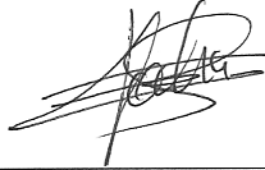


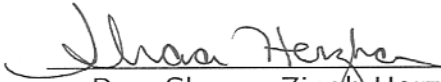
TESIS DEFENDIDA POR

Ismael Guzmán Valdivieso

Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ



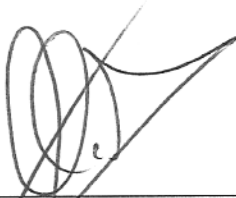
Dr. Axayácatl Rocha Olivares
Director del Comité



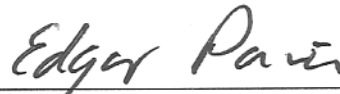
Dra. Sharon Zinab Herzka Llona
Miembro del Comité



Dr. Miguel Angel del Río Portilla
Miembro del Comité



Dr. Luis Eduardo Calderón Aguilera
*Coordinador del programa de
posgrado en Ecología Marina*



Dr. Edgar Pávia López
Director de Estudios de Posgrado

03 de Octubre de 2007

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN
SUPERIOR DE ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
EN ECOLOGÍA MARINA**

**IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES MICROSATELITALES PARA
LA SARDINA DEL PACÍFICO NORORIENTAL *Sardinops sagax caeruleus***



TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

ISMAEL GUZMÁN VALDIVIESO

Ensenada, Baja California, México. Octubre de 2007.

RESUMEN de la tesis que presenta **Ismael Guzmán Valdivieso**, como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS con orientación en ECOLOGÍA MARINA. Ensenada, Baja California.

IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES MICROSATELITALES PARA LA SARDINA DEL PACÍFICO NORORIENTAL *Sardinops sagax caeruleus*

Resumen aprobado por:

Dr. Axayácatl Rocha Olivares

La sardina del Pacífico Nororiental (*Sardinops sagax caeruleus*) es un recurso de importancia económica cuya abundancia ha fluctuado significativamente en el pasado. Estas grandes fluctuaciones poblacionales probablemente han influenciado los procesos que generan y mantienen la variabilidad genética de la especie y la estructura poblacional. Estudios previos de polimorfismo genético han reportado la ausencia de estructura poblacional a través de la amplia distribución geográfica de la especie. Sin embargo, para comprender mejor la historia evolutiva y el arreglo poblacional de la sardina monterrey, es necesario incrementar el número de loci altamente polimórficos para mejorar el poder de resolución de las estimaciones de diferenciación poblacional. Por lo tanto, en este estudio se identificaron nuevos loci microsateles para ser utilizados principalmente en la investigación de estructura poblacional de la sardina monterrey. Para ello, se diseñaron cebadores para 48 loci microsateles a partir de loci similares descritos para otras especies de la familia Clupeidae. Con el fin de evaluar su polimorfismo y su utilidad como marcadores moleculares para genética de poblaciones, se optimizaron estos loci y se genotipificaron en individuos de Oregon y California en los EE.UU.AA. y Bahía Magdalena y el Golfo de California en México. Se encontró que siete de los 48 loci iniciales representaron loci microsateles polimórficos que pueden ser fácilmente cuantificados en la sardina monterrey. El número de alelos por locus se encontró entre tres y 30, mientras que la heterocigosidad esperada se encontró entre 0.04 y 0.96. Los loci identificados en este trabajo serán útiles para análisis futuros de estructura genética poblacional. Además, se muestra que los experimentos de amplificación cruzada de loci homólogos de otras especies pueden reducir significativamente el esfuerzo y requerimientos para el desarrollo de nuevos marcadores microsateles en clupeidos, un taxón para el cual existe poca información genómica.

Palabras clave: Marcadores moleculares, Sardina monterrey, Amplificación cruzada, Microsatélites.

ABSTRACT of the thesis presented by **Ismael Guzmán Valdivieso** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree with orientation in MARINE ECOLOGY. Ensenada, Baja California.

**MICROSATELLITE MOLECULAR MARKERS IDENTIFICATION FOR THE
NORTHEAST PACIFIC SARDINE *Sardinops sagax caeruleus***

Abstract approved by:

Dr. Axayácatl Rocha Olivares

The northeast Pacific sardine (*Sardinops sagax caeruleus*) is an important economic resource whose abundance has fluctuated significantly in the past. These large population fluctuations have probably influenced the processes generating and maintaining genetic variability and population structure. Preliminary genetic studies have reported the absence of population differentiation across a wide geographic range. However, to better understand the evolutionary history of Pacific sardines it is necessary to increase the number of polymorphic loci to improve the resolution and power of population structure assessment. Therefore, this study aims to identify new microsatellite loci to be used in the study of Pacific sardine population structure. We selected PCR primers from the literature for 48 potential microsatellite loci developed in other clupeid species and tested all primer sets in Pacific sardines. In order to assess polymorphisms and their utility as markers for population genetic analysis, loci were optimized and genotyped in individuals from Oregon and California, in the United States, and Magdalena Bay and the Gulf of California, in México. Seven of the 48 potential loci were found to represent polymorphic microsatellite loci that could easily be scored in Pacific sardines. The number of alleles per locus ranged from three to 30 and expected heterozygosities ranged from 0.04 to 0.96. The microsatellite loci presented here should prove useful for future fine-scale population genetic analyses. In addition, we have shown that cross-amplification experiments and optimization of homologous loci from other species can significantly reduce the effort and resources needed for the development of new microsatellite markers in Clupeids, a taxon for which there is little genomic information.

Key words: Molecular markers, Pacific sardine, Cross-amplification, Microsatellite DNA.



“Ves cosas y te preguntas ¿por qué? Pero yo sueño cosas que nunca existieron y me pregunto ¿por qué no?”

George Bernard Shaw

DEDICATORIA

Con todo el amor de mi vida,
porque sin ustedes soy casi nada

A mis papás
Leticia e Ismael

A mis hermanos
Juan salvador, Ulises y Eréndira

A mis abuelos†
Venancia y Nazáreo

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Axayácatl Rocha Olivares por regalarme el lujo de trabajar bajo su dirección, por confiar en mí, por instruirme, por su aguerrida y perseverante dedicación en mi formación y ser excelente ejemplo. Aunque saquemos a bailar a la más fea, desgarramos los huaraches. Muchas GRACIAS Axa

Al Dr. John Carlos Garza, que me cobijó como uno más en su equipo de trabajo y me permitió en gran parte desarrollar y mejorar esta investigación.

Al CONACyT por su soporte al otorgarme una beca de posgrado
Al CICESE, su personal e infraestructura que contribuyeron en la realización de este trabajo.
Al Southwest Fisheries Science Center- NOAA en UC Santa Cruz, por permitirme realizar gran parte del trabajo de laboratorio en sus instalaciones.

A los miembros de mi comité
Dra. Sharon Znah Herzka Llona, quien aceptó sin reparo ser parte de esta obra digna de bestiario, aunque estas *vainas* genéticas no sean santo de su devoción. ¡Mil GRACIAS!!

Dr. Miguel Angel del Río Portilla, quien con tesón procuró siempre alentarme a mejorar detalle a detalle este trabajo. Gracias por sus atenciones doc

Infinitamente agradezco a un puñado de gente en Santa Cruz California, quienes me apoyaron desmedida y excepcionalmente. Loise Pearse, Alicia Abadía, Rodrigo Beas, Edith Martínez, David Faulkner, Libby Gilbert-Horvath y especialmente a Devon Pearse por su hospitalidad y las interminables charlas de orientación y enseñanza.

