicar corriente eléctrica (45 mA). Parar la electroforesis cuando el colorante haya avanzado 2/3 de la longitud del gel.
- 4.- Poner los geles en una solución de HCl 0.25 N y agitar por 12 minutos (depuración ácida).
- 5.- Descartar el ácido y enjuagar con agua ultrapura dos veces.
- 6.- Poner los geles en amortiguador de desnaturalización y agitar por 30 minutos.
- 7.- Descartar el amortiguador y enjuagar con agua ultrapura dos veces.
- 8.- Poner los geles en amortiguador de neutralización y agitar por 30 minutos.
- 9.- Transferir el ADN del gel a la membrana de nailon. Si se utilizan cámaras de transferencia al vacío aplicar presión de 10-15 cm de Hg por 45-60 minutos. Utilizar amortiguador SSC  $\times 10$  para mantener la humedad.
- 10.- Al finalizar la transferencia marcar el origen en la membrana y la posición del colorante. Opcional: revisar el gel con bromuro de etidio para ver si la transferencia fue completa. Lavar el material a la brevedad o ponerlo en remojo.
- 11.- Enjuagar las membranas en amortiguador SSC  $\times 2$  por 2-3 minutos.
- 12.- Eliminar cuidadosamente el exceso de humedad con servilletas.
- 13.- Colocar las membranas en la cámara ultravioleta (crosslinker) para fijar el ADN a la membrana.
- 14.- Secar las membranas.
- 15.- Almacenar las membranas en bolsas de plástico selladas.

## V. PREPARACIÓN DE LA SONDA DE ADNmt.

Preferentemente se debe de utilizar la molécula circular cerrada de ADNmt altamente purificada de la misma especie. En este caso utilizamos ADNmt de salmon, cuya purificación no la detallo aquí por no haberla realizado personalmente. El marcador sonda ( $\lambda$ HindIII) se prepara de la misma forma iniciando con los pasos del segundo día. Este protocolo y el de hibridación y detección corresponden al método de promotores al azar marcando con digoxigenina de acuerdo, en el aspecto general, al kit comercial distribuido por Boehringer Mannheim GmbH.

### A) Primer día.

1.- Digerir el ADNmt de salmon con la siguiente mezcla:

ADNmt de salmon.....20  $\mu$ l

Endonucleasa HindIII (10 u/ $\mu$ l).....2.4  $\mu$ l

Amortiguador K\*.....2.4  $\mu$ l

\* El Amortiguador K es el que corresponde a la endonucleasa.

2.- Microcentrífuga.

3.- Incubar en baño de agua a 37°C por tres horas.

4.- Microcentrífuga.

5.- Agregar 475  $\mu$ l de agua ultrapura.

6.- Mezclar y microcentrífuga.

7.- Agregar 50  $\mu$ l de NaCl 5 M.

8.- Repetir los pasos 13 al 30 del protocolo de extracción.



9.- Agregar 20  $\mu$ l de amortiguador TE.

10.- Almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

B) Segundo día.

1.- Agregar 10  $\mu$ l de agua ultrapura.

2.- Poner el tubo con la tapa sellada en un baño de agua hirviendo por 10 minutos.

3.- Enfriar en agua-hielo por cinco minutos.

4.- Microcentrifuga.

5.- Agregar 4  $\mu$ l de la mezcla de hexamucleótidos y 4  $\mu$ l de la mezcla de marcado (dNTP).

6.- Mezclar y microcentrifuga.

7.- Agregar 2  $\mu$ l de enzima Klenow (4 u/ $\mu$ l).

8.- Mezclar y microcentrifuga.

9.- Incubar en baño de agua a  $37^{\circ}\text{C}$  por tres horas.

10.- Microcentrifuga.

11.- Agregar 20  $\mu$ l de ARNt (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

12.- Agregar 4  $\mu$ l de LiCl 4 M.

13.- Mezclar y microcentrifuga.

14.- Agregar 120  $\mu$ l de etanol al 99.5%.

15.- Congelar a  $-80^{\circ}\text{C}$  por una hora.

16.- Centrifugar a 13,000 rpm a  $3-4^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos.