A los personajes frente al pizarrón, que clase a clase ayudan al parto sin cesárea de la enseñanza, habiendo así inúmeros alumbramientos en cada aula. Vicente, Saúl, Axa, Sharon, Horacio, Elena, Oscar, Luis, Gilo, Lydhia y Raquel. Gracias por su legado

A mis compañeros de posgrado, que sin particularizar, de todos aprendí un chirrín, como los sabores que no reconocemos en un platillo pero que ahí están, y sobre todo por la amistad que me brindan. ¡GRACIAS! equipo decibeles: Lucero, Julio, Gemma, Erick, Nancy, Mariana, Melba, Gaby, Yuriko, Juan Pablo, Sandra, Claudia. También los que adoptamos después: Ruth, Tiago, Jimena, Omar y Renato.

Al grupo de trabajo del Laboratorio de Ecología Molecular del CICESE, que siempre tuvieron la atención de auxiliarme cuando las cosas no parecían alentadoras. Yuma, Nancy, Marianita, Yuriko, Jimena y especialmente a Carina Guitierrez, muchas GRACIAS.

A quienes me inculcaron el trabajo como regla y la sapiencia como norma: Gracias mamá, gracias papá, su apoyo ha sido medular para que su cachorro logre sumar una meta más. No pueden faltar mis carnales Juan Salvador, Ulises y Eréndira quienes con sus ánimos y respaldo me han permitido

andar a plenitud construyendo sueños entre arrebatos de sensatez que parecen insanos y flujos de demencia que parecen corduras. Los amo a todos con todo mi corazón.

A mis compas de toda la vida y a los de reciente adquisición, que no dejan de dar lata e insisten mantenerme en pie con sus ánimos. Agradecerles es casi injusto por el montón que son, con todo, los menciono aunque espero sepan disculpar los errores neuronales de este individuo. Román, Saúl, Nadiezhda, Fabiola, Shivani, Sheila, Oscar parásito, Emanuel Ruíz, los Troyo, los Medrano, Alfredo, Karina, Sildia, José Luis, José Vicente, Reynel, Gisel... empiezan los errores neuronales.

A mi Lucero corazón de melón, tu asalto al nido fue de lo mejor que me pudo suceder en Ensenada, enteramente agradecido por compartir y estar a mi lado en esta etapa de mi vida, tu apoyo y fortaleza fueron siempre motor para aprender y crecer. Te adoro con el alma. Finalmente incluir a Camila que me acompañó en los desvelos y vino a ponerle mayor alegría a esas noches de remendar este manuscrito.

CONTENIDO

		Página
1	INTRODUCCIÓN.	1
	1.1 ANTECEDENTES.	5
	1.1.1 Evolución y filogenia de clupeidos.	5
	1.1.2 Marcadores moleculares y su utilidad en clupeidos.	7
	1.1.2.1 Aloenzimas.	7
	1.1.2.2 ADN mitocondrial.	9
	1.1.2.3 Microsatélites.	12
	1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	16
	1.3 HIPÓTESIS.	17
	1.4 OBJETIVO.	17
	1.4.1 Objetivo general	17
	1.4.2 Objetivos particulares.	18
2	METODOLOGÍA.	18
	2.1 Objetivo específico 1: Diseño de cebadores.	18
	2.2 Objetivo específico 2: Optimización de amplificación vía PCR.	23
	2.3 Objetivo específico 3: Selección de loci con amplificaciones consistentes y reproducibles.	25
	2.4 Objetivo específico 4: Selección de loci en función de su secuencia nucleotídica y variabilidad alélica.	26
	2.5 Caracterización de los loci microsatelitales.	28
3	RESULTADOS.	30
	3.1 Diseño de cebadores.	30
	3.2 Optimización de la reacción de amplificación.	34
	3.3 Selección de loci con amplificación consistente y reproducible.	34
	3.4 Selección de loci en función de secuencia nucleotídica y variabilidad alélica.	35
	3.5 Evaluación del polimorfismo de los loci positivos.	37
4	DISCUSIÓN.	45
5	CONCLUSIONES.	50
6	LITERATURA CITADA.	51

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Distribución geográfica y modelo de estructura poblacional basado en afinidades térmicas de la sardina monterrey. Los intervalos indicados por las flechas representan diferentes grupos: frío (de la Columbia Británica en Canadá hasta sur de EE.UU.), templado (frente a la península de Baja California) y cálido (dentro del Golfo de California).	4
2A	Relación filética de peces Actynopterigios con base a características sinapomórficas (números en las ramas), resalta el linaje Clupeomorfa como uno de los basales dentro de los peces teleosteos. Tomado de Nelson (1994)	7
2B	Clasificación actual de Clupeiformes, <i>Sardinops</i> se encuentra dentro de la subfamilia Clupeinae. Modificado de Li y Ortí (2007)	7
3	Esquema de la estructura física y componentes de un locus microstelital	12
4	Esquema que representa la reducción y sus causas en el éxito de obtención de loci microsatelitales funcionales siguiendo el método tradicional. La amplificación cruzada comienza en la tercera etapa, representando un ahorro de costo y tiempo con respecto a la construcción de bibliotecas genómicas. Modificado de Squerrell <i>et al.</i> (2003)	15
5A	Sitio web del NCBI que muestra un comando ejemplificando la forma en que se realizó la búsqueda	20
5B	Ejemplo de secuencia obtenida para un locus microsatelital de <i>Clupea pallasii</i> . La referencia brinda información del polimorfismo del locus, mientras que en la secuencia se puede identificar la región de repetición del motivo y la región del cebador	20
6	Ejemplo de diseño de un cebador. Los rectángulos verdes señalan la región de repetición del microsatélite, los rectángulos azules los sitios de empalme de los cebadores diseñados por el autor, y los rectángulos rojos los sitios de empalme de los cebadores diseñados para este trabajo	21
7A	Sitio web de <i>Integrated DNA Technologies</i> que muestra el vínculo a la rutina <i>OligoAnalyzer 3.0</i>	22

LISTA DE FIGURAS. Continuación

Figura		Página
7B	Se muestra una secuencia de cebador que es probada para calcular su Tm (Analyze), posible formación de horquillas (Hairpin) y dímeros (Self-dimer), posible complementariedad (Hetero-dimer) entre cebadores para un locus, y porcentaje de homología en un banco de genes (NCBI Blast)	22
8A	Distribución de frecuencias de los tamaños alélicos en los siete loci positivos. Alsabr01(n=88), alsabr03 (n=91), alsabr05 (n=91), alfafa01 (n=71), sapi10 (n=77), cupaol05 (n=88), cupami08 (n=66). Loci con bajo número de alelos, la mayoría de ellos raros y pobremente representados excepto por un alelo dominante	39
8B	Loci con alto número de alelos, la mayoría se encuentran bien representados, pocos de ellos son raros.	40
9	Heterocigocidad promedio observada por localidad. En cada una de ellas se consideraron todos los loci. No se observó ningún gradiente latitudinal en la heterocigocidad.	42
10	Relaciones filogenéticas dentro del suborden Clupeoidei con base en el ADNmit. Modificado de Lavoué <i>et al.</i> (2007)	47

LISTA DE TABLAS

TABLA		Página
I	Combinaciones de las condiciones químicas evaluadas para optimizar las reacciones de PCR. Las concentraciones representan concentraciones finales. (*) indica la combinación con mejor funcionalidad para la amplificación. Los cuadros sombreados representan las condiciones de PCR probadas.	24
II	Condiciones de tiempo y temperatura de anillamiento evaluadas para optimizar la reacción de PCR. (*) marca el tiempo y las temperaturas con mejor funcionalidad para la amplificación; las otras combinaciones de temperatura y tiempo no formaron productos de PCR o estos no fueron del tamaño esperado, lo que significa que los cebadores amplificaron otras regiones del genoma.	25
III	Nombre del fluoróforo utilizado para marcar el cebador F en cada uno de los loci candidatos. El color del fluoróforo fue seleccionado en función del tamaño del fragmento en cada locus; de manera que el mismo tipo de fluoróforo no se usara en loci con fragmentos de tamaño similares.	27
IV	Especie de origen, cantidad y tipo de microsatélites cuyas secuencias fueron utilizadas para el diseño de cebadores en este trabajo.	30
V	Cebadores diseñados para este trabajo y su Temperatura de anillamiento teórica (T _m). El motivo esperado es el motivo que se observó en la secuencia a partir de la cual se diseñó el cebador.	31
VI	Evolución en la designación por categorías de los loci durante el desarrollo de las pruebas; desde los primeros en los que se obtuvieron productos de amplificación (loci potenciales) hasta aquellos que se confirmaron como loci microsatelitales (loci positivos).	33
VII	Secuencias de cinco loci positivos identificados en este trabajo. Sólo se muestra la secuencia correspondiente a un individuo de los ocho secuenciados por locus. La región de repetición está subrayada.	36
VIII	Loci candidatos y positivos, motivo obtenido a partir de secuenciación y rango de tamaños alélicos. (ND) no determinado.	37

LISTA DE TABLAS. Continuación

Tabla		Página
IX	Número de alelos (<i>A</i>) y de organismos genotipificados (<i>n</i>) para cada locus positivo entre 96 sardinas monterrey provenientes de cuatro localidades.	37
X	Heterocigosidades esperadas (<i>H_e</i>) y observadas (<i>H_o</i>) y significancia de la prueba de desequilibrio de Hardy-Weinberg por locus considerando a todas las localidades juntas.	41
XI	Variabilidad de siete loci microsatelitales en <i>Sardinops sagax caeruleus</i> capturadas en cuatro localidades. (<i>A</i>) número de alelos por localidad, (<i>n</i>) número de individuos genotipificados por muestra y locus, (<i>H</i> obs) heterocigosidad observada y (<i>H</i> esp) esperada por locus en cada localidad. Las negritas indican valores significativos de heterocigosidad después de la corrección de Bonferroni.	43
XII	Porcentaje de similitud de los loci positivos. Se calculó para la región Forward (Fwd) y Reverse (Rev). *La porción Fw de este locus corresponde solamente a la secuencia del cebador, ya que es el mismo que el descrito originalmente. <i>n</i> indica el número de secuencias de sardina monterrey empleadas en el alineamiento.	44

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas dos décadas se han desarrollado diversas herramientas moleculares que han cambiado completamente nuestra visión de la naturaleza (Schlötterer, 2004). Estas herramientas o marcadores moleculares han sido aplicados a una gran variedad de interrogantes biológicas. Por ejemplo, en biología de poblaciones, han permitido cuantificar la variación dentro y entre poblaciones de organismos silvestres para entender los procesos biológicos de adaptación a circunstancias ecológicas particulares (Parker *et al.*, 1998). Un marcador molecular es una proteína, gen o fragmento de ADN que nos proporciona información acerca de la variabilidad alélica en un locus dado. Conceptualmente, la variabilidad genética detectada por los marcadores moleculares se puede clasificar en tres categorías: i) variabilidad proteica, ii) polimorfismo (directo e indirecto) como consecuencia de la sustitución de bases nucleotídicas en secuencias de ADN y iii) variación en el número de motivos de repetición del ADN (Schlötterer, 2004).

En la ciencia pesquera, los marcadores moleculares han sido usados ampliamente para evaluar aspectos como identificación de “stocks” (Shaklee y Bentzen, 1998), estimar el tamaño efectivo poblacional (Reilly *et al.*, 1999), caracterizar la estructura poblacional y cuantificar del flujo genético (De León *et al.*, 1997 y Arnegard *et al.*, 1999), y establecer niveles de endogamia (Tessier *et al.*, 1997) y parentesco (Knight *et al.*, 1998).

En las ciencias pesqueras, la unidad biológica sujeta al manejo se denomina “stock”, el cual es un grupo de individuos de la misma especie que ocupan un rango espacial bien definido, independiente de otros stocks, (en el que puede ocurrir dispersión y migración). En ciertos casos, todas las poblaciones de una especie pertenecen a un solo stock (aquellas altamente migratorias, por ejemplo) mientras que otras se componen de

varios, dependiendo del grado de aislamiento. La identificación de stocks se reconoce como un tema medular en las ciencias pesqueras y requiere de trabajo interdisciplinario (Waldman, 2005). Dado que la estructura de los stocks suele ser complicada, su delineamiento y la confiabilidad de sus evaluaciones siempre cuentan con un grado de incertidumbre, por lo que la eficiencia de las regulaciones de manejo están acotadas (Cadrin *et al.*, 2005). Esta incertidumbre exige el empleo de nuevos enfoques, técnicas y metodologías para realizar inferencias con mayor certidumbre sobre la estructura de stocks. Los estudios de genética molecular han contribuido sustancialmente a dicho propósito (Waples y Gaggiotti, 2006).

Los peces del orden Clupeiformes (anchovetas, arenques y sardinias) han sido un componente sustantivo de la pesquería en nivel mundial. En algunas regiones, la economía local depende fuertemente de las fluctuaciones poblacionales de una sola especie de clupeido (FAO, 2003). Esta importancia económica ha motivado una serie de estudios vinculados directamente a su biología pesquera. No obstante, son pocos los estudios que han empleado técnicas moleculares para elucidar aspectos relacionados con la dinámica y estructura poblacional. Este es el caso de la sardina del Pacífico Nororiental *Sardinops sagax caeruleus* (sardina monterrey en lo subsecuente), un recurso pesquero compartido por Canadá, Estados Unidos y México.

El modelo de estructura poblacional de la sardina monterrey que prevalece actualmente involucra la existencia de tres grupos (Figura 1). Esta propuesta está basada principalmente en análisis de secuencias de tallas (Clark, 1931), tasas de crecimiento (Felin, 1954), número de vértebras (Clark, 1947), grupos de desove (Marr, 1957), grupos sanguíneos (Vrooman, 1964), morfometría de otolitos (Félix-Uraga *et al.*, 2005) y capturas

pesqueras en relación a la temperatura superficial del mar (Félix-Uraga *et al.*, 2004). Los grupos identificados comprenden un stock frío (Alaska al norte de Baja California), un stock templado (costa pacífico de Baja California) y un stock cálido (dentro del Golfo de California) (Parrish *et al.*, 1989; Félix-Uraga *et al.*, 2004). Los estudios genéticos para evaluar el arreglo poblacional de la sardina monterrey han involucrado el empleo de marcadores moleculares aloenzimáticos (Hedgecock *et al.*, 1989), secuencias de ADN mitocondrial de los genes *citocromo b* (Lecomte *et al.*, 2004), *NAD5* y *NAD6* (Gutierrez-Flores, 2007) y loci microsatelitales (Gutierrez-Flores, 2007). Ninguno de los resultados obtenidos en estos estudios es consistente con la existencia de grupos de sardinas genéticamente diferenciados a lo largo de su rango de distribución, como lo sugieren los estudios no genéticos. Debido a la dificultad de interpretar patrones en la variabilidad genética obtenida en estos trabajos, se ha planteado incrementar el número y tipo de marcadores moleculares que en conjunto permitan comprender patrones de variabilidad y si estos son o no consistentes con el modelo de actual de estructura poblacional.