17.- Descartar la fase líquida sin disturbar el pellet.



- 18.- Agregar 500 µl de etanol al 70% y mezclar.
- 19.- Centrifugar a 13,000 rpm a 3-4°C por 20 minutos.
- 20.- Descartar la fase líquida.
- 21.- Secar al vacío por 10 minutos.
- 22.- Agregar 500 µl de amortiguador TE.
- 23.- Almacenar a -20°C.

## VI. HIBRIDACIÓN Y DETECCIÓN.

La solución de hibridación se puede preparar con antelación, almacenando en alcuotas a -20°C.

### A) Primer día.

- 1.- Colocar la(s) membrana(s) en una bolsa de plástico y agregar la solución de hibridación (para una membrana 10 ml es suficiente).
- 2.- Eliminar burbujas y sellar.
- 3.- Incubar en baño de agua a 65°C por cuatro horas. Distribuir de vez en cuando la solución.
- 4.- Media hora antes de parar la incubación preparar la siguiente mezcla de hibridación en un tubo Eppendorf:
 

<i>λ</i> HindIII sonda digoxigenina.....	2 µl
ADNmt de salmon sonda digoxigenina.....	50 µl
ADN de espermatozoos de arenque.....	20 µl
- 5.- Colocar el tubo con la tapa sellada en un baño de agua hirviendo por 10 minutos y enfriar

en agua-hielo por cinco minutos. Agregar esta mezcla a 4 ml de solución de hibridación.

- 6.- Después de la incubación (paso 3) descartar la solución de hibridación y agregar la mezcla de hibridación. Utilizar la misma bolsa de plástico. Eliminar burbujas y sellar.
- 7.- Incubar toda la noche en baño de agua a 65°C (mínimo seis horas). Si es posible, distribuir la mezcla a intervalos de tiempo.

#### B) Segundo día.

- 1.- Preparar amortiguador #2.
- 2.- Parar incubación. La mezcla de hibridación se puede reusar hasta cinco veces desnaturalizándola previamente en cada uso y revitalizándola con ADNmt sonda si es necesario. Almacenarla a -20°C.
- 3.- Enjuagar la membrana con solución de lavado por 10 minutos. Hacerlo tres veces.
- 4.- Enjuagar con amortiguador #1 por un minuto. Hacerlo tres veces.
- 5.- Enjuagar con amortiguador #2 por 30 minutos.
- 6.- Enjuagar con amortiguador #1 por un minuto. Hacerlo tres veces.
- 7.- Mezclar 10 ml de amortiguador #1 con 2 µl de conjuado AP anti-digoxigenina. Esta cantidad es suficiente para una membrana. Si se tienen varias membranas se debe de mantener esta proporción.
- 8.- Poner la membrana en una bolsa de plástico con la mezcla anterior. Eliminar burbujas y sellar.
- 9.- Poner en agitación por una hora.
- 10.- Enjuagar con amortiguador #1 por 10 minutos. Hacerlo tres veces.

11.- Enjuagar con amortiguador #3 por cinco minutos. Hacerlo dos veces.

12.- Preparar la solución reveladora:

Amortiguador #3.....5 ml

NBT (75 mg/ml).....22.5  $\mu$ l

X-fosfato (50 mg/ml).....17.5  $\mu$ l

Esta cantidad es suficiente para una membrana. Aumentar las cantidades de acuerdo al número de membranas.

13.- Poner la membrana en una bolsa de plástico con la solución reveladora, eliminando todas las burbujas. Si no se eliminan las burbujas quedarán marcas en la membrana.

Hacer este paso rápidamente porque la luz afecta a la solución.

14.- Poner la bolsa en la incubadora a 37°C (es importante la oscuridad). Usualmente en una hora se revelan las bandas, pero si es necesario se puede dejar revelando toda la noche.

15.- Parar el revelado enjuagando la membrana con agua destilada.

16.- Secar la membrana en la secadora.

17.- Almacenar la membrana en una bolsa de plástico sellada. Las anotaciones se pueden hacer sobre una fotocopia de la membrana.