Los microsatélites son un tipo de marcador molecular cuyas características (p.ej. alta tasa mutacional y alto nivel de polimorfismo) los convierten en una herramienta con alta resolución a nivel poblacional, por lo que son altamente informativos de procesos genéticos en escalas de tiempo ecológico (Madsen *et al.*, 2000; Freeland, 2006).

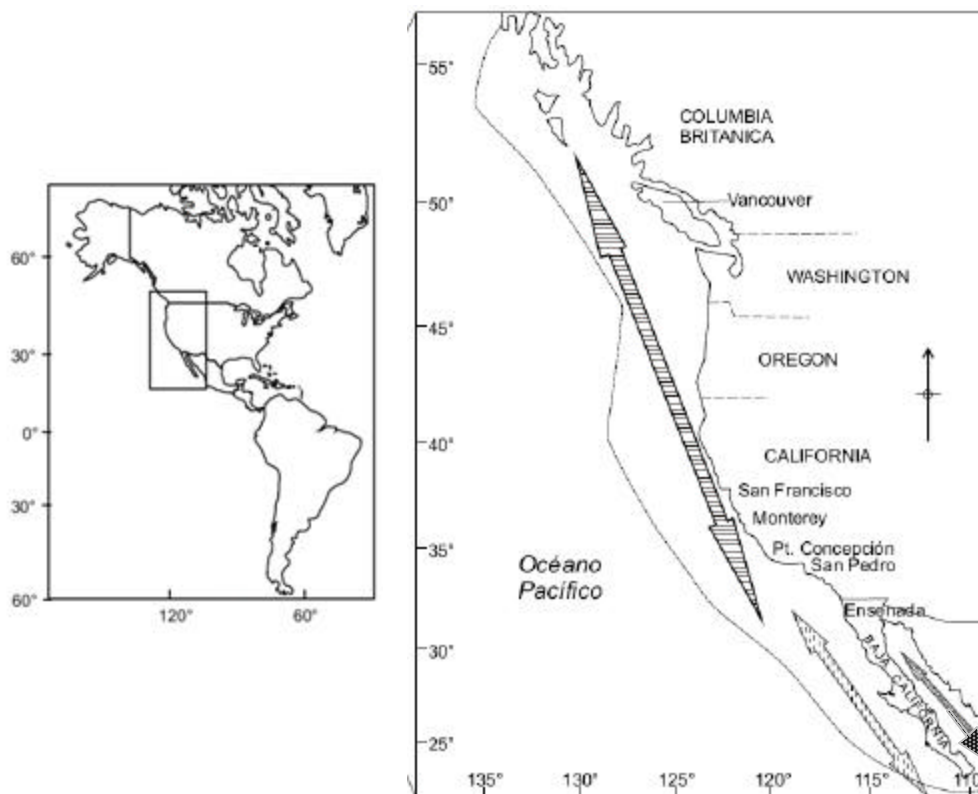


Figura 1.- Distribución geográfica y modelo de estructura poblacional basado en afinidades térmicas de la sardina monterrey. Los intervalos indicados por las flechas representan diferentes grupos: frío (de la Columbia Británica en Canadá hasta sur de EE.UU.), templado (frente a la península de Baja California) y cálido (dentro del Golfo de California).

Cualquier estudio de genética poblacional requiere de una representación genómica adecuada para maximizar el poder de inferencia. Esto es particularmente importante cuando la señal de diferenciación entre subpoblaciones potenciales es débil o pequeña debido a las características biológicas y genéticas de la especie, como ha resultado ser el caso de la sardina monterrey (Lecomte *et al.*, 2004; Gutierrez-Flores, 2007). Para investigaciones que buscan documentar diferencias genéticas entre subpoblaciones de la

sardina monterrey, se necesita aumentar el acervo de loci que permitan una mayor cobertura de la información genética. Aumentar el número de loci analizados ayudará a mejorar la resolución de los análisis de estructura y flujo genético, así como a incrementar el poder de detección de subpoblaciones. Por lo anterior, este trabajo propone identificar nuevos loci microsatelitales que sirvan de marcadores moleculares para la sardina monterrey, a partir de loci previamente identificados y descritos en otras especies de Clupeidos. Puesto que el éxito de esta estrategia depende en gran medida de la cercanía filogenética entre dichas especies y la sardina monterrey, es importante conocer la historia evolutiva de este grupo de teleósteos.

1.1. ANTECEDENTES

1.1.1. Evolución y filogenia de clupeidos

El grupo de los clupeomorfos representa un linaje basal en la filogenia de los peces óseos cuyo origen se remonta al período Triásico (340 millones de años atrás –Ma–), por lo que el orden Clupeiformes forma parte de un clado antiguo dentro de los teleósteos (Figura 2A). El orden comprende cinco familias que comparten caracteres morfológicos sinapomórficos: Denticipitidae, Engraulidae, Pristigasteridae, Chirocentridae y Clupeidae (Figura 2B). Se ha estimado con base en datos paleontológicos que los primeros miembros de la familia Clupeidae datan de hace 35-40Ma (Eoceno), de acuerdo a los primeros registros fósiles encontrados en la formación La Meseta en la Antártica (Jerzanska, 1991)

y en la formación Jebel Qatrani en Egipto (Murray *et al.*, 2005). Sin embargo, los miembros de la familia Clupeidae son más comunes en épocas como el Mioceno y Plioceno (20-6 Ma) (Miller, 1982). Dentro de la subfamilia Clupeinae, Grant y Leslie (1996) estimaron con base en análisis genéticos que la divergencia entre los géneros *Sardina* y *Sardinops* ocurrió durante el Mioceno aproximadamente 19 ± 4 -Ma-. Grant (1986) estimó que los arenques del Pacífico y Atlántico divergieron durante el Plioceno tardío.

Aunque se han realizado estudios para conocer los tiempos de divergencia entre especies congénicas de algunos clupeidos como sardinas (Grant y Leslie, 1996; Grant *et al.*, 1998), anchovetas (Magoulas *et al.*, 1996), arenques (Grant, 1986; Domanico *et al.*, 1996) y alosas (Faria *et al.*, 2006), hasta el momento no se han propuesto tiempos de divergencia entre los géneros de la familia.