## REACTIVOS.

## Amortiguador homogenizador.

Tris-HCl pH 8.0 0.01 M  
 NaCl 0.01 M  
 EDTA 0.05 M  
 Mantener **frío**.

## SDS al 20%.

SDS..... 200 g  
 Agua..... 750 ml  
 Ajustar el pH a 7.2 con HCl.  
 Aforar a un litro.

## Proteinasa K.

Proteinasa K..... 100 g  
 Agua..... 5 ml  
 Mantener a -20°C.

## Amortiguador TE.

Tris 0.01 M  
 EDTA 0.001 M  
 pH 7.5

## Fenol-cloroformo.

- 1.- Fundir 500 g de fenol en baño de agua a 65°C.
- 2.- Agregar 0.5 g de 8-hidroxiquinolina.
- 3.- Agregar 300 ml de Tris-HCl 1 M, pH 8.
- 4.- Descartar la capa superior.
- 5.- Agregar 300 ml de Tris-HCl 0.1 M, pH 8.
- 6.- Mezclar y dejar separar las dos capas.
- 7.- Descartar la capa superior.
- 8.- Agregar 300 ml de cloroformo-isoamilalcohol (24:1).
- 9.- Almacenar a 4°C. Se utiliza la capa inferior. Es bueno por un mes.

## Amortiguador TAE (×50).

Tris 2 M  
 Ac. acético glacial 1 M  
 EDTA 0.05 M  
 pH 8

## Amortiguador TAE (×1)

TAE (×50)..... 20 ml  
 Agua..... 1000 ml

**Colorante.**

Urea 7 M  
 BPB 0.1%  
 EDTA 0.01 M  
 Sucrosa 50%  
 Autoclavar.

**Solución de bromuro de etidio.**

Bromuro de etidio..... 10  $\mu$ l  
 Agua..... 200 ml

**Estándar  $\lambda$ HindIII (Stock: 0.505  $\mu$ g/ $\mu$ l).**

Estándar..... 1  $\mu$ l  
 Agua ultrapura..... 10  $\mu$ l  
 Colorante..... 21  $\mu$ l  
 Sembrar el gel con 6  $\mu$ l

**Acido clorhídrico 0.25 N.**

HCl..... 10.37 ml  
 Agua para 500 ml

**Amortiguador de desnaturalización.**

NaOH 2 M..... 50 ml  
 NaCl 5 M..... 40 ml  
 Agua..... 160 ml

**Amortiguador de neutralización.**

Tris-HCl 1 M pH 7.4..... 125 ml  
 NaCl 5 M..... 75 ml  
 Agua..... 50 ml

**SSC ( $\times$ 20).**

NaCl..... 350.64 g  
 Citrato de sodio..... 176.46 g  
 Agua para dos litros.

Utilizar agua caliente y disolver primero el citrato de sodio.

SSC  $\times$ 10 = 500 ml SSC  $\times$ 20 + 500 ml agua.

SSC  $\times$ 5 = 250 ml SSC  $\times$ 20 + 750 ml agua.

SSC  $\times$ 2 = 100 ml SSC  $\times$ 20 + 900 ml agua.

**Solución de lavado.**

SSC  $\times$ 2..... 1000 ml  
 SDS 20%..... 5 ml

**Solución de hibridación.**

SSC  $\times 5$ ..... 100 ml  
Reactivo bloqueador..... 1 g  
N-lauroylsarcosina, sal de Na..... 0.01 g  
SDS..... 0.02 g  
Almacenar en alícuotas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Amortiguador #1.**

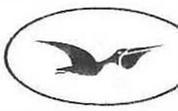
Tris-HCl 2 M pH 7.5..... 200 ml  
NaCl 5 M..... 120 ml  
Aforar a cuatro litros.

**Amortiguador #2.**

Reactivo bloqueador..... 1 g  
Amortiguador #1..... 200 ml  
Disolver en agua caliente.

**Amortiguador #3.**

Tris-HCl 2 M pH 9.5..... 100 ml  
NaCl 5 M..... 40 ml  
MgCl 2 M..... 50 ml  
Aforar a 2 litros.



APÉNDICE C. Patrones de los fragmentos de restricción resultantes del análisis del ADNmt. Los tamaños de los fragmentos son en pares de bases.

<u>BglI</u>						<u>ApaI</u>						<u>DraI</u>			
A	B	C	D	E	F	A	B	C	D	E	F	A	B	C	D
3323	8323	7429	6070	9179	8323	7077	7077	14264	7077	7077	7077	6245	6245	5245	6245
3694	3694	3694	3694	3694	3694	6282	5771	2502	6282	3346	5593	2438	2438	5070	3643
2799	2360	2799	2799	2799	1518	2502	2502		1748	2806	2502	2116	1442	2116	2438
693	693	818	2341	693	969	506	506		716	2502	716	1442	1076	1442	1442
		693	693		693				506	506	506	1076		1076	1076
15509	15070	15433	15597	16365	15197	16367	15856	16776	16329	16237	16394	13317	11201	16949	14844

<u>SacI</u>				<u>XpaI</u>			<u>PvuII</u>			<u>SacII</u>		<u>SmaI</u>	
A	B	C	D	A	B	C	A	B	C	A	B	A	B
12820	7084	17250	10581	7185	15237	11174	13274	11243	9680	13099	15819	3856	7186
4241	5474		7005	5715	3049	5715	3031	3031	3031x2	2098	1623	7186	5040
	4241			3049				1640		1623			3753
17060	16799	17250	17586	15949	18286	16889	16305	15914	15742	16820	17442	16042	15979

<u>XbaI</u>	<u>HindIII</u>	<u>EcoRV</u>	<u>PstI</u>	<u>BglII</u>	<u>SalI</u>	<u>BamHI</u>	<u>XhoI</u>	<u>EcoRI</u>
A	A	A	A	A	A	A	A	A
4742	11890	10394	11800	10274	12060	18345	17786	17702
4525	2785	3424	5480	5756	4804			
3068	2355	3178						
2269								
1537								
16141	17030	16996	17280	16030	16864	18345	17786	17702