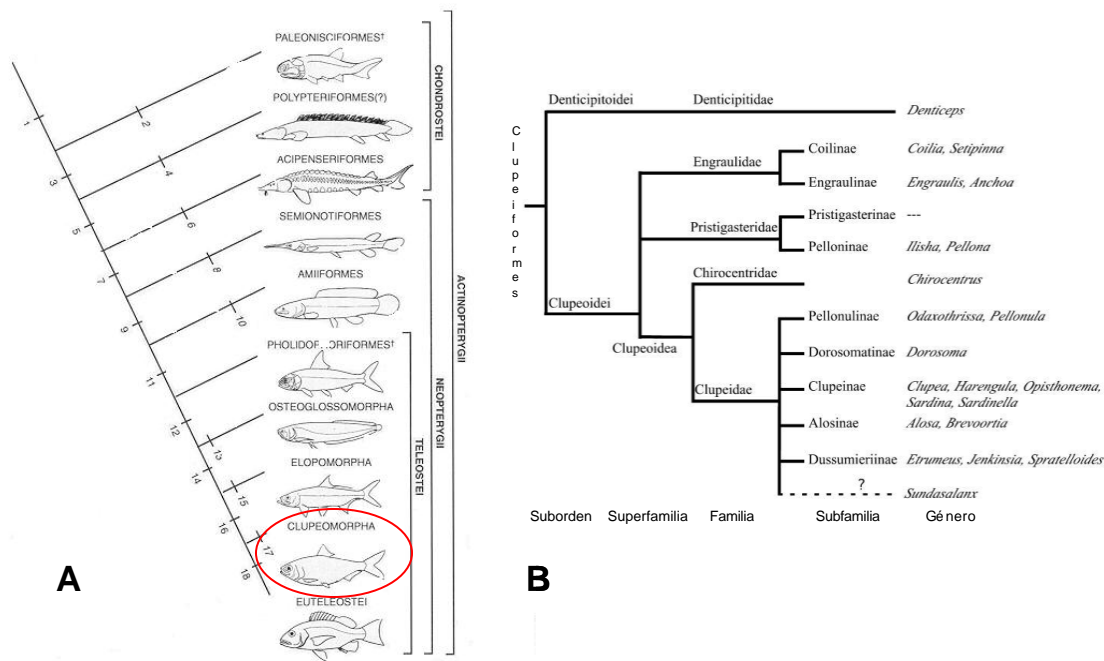


Figura 2.- A: relación filética de peces Actynopterygios con base a características sinapomórficas (números en las ramas), resalta el linaje Clupeomorfa como uno de los basales dentro de los peces teleósteos. Tomado de Nelson (1994); B: clasificación actual de Clupeiformes, *Sardinops* se encuentra dentro de la subfamilia Clupeinae. Modificado de Li y Ortí (2007).

1.1.2. Marcadores moleculares y su utilidad en clupeidos

1.1.2.1. Aloenzimas

Las aloenzimas son marcadores mendelianos codominantes y fueron el primer marcador genético molecular utilizado para cuantificar variabilidad genética de poblaciones silvestres (Lewontin y Hubby, 1966). El término se origina de la contracción de “allelic isozymes (allozymes)”, en inglés, y se refiere a las variantes alélicas de isoenzimas metabólicas codificadas por genes estructurales. Las enzimas son proteínas compuestas por aminoácidos eléctricamente cargados, por lo que tienen una carga eléctrica neta basada en el número y tipo de aminoácidos que la conforman. Cuando una mutación

ocurre, puede resultar en el reemplazo de un aminoácido y por lo tanto la carga neta de la proteína puede alterarse. Debido a estos cambios en su carga eléctrica, la movilidad de la proteína en un campo eléctrico se modifica. Por lo tanto, la variación alélica puede detectarse mediante electroforesis en gel acoplada a una tinción específica para cada enzima. Al determinar la composición genotípica de una población en varios loci aloenzimáticos, se cuenta con un marcador molecular multilocus que permite distinguir entre poblaciones (Koljonen y Wilmot, 2005).

Debido a su naturaleza codominante, una de las ventajas de las aloenzimas es que permite distinguir entre individuos homocigotos y heterocigotos, lo que facilita el cálculo de frecuencias alélicas en una población (Freeland, 2006). Obtener datos a partir de aloenzimas es más barato que algunas otras técnicas moleculares y, una vez que los procedimientos han sido perfeccionados y optimizados, la colección de datos es rápida y sencilla. Sin embargo, dado que la variabilidad aloenzimática depende completamente de sustituciones no-sinónimas (que ocasionan sustituciones de aminoácidos), los niveles de polimorfismo tienden a ser limitados. Otra característica a considerar es que al ser proteínas funcionales, pueden estar sujetas a presiones selectivas. La ausencia de neutralidad es una desventaja cuando el marcador está siendo empleado para hacer inferencias sobre el flujo genético o sobre la demografía histórica a partir de diferencias genéticas entre poblaciones (Hedrick, 2000; Avise, 2004; Freeland, 2006).

El uso de este marcador en estudios de diferenciación poblacional ha sido amplio en clupeidos. Le Corre *et al.* (2005) analizaron siete enzimas en alosas del mar Mediterráneo encontrando homogeneidad al comparar entre poblaciones. En la sardina española (*Sardinella aurita*) se encontraron bajos niveles de diversidad genética y homogeneidad

entre poblaciones de las costas de Florida y Carolina del sur al analizar 37 loci aloenzimáticos (Kinsey *et al.*, 1994). Para la anchoveta europea (*Engraulis encrasicolus*), fue posible detectar dos stocks diferenciados genéticamente al analizar 24 loci aloenzimáticos (Bembo *et al.*, 1996), mientras que un locus fue suficiente para diferenciar grupos en la parrocha del Atlántico *Sardina pilchardus* (Chlaida *et al.*, 2006).

En el género *Sardinops* (Clupeinae), las aloenzimas han sido utilizadas para inferir el grado de divergencia entre las formas regionales Indo-Pacífico del género *Sardinops* (Sudáfrica, Australia, Perú y California), aunque *Sardinops* ha persistido desde hace 19Ma, las formas regionales parecen haber divergido unas de otras hace no más de 200,000 años (Grant y Leslie, 1996). También se utilizaron para argumentar que el género *Sardinops* consiste de una sola especie ampliamente distribuida (Grant y Leslie, 1996). Para la sardina monterrey, Hedgecock *et al.* (1989) evaluaron 32 loci aloenzimáticos encontrando muy bajos niveles de polimorfismo y heterocigosis, concluyendo que las poblaciones analizadas (Guaymas, Bahía Magdalena, sur de California, Bahía Monterey y Bahía Tomales) eran genéticamente homogéneas.

1.1.2.2. ADN mitocondrial

Existen varias razones por las que el ADN mitocondrial (ADNmit) ha sido usado extensivamente en estudios de genética de poblaciones. Primero, el ADNmit es relativamente fácil de aislar ya que el arreglo de sus genes es conservado y permite el diseño de primers (cebadores en lo subsiguiente) universales que amplifican el ADNmit en una amplia variedad de taxa. Por lo tanto, con el ADNmit es más fácil obtener datos sin

necesidad de tener conocimiento *a priori* de la secuencia del ADN de la(s) especie(s) en cuestión. Segundo, a pesar de la conservación de los genes mitocondriales en tiempo evolutivo, la secuencia nucleotídica del ADNmit evoluciona rápidamente (Moritz *et al.*, 1987). Algunas porciones evolucionan particularmente rápido y son muy útiles para análisis de estructura de poblaciones, ya que brindan alto poder de resolución. La región no-codificante, que incluye la *Región de Control* (D-loop), evoluciona rápidamente en muchos taxa. Esta alta tasa mutacional genera altos niveles de polimorfismo y por lo tanto revela múltiples linajes genéticos tanto dentro como entre poblaciones. Las regiones de tasa evolutiva lenta, como las que codifican las subunidades de la citocromo oxidasa y el citocromo b, son más apropiadas para comparaciones a nivel interespecífico o mayores. Una tercera propiedad es que en general carece de recombinación, lo que significa que las crías heredan el mismo genoma mitocondrial de sus madres, incluyendo las mutaciones que ésta haya sufrido. Esta herencia clonal permite que linajes individuales puedan ser trazados en tiempo y espacio en forma de árboles bifurcantes con relativa sencillez, por lo cual el ADNmit es ampliamente utilizado en estudios de filogeografía (Avice, 2004).

Si muestras de individuos tomadas de diferentes áreas o de la misma área en diferentes tiempos pertenecen al mismo stock, entonces deben conservar la misma secuencia en su molécula de ADNmit en frecuencias similares. Por el contrario, si existen diferencias substanciales en la distribución de secuencias de ADNmit entre muestras, habrá evidencia de que pertenecen a diferentes stocks con cierto grado de aislamiento genético. El método más usado para análisis de estructura poblacional empleando ADNmit es el de *Fragmentos de Restricción*, el cual consiste en digerir ADN purificado con una o más enzimas de restricción que cortan el ADN en sitios específicos generando múltiples

fragmentos (polimorfismo) a partir de un segmento de ADN. El poder de este tipo de análisis depende del número de enzimas usadas, ya que un número mayor de enzimas confieren mayor poder de resolución. Sin embargo, la invención de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (“PCR” por sus siglas en inglés -en lo subsiguiente-) y el desarrollo de los métodos de secuenciación de ADN, han permitido la amplificación *in vitro* de porciones de la molécula de ADNmit y su secuenciación, abriendo acceso al mayor nivel de resolución genética posible, el codificado en los nucleótidos del ADN.