APÉNDICE D. Matriz del porcentaje de la divergencia de secuencia (arriba de la diagonal) y del número de los fragmentos de restricción compartidos (abajo de la diagonal) entre los 27 haplotipos del pez espada. Los valores sobre la diagonal se refieren a los fragmentos para cada haplotipo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27		
1	<b>25</b>	0.34	1.05	0.69	0.34	0.35	0.61	0.35	0.47	0.34	0.94	0.23	0.49	0.47	0.34	0.49	0.11	0.34	0.34	1.32	0.23	1.42	0.23	0.35	0.35	0.58	0.34		
2	24	<b>26</b>	0.66	0.33	0.69	0.47	0.72	0.72	0.83	0.69	0.55	0.58	0.87	0.11	0.69	0.60	0.47	0.69	0.69	1.75	0.58	1.01	0.58	0.72	0.72	0.22	0.69		
3	22	24	<b>28</b>	0.31	1.42	1.21	1.49	1.49	1.60	1.42	0.53	1.32	1.67	0.80	1.42	1.38	1.21	1.42	1.42	2.32	1.32	0.30	1.32	1.49	1.49	0.90	1.42		
4	23	25	26	<b>27</b>	1.05	0.83	1.10	1.10	1.21	1.05	0.21	0.94	1.27	0.45	1.05	0.98	0.83	1.05	1.05	2.21	0.94	0.63	0.94	1.10	1.10	0.55	1.05		
5	24	23	21	22	<b>26</b>	0.72	0.98	0.47	0.58	0.69	1.32	0.34	0.60	0.83	0.69	0.87	0.47	0.69	0.45	1.44	0.58	1.81	0.58	0.72	0.72	0.94	0.69		
6	23	23	21	22	22	<b>24</b>	0.49	0.75	0.87	0.72	1.10	0.60	0.91	0.60	0.72	0.12	0.49	0.72	0.72	1.84	0.60	1.60	0.60	0.75	0.75	0.72	0.72		
7	22	22	20	21	21	22	<b>24</b>	0.75	0.87	0.98	1.38	0.87	1.20	0.60	0.98	0.37	0.49	0.98	0.98	2.20	0.87	1.90	0.87	1.03	1.03	0.72	0.98		
8	23	22	20	21	23	21	21	<b>24</b>	0.11	0.72	1.38	0.11	0.63	0.60	0.72	0.63	0.24	0.72	0.47	1.51	0.60	1.90	0.60	0.75	0.75	0.72	0.72		
9	23	22	20	21	23	21	21	24	<b>25</b>	0.83	1.49	0.23	0.75	0.72	0.83	0.75	0.35	0.83	0.58	1.63	0.72	2.01	0.72	0.87	0.87	0.58	0.83		
10	24	23	21	22	23	22	21	22	22	<b>26</b>	1.05	0.58	0.87	0.83	0.69	0.87	0.47	0.45	0.69	1.75	0.58	1.01	0.58	0.72	0.72	0.94	0.69		
11	22	24	25	26	21	21	20	20	20	22	<b>27</b>	1.21	1.56	0.69	1.32	1.26	1.09	1.05	1.32	2.57	1.21	0.63	1.21	1.38	1.38	0.80	1.32		
12	24	23	21	22	24	22	21	24	24	23	21	<b>25</b>	0.49	0.72	0.58	0.75	0.35	0.58	0.34	1.32	0.47	1.71	0.47	0.60	0.60	0.83	0.58		
13	22	21	19	20	22	20	19	21	21	21	19	22	<b>23</b>	1.03	0.87	1.08	0.63	0.87	0.60	0.78	0.75	2.10	0.75	0.91	0.91	1.15	0.87		
14	23	25	23	24	22	22	22	22	22	22	23	22	20	<b>25</b>	0.83	0.49	0.35	0.83	0.83	1.97	0.72	1.16	0.72	0.87	0.87	0.11	0.83		
15	24	23	21	22	23	22	21	22	22	23	21	23	21	22	<b>26</b>	0.87	0.47	0.69	0.45	1.75	0.58	1.81	0.58	0.72	0.72	0.94	0.69		
16	22	22	20	21	21	23	22	21	21	21	20	21	19	22	21	<b>23</b>	0.37	0.87	0.87	2.07	0.75	1.79	0.75	0.91	0.91	0.60	0.87		
17	24	23	21	22	23	22	22	23	23	23	21	23	21	23	23	22	<b>24</b>	0.47	0.47	1.51	0.35	1.60	0.35	0.49	0.49	0.47	0.47		
18	24	23	21	22	23	22	21	22	22	24	22	23	21	22	23	21	23	<b>26</b>	0.69	1.75	0.58	1.53	0.58	0.72	0.72	0.94	0.69		
19	24	23	21	22	24	22	21	23	23	23	21	24	22	22	24	21	23	23	<b>26</b>	1.44	0.58	1.81	0.58	0.72	0.72	0.94	0.69		
20	19	18	17	17	19	17	16	18	18	18	16	19	20	17	18	16	18	18	19	<b>23</b>	1.63	2.80	1.63	1.85	1.85	2.09	1.75		
21	24	23	21	22	23	22	21	22	22	23	21	23	21	22	23	21	23	23	23	23	18	<b>25</b>	1.71	0.47	0.60	0.60	0.83	0.34	
22	21	23	27	25	20	20	19	19	19	23	25	20	18	22	20	19	20	21	20	21	20	16	20	<b>29</b>	1.71	1.90	1.90	1.26	1.81
23	24	23	21	22	23	22	21	22	22	23	21	23	21	22	23	21	23	23	23	18	23	20	<b>25</b>	0.60	0.60	0.83	0.58		
24	23	22	20	21	22	21	20	21	21	22	20	22	20	21	22	20	22	22	22	17	22	19	22	<b>24</b>	0.49	0.98	0.72		
25	23	22	20	21	22	21	20	21	21	22	20	22	20	21	22	20	22	22	22	17	22	19	22	22	<b>24</b>	0.98	0.72		
26	23	25	23	24	22	22	22	22	23	22	23	22	20	25	22	22	23	22	22	17	22	22	22	22	21	21	<b>26</b>	0.94	
27	24	23	21	22	23	22	21	22	22	23	21	23	21	22	23	21	23	23	23	18	24	20	23	22	22	22	<b>26</b>		

## APÉNDICE E. Sistemas enzimáticos.

Las cantidades que aquí se detallan son suficientes para procesar una rebanada horizontal del gel, por lo que en el caso de tener varias rebanadas para una enzima determinada hay que tomar en cuenta los volúmenes necesarios. Los reactivos en solución y los amortiguadores se detallan al final de este apéndice.