En clupeidos, el análisis del ADNmit ha sido usado principalmente para la determinación de relaciones filogenéticas y biogeográficas (Bowen y Grant, 1997; Grant *et al.*, 1998; Faria *et al.*, 2006; Lavoué *et al.*, 2007; Li y Ortí, 2007), así como la estimación del tiempo de divergencia entre grupos o especies (Grant *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006). Tringali y Wilson (1993) detectaron ausencia de grupos diferenciados de *Sardinella aurita* en el Golfo de México y Florida analizando el ADNmit con enzimas de restricción. Este resultado fue similar al que se encontró con loci aloenzimáticos (Bembo *et al.*, 1996). Para la sardina monterrey, Lecomte *et al.* (2004) utilizaron secuencias del gen citocromo b para elucidar el arreglo poblacional de la especie, sin encontrar evidencia suficiente para rechazar la hipótesis de homogeneidad poblacional propuesta por Hedgecock *et al.* (1989). Posteriormente Gutierrez-Flores (2007) analizó los genes de las subunidades cinco y seis de la nicotinamida dinucleótido deshidrogenasa (NAD), y reportó altos valores de diversidad haplotípica en ambos genes y la ausencia de algún patrón geográfico de diversidad o estructura genética.

1.1.2.3. Microsatélites

Los microsatélites son secuencias de ADN caracterizadas por motivos de repetición en tándem de 1 a 6 nucleótidos de longitud (Figura 3). Se encuentran con mucha frecuencia en el genoma nuclear de la mayoría de los taxa, tanto en regiones codificantes como en las no-codificantes, y se caracterizan por un alto polimorfismo en la longitud de repeticiones del “motivo”. Un locus microsatelital normalmente exhibe entre 5 y 40 repeticiones (Selkoe y Toonen, 2006).

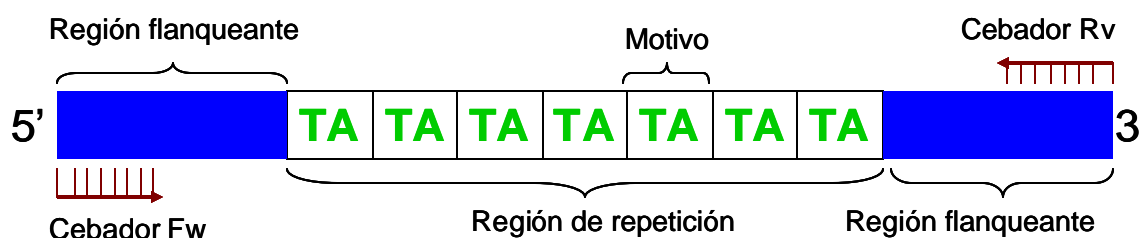


Figura 3.- Esquema de la estructura física y componentes de un locus microsatelital.

El interpretar la variación genética en el número de repeticiones de un locus microsatelital requiere el comprender los procesos que causan esa variación. La variación genética puede ser resultado de fuerzas a nivel molecular (mecanismo de mutación de los microsatélites o tasa de mutación) o a nivel poblacional (selección natural y deriva génica) (Nauta y Weissing, 1996). Se ha demostrado que el uso correcto de microsatélites en los análisis de estructura poblacional depende de la correcta evaluación de la tasa mutacional y

del modelo mutacional de este marcador en la especie de interés (Rubinsztein *et al.*, 1995; Zhivotovski y Feldman, 1995; Balloux y Lugon-Moulin, 2002).

El modelo mutacional que subyace la evolución del microsatélite es de gran importancia para asegurar la aplicación de estadística apropiada que refleje fielmente la estructura genética. Se han propuesto dos modelos mutacionales: Modelos de Alelos Infinitos (MAI) (Kimura y Crow, 1964) y el Modelo Mutacional por Pasos (MMP) (Kimura y Ohta, 1978). En el modelo MAI, cada evento de mutación crea un alelo nuevo a una tasa de mutación dada u , por lo que alelos idénticos comparten el mismo ancestro y por tanto son idénticos por descendencia y no existe homoplasia. Mientras que MMP, cada mutación crea un alelo nuevo por adición o deleción de un motivo de repetición con igual probabilidad, por lo que se puede tener alelos idénticos por estado, pero no por descendencia (homoplasia); consecuentemente, alelos de tamaños muy diferentes estarán menos relacionados que alelos de tamaño similar (Balloux y Lugon-Moulin, 2002; Ellegren, 2004).

Los microsatélites se han convertido en la herramienta molecular por excelencia en estudios de identificación de stocks y estructura de poblaciones. Esto se debe principalmente a: i) los altos niveles de variabilidad genética que se detectan en estos loci, ii) el gran número de loci que pueden ser evaluados dada su ubicuidad genómica y iii) la relativa facilidad de los ensayos en el laboratorio una vez automatizados los protocolos. Uno de los principales problemas al trabajar con microsatélites es que se deben aislar *de novo* para la mayoría de las especies. Esto se debe a que la mayoría de los microsatélites se encuentran en regiones no-codificantes donde la tasa de sustitución nucleotídica es mayor que en regiones codificantes, por lo cual el diseñar cebadores universales es altamente

problemático (Zane *et al.*, 2002). Sin embargo, la presencia de regiones flanqueantes (Figura 3) a la región de repetición altamente conservadas ha sido reportada en varios taxa (FitzSimmons *et al.*, 1995) incluyendo peces (Rico *et al.*, 1996; Neff y Gross, 2001), lo cual ha permitido la amplificación cruzada entre especies que han divergido hasta hace 470 millones de años.

De manera tradicional los loci microsatelitales son caracterizados *de novo* mediante la elaboración de bibliotecas genómicas. El costo para elaborar una biblioteca genómica y obtener clonas positivas (excluyendo la secuenciación) es del orden de \$4,400 USD además de la necesidad de contar con el equipo de laboratorio para elaborar la biblioteca (Zane *et al.*, 2002). Además de ser un método laborioso y costoso, hay varios factores que disminuyen el éxito de aislamiento de loci microsatelitales (Figura 4). Existen compañías que brindan el servicio de aislar loci microsatelitales en un período de 2-6 meses y con un costo de \$1,500USD por locus, lo que representa un gasto de \$15,000 USD para aislar 10 loci (Selkoe y Toonen, 2006). En contraste, la amplificación cruzada consiste en la optimización de las condiciones de amplificación, por lo que requiere únicamente de la compra de oligonucleótidos y reactivos para reacciones de PCR. El tiempo y costo monetario de la optimización dependerá del número de loci que se busquen identificar.