### IDHP

Isocitrato de sodio.....	0.07 g
NBT.....	0.01 g
NADP.....	0.015 g
MgCl <sub>2</sub> 10%.....	0.2 ml
PMS 0.1%.....	1 ml
Tris-HCl 0.1 M pH 8.0.....	48.8 ml

### LDH

NAD.....	0.025 g
Solución sustrato LDH.....	5 ml
MTT 1%.....	1.5 ml
PMS 0.1%.....	1 ml
Tris-HCl 0.5 M pH 7.1.....	35 ml

#### Solución sustrato LDH

Acido láctico 80%.....	0.562 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 1 M.....	2.45 ml
Agua.....	1.987 ml

### GPI

D-fructuosa 6 fosfato.....	0.08 g
NADP.....	0.005 g
Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (100 u/ml).....	0.8 ml
MTT 1%.....	0.5 ml
PMS 0.1%.....	0.5 ml
Tris-HCl 0.1 M pH 8.0.....	42.8 ml



## MEP

NADP.....	0.02 g
NBT.....	0.02 g
Solución sustrato MDH.....	5 ml
PMS 0.1%.....	20 ml
MgCl <sub>2</sub> 10%.....	0.2 ml
Tris-HCl 0.1 M pH 8.4.....	20 ml
Agua.....	55 ml

## Solución sustrato MDH

DL-ácido málico.....	1.34 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 2M.....	4.9 ml
Agua.....	5.1 ml
Ajustar el pH a 7.0	

## PGM

α-D-glucosa 1 fosfato.....	0.25 g
EDTA-Na <sub>2</sub> .....	0.025 g
NBT.....	0.01 g
NADP.....	0.005 g
Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (100 u/ml).....	0.4 ml
MgCl <sub>2</sub> .....	0.1 ml
PMS 0.1%.....	1 ml
Tris-HCl 0.1 M pH 7.1.....	48.5 ml

## AAT

Solución sustrato AAT.....	25 ml
Agua.....	25 ml
Azul rápido BB.....	0.125 g

Post-unión: tomar 5 ml de la mezcla de solución sustrato y agua y agregarle el azul rápido. Incorporar al gel después de 15 minutos de incubación a 37°C.

## Solución sustrato AAT pH 7.4

Acido α-cetoglutarico.....	0.01825 g
Acido L-aspártico.....	0.0665 g
Polivinilpirrolidona.....	0.25 g
EDTA-Na <sub>2</sub> .....	0.025 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.71 g
Agua.....	25 ml



## G6PDH

Glucosa 6 fosfato.....	0.08 g
NADP.....	0.015 g
MTT 1%.....	1 ml
PMS 0.1%.....	1 ml
Tris-HCl 0.5 M pH 7.1.....	12.5 ml
Agua.....	35.5 ml

## XDH

Hipoxantina.....	0.05 g
Tris-HCl 0.5 M pH 7.0.....	5 ml
Disolver perfectamente y mezclar con:	
NAD.....	0.015 g
MTT 1%.....	1 ml
PMS 0.1%.....	1 ml
Agua.....	43 ml

## GDH

NAD.....	0.025 g
Solución sustrato GDH.....	2.5 ml
MTT 1%.....	1.5 ml
PMS 0.01%.....	1 ml
Amortiguador de fosfatos 0.5 M pH 7.0.....	12.5 ml
Agua.....	32.5 ml

## Solución sustrato GDH

Glutamato de sodio.....	0.2125 g
Amortiguador de fosfatos 0.5 M pH 7.0.....	5 ml

## ACP

1-naftil fosfato ácido.....	0.05 g
Azul rápido BB.....	0.05 g
Acetato de sodio 0.05 M pH 5.0.....	50 ml

## ODH

NADP.....	0.125 g
Solución sustrato ODH.....	0.5 ml
MTT 1%.....	1 ml
PMS 0.1%.....	2.5 ml
Tris-HCl 0.1 M pH 7.4.....	46 ml



**Solución sustrato ODH**

1-octanol.....	1 ml
Etanol.....	4 ml

**SDH**

Sorbitol.....	0.25 g
NAD.....	0.005 g
MIT 1%.....	0.7 ml
PMS 0.1%.....	1 ml
Tris-HCl 0.1 M pH 8.0.....	48.3 ml

**G3PDH**

NAD.....	0.025 g
Solución sustrato G3PDH.....	5 ml
MIT 1%.....	1.5 ml
PMS 0.1%.....	1 ml
Tris-HCl 0.5 M pH 7.1.....	7.5 ml
Agua.....	35 ml

**Solución sustrato G3PDH**

DL- $\alpha$ -glicerofosfato.....	1.08 g
Agua.....	5 ml

**PROT**

- 1.-Cubrir el gel con azul de Coomasie R250 (2.5%) por una hora.
- 2.-Enjuagar con solución fijadora y destefidora y dejar 24 horas en esta solución.

**EST**

Azul rápido BB.....	0.05 g
Solución sustrato EST.....	1.5 ml
Tris-HCl 0.5 M pH 7.1.....	5 ml
Agua.....	43.5 ml

**Solución sustrato EST**

1 Nafil acetato.....	0.05 g
2 Nafil acetato.....	0.05 g
Acetona.....	2.5 ml
Agua.....	2.5 ml

**GAPDH**

NAD.....	0.025 g
Arseniato de sodio.....	0.09 g
Solución sustrato GAPDH.....	5 ml
MTT 1%.....	1.5 ml
FMS 0.1%.....	1 ml
Tris-HCl 0.5 M pH 7.1.....	10 ml
Agua.....	32.5 ml

**Solución sustrato GAPDH**

D-fructosa 1,6 difosfato.....	0.273 g
Aldolasa.....	0.09 ml
Tris-HCl 0.5 M pH 7.1.....	2 ml
Agua.....	3 ml

Mezclar e incubar a 37°C por 30 minutos.

**Amortiguador de fosfatos 0.5 M pH 7.0****Solución A:**

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (anhidro).....	3.549 g
Agua.....	50 ml

**Solución B:**

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (monohidrato).....	3.45 g
Agua.....	50 ml

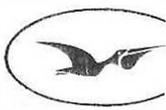
Ajustar el pH a 7.0 titulando la solución B con la A.

**Azul de Coomasie**

Azul de Coomasie.....	1.25 g
Metanol.....	227 ml
Acido acético.....	46 ml
Agua.....	227 ml

**Solución fijadora y destefidora**

Metanol.....	600 ml
Acido acético.....	200 ml
Agua.....	1200 ml



**Amortiguador A****Electrodo:**

Tris 0.687 M

Ac. cítrico 0.157 M

pH 8.0

**Gel:**

Tris 0.0229 M

Acido cítrico 0.0052 M

pH 8.0

**Amortiguador B****Electrodo:**

Tris 0.10 M

Acido maleico 0.10 M

EDTA-Na<sub>2</sub> 0.01 M

Cloruro de magnesio 0.01 M

pH 7.4

**Gel:**

Dilución 1:9 del amortiguador para electrodo.

**Amortiguador C****Electrodo:**

Tris 0.5 M

Acido bórico 0.65 M

EDTA-Na<sub>2</sub> 0.016 M

pH 8.0

**Gel:**

Tris 0.05 M

Acido bórico 0.097 M

EDTA-Na<sub>2</sub> 0.0016 M

pH 8.0

**Amortiguador D****Electrodo:**

Tris 0.135 M

Acido cítrico 0.045 M

pH 7.0

**Gel:**

Tris 0.009 M

Acido cítrico 0.003 M

pH 7.0



**Amortiguador E****Electrodo:****Acido cítrico 0.04 M****pH 6.1 con amino propil morfolina.****Gel:****Acido cítrico 0.002 M****pH 6.1 con amino propil morfolina.**