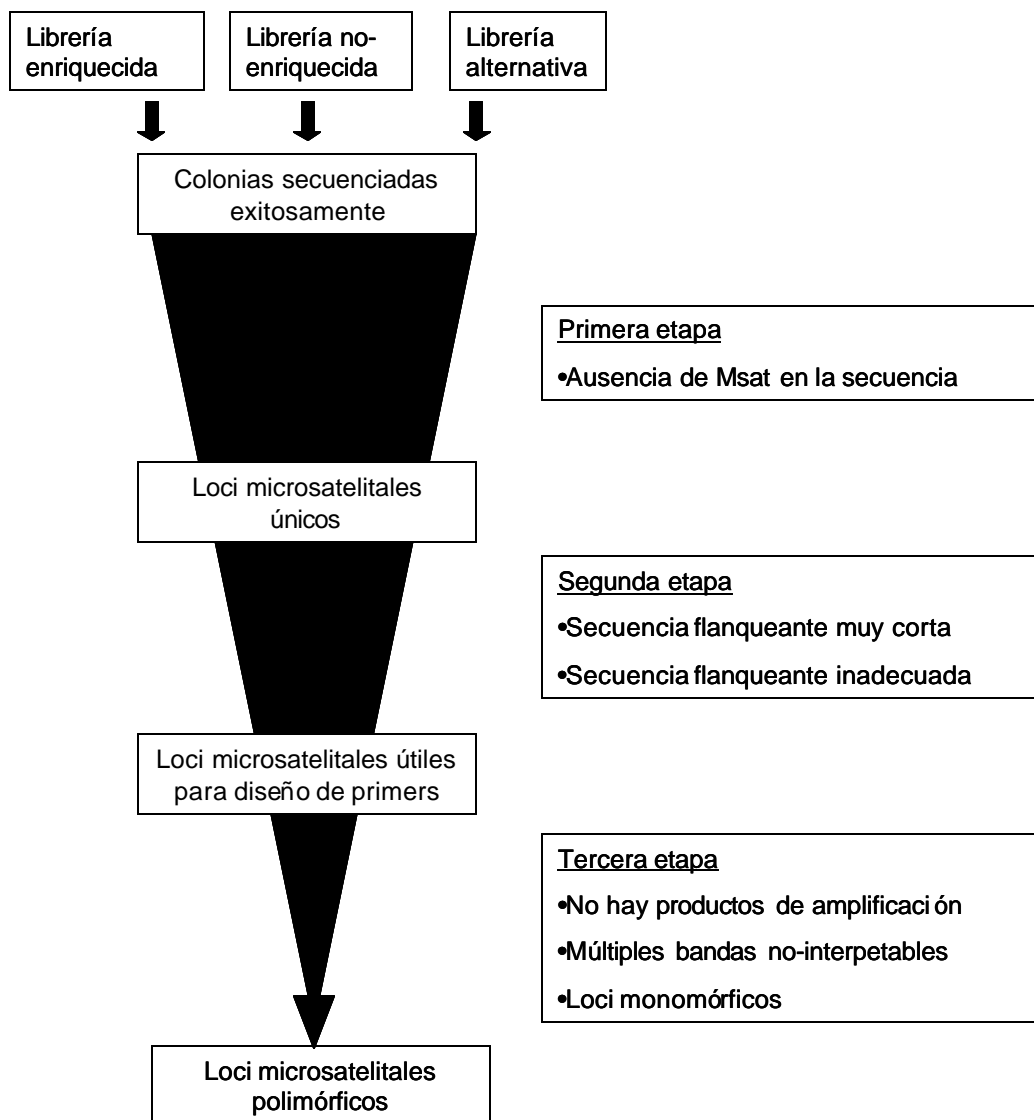


Figura 4.- Esquema que representa la reducción y sus causas en el éxito de obtención de loci microsatelitales funcionales siguiendo el método tradicional. La amplificación cruzada comienza en la tercera etapa, representando un ahorro de costo y tiempo con respecto a la construcción de bibliotecas genómicas. Modificado de Squerrell *et al.* (2003).

O'Connell *et al.* (1998b) reportaron estructura poblacional en el arenque del Pacífico norte (*Clupea pallasii*) analizando cinco loci microsatelitales altamente variables

(heterocigidad media de 89%). McPherson *et al.* (2001b) analizaron nueve loci microsatelitales del arenque *Clupea harengus* y reportaron estructura poblacional significativa entre cinco poblaciones del Atlántico Norte, sin embargo otros estudios han reportado una débil diferenciación empleando nueve loci en la misma especie (Mariani *et al.*, 2005; Larsson *et al.*, 2007). Para la sardina monterrey, Gutierrez-Fores (2007) analizó ocho loci microsatelitales en sardinas colectadas a lo largo de su distribución actual, y encontró que todos tenían altos niveles de polimorfismo. Sus resultados de estructura poblacional, no obstante, indican homogeneidad genética entre muestras de diferentes localidades (Canadá al Golfo de California).

1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existe la necesidad de contar con un mayor número de marcadores moleculares para elucidar la estructura genética potencialmente compleja y sutil de la sardina monterrey. En general, el diseño específico de cebadores para cada especie ha sido la estrategia adoptada en investigaciones de genética poblacional en clupeidos (O'Connell *et al.*, 1998a; McPherson *et al.*, 2001a; Faria *et al.*, 2004; Pereyra *et al.*, 2004) y otros grupos de peces (McConnell *et al.*, 1995; Moran *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 2000; Gold *et al.*, 2002). Sin embargo, en otras especies de peces se ha reportado la existencia de regiones genómicas conservadas que permiten el uso exitoso de cebadores diseñados para especies filéticamente relacionadas (Rico *et al.*, 1996). Por lo tanto, en este trabajo se aplica la

estrategia de identificar marcadores moleculares aloespecíficos para la sardina monterrey, con base en cebadores diseñados a partir de las secuencias flanqueantes de loci microsatelitales originalmente descritos para otras especies de clupeiformes. Esto se basa en la premisa de que ya que ha sido posible encontrar regiones conservadas que permitan la amplificación de microsatélites en especies de peces que han divergido por más de 400 – Ma- (Rico *et al.*, 1996), debe ser posible entonces hacerlo en especies de clupeidos, un grupo que posiblemente divergió tan sólo durante el Eoceno (30-40Ma).

1.3. HIPÓTESIS

Es posible obtener marcadores moleculares microsatelitales aloespecíficos para la sardina monterrey a partir de secuencias de ADN de otros géneros de clupeidos, a pesar de su divergencia genética.

1.4. OBJETIVO

1.4.1. Objetivo general

Identificar nuevos loci microsatelitales que sirvan de marcadores moleculares para estudios de genética poblacional de la sardina del Pacífico Nororiental, *Sardinops sagax caeruleus*.

1.4.2. Objetivos particulares

1. Diseñar cebadores a partir de secuencias de loci microsatelitales descritos para otras especies de Clupeidos (loci aloespecíficos potenciales).
2. Optimizar las condiciones de amplificación del PCR de los cebadores potenciales.
3. Seleccionar, entre los cebadores potenciales optimizados, aquellos que produzcan amplificaciones consistentes y reproducibles (loci candidatos).
4. Seleccionar entre los loci candidatos aquellos que realmente representen un microsatélite en función de su secuencia nucleotídica y variabilidad alélica (loci positivos).
5. Evaluar el nivel de polimorfismo de los loci positivos.

2. METODOLOGÍA

2.1. Objetivo específico 1: Diseño de cebadores

Se realizó una búsqueda de secuencias de loci microsatelitales reportados para la familia Clupeidae en el banco de datos genéticos GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI) (Figura 5A), dando prioridad a aquellos loci que fueran altamente polimórficos y con motivos de repetición sencillos o dinucleótidos, ya que se ha reportado que estos son altamente polimórficos (Jarne y Lagoda, 1996). En cada secuencia, se identificaron tanto la región de repetición del motivo como la región de los cebadores originalmente descritos (Figura 5B). El diseño de nuevos cebadores consistió en la

identificación de dos secuencias de oligonucleótidos cercanos a los extremos 5' y 3' de las regiones flanqueantes del microsatélite con temperaturas de anillamiento (T_m) compatibles. Esto resultó en la amplificación de un fragmento genómico mayor al obtenido con los cebadores originales (Figura 6). Esta estrategia se implementó para maximizar el tamaño de la secuencia de dichas regiones laterales a la secuencia repetitiva con la finalidad de utilizarlas posteriormente para buscar Polimorfismos de Nucleótido Sencillo (SNP's por sus siglas en inglés), aunque el análisis de SNPs no forma parte de esta tesis.

El nombre de cada cebador se asignó en función de la especie y autores originales. Las dos primeras letras corresponden al género, las siguientes dos corresponden a la especie y las dos últimas al nombre del autor.

A

NCBI HomoPage - Mozilla Firefox

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

Google - ncbi

National Center for Biotechnology Information
National Library of Medicine National Institutes of Health

PubMed All Databases BLAST OMM Books TaxBrowser Structure

Search Nucleotida for clupeidae and microsatellite Go

SITE MAP
Alphabetical List

What does NCBI do? Hot Spots

B

NCBI Sequence Viewer v2.0 - Mozilla Firefox

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=77543283

Google - ncbi

SOURCE Clupea pallasii (Pacific herring)

ORGANISM [Clupea pallasii](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Clupeomorpha; Clupeiformes;
Clupeidae; Clupea.

REFERENCE 1 (bases 1 to 531)

AUTHORS Olsen, J.S., Lewis, C.J., Kretschmer, E.J., Wilson, S.L. and Seeb, J.E.

TITLE Characterization of 14 tetranucleotide microsatellite loci derived from Pacific herring

JOURNAL Mol. Ecol. Notes 2 (2), 101-103 (2002) ← Referencia

REFERENCE 2 (bases 1 to 531)

AUTHORS Olsen, J.S., Lewis, C.J., Kretschmer, E.J., Wilson, S.L. and Seeb, J.E.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (06-AUG-2001) Fish and Game, State of Alaska, 333 Raspberry Road, Anchorage, AK 99507, USA

COMMENT On Oct 12, 2005 this sequence version replaced gi:15420971.

FEATURES
Location/Qualifiers

source 1..531
/organism="Clupea pallasii"
/mol_type="genomic DNA"
/db_xref="taxon:30724"

primer_bind 49..71

repeat_region 87..267
/note="microsatellite Cpall2"
/rpt_type=tandem
/rpt_unit_seq="taga"
complement (257..306)

primer_bind

ORIGIN

```

1 ccttasatta gtgataagca acaggggaatg totcaactac aaatttcaga gagggagta
61 aaattgcagc cttctacata ggcagataga tagatagaca gatagataga tagataaaca
121 gatgaataga cagatagata gatagataga tagatagaca gatagataga tagatagaca
181 gatagatagc agatagaagc atagatagat agatagatag atagatagat ggatagatag
241 atagagagaa agagacagag agagagaagg ggtggggggc agctcctgc cctcccatc
301 tctgacctgt tctgtgttca aactctcaac gttccctgct gcaagcatga ctcaagatca
361 gttatctggg tctgcaaca cactctcaag caatgtcaag acaactcagg gcttccactt
421 ggtccctcgg ttagtctcct cagggccttc acttggctcc gggatagatt ccttcagga
481 ctgtgggggc gcaactgac cactgcacct gcaattaggg agcagctgac a

```

Sequencia

Figura 5. A: sitio web del NCBI que muestra un comando ejemplificando la forma en que se realizó la búsqueda. B: ejemplo de secuencia obtenida para un locus microsatelital de *Clupea pallasii*. La referencia brinda información del polimorfismo del locus, mientras que en la secuencia se puede identificar la región de repetición del motivo y la región del cebador.

	
Primers del autor	Primers este trabajo

	Región de repetición	
--	----------------------	--


```

1 cctatgtgac ttctgttta aattacctta cattaccac ataatacaac caattcgaat
61 gtgccatctt ttctagcccc ctcaagtggca ggcataattat ttgtgctttt caaatgaaag
121 tgcacacctt ttgtcagtta taacaccacc cactgactca caggttctcc tcaacagatg
181 gtctagaaag atagatagat agatcgaaag atagatagat atatagacat atagatagat
241 agatagatag atagatagat agatagatag atagatagat agataagata gatagaaaga
301 tagatagata gatagataca gtagatagat acatagacag atagattgat caatcacaaa
361 tgttccaatc cctccacaaa gcctttagtg ttaatgtttg tgttttacac cttagatgc
421 ttgagataag gtttctttgc

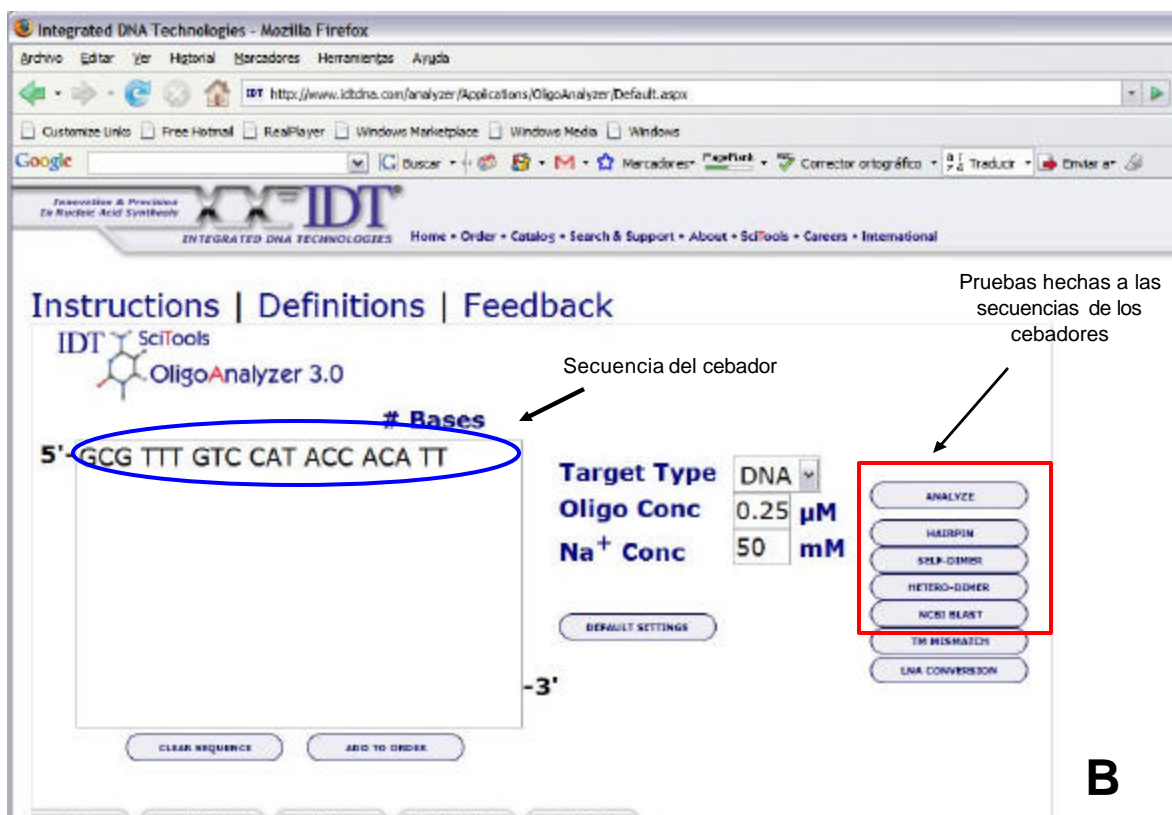
```

Figura 6.- Ejemplo de diseño de un cebador. Los rectángulos verdes señalan la región de repetición del microsatélite, los rectángulos azules los sitios de empalme de los cebadores diseñados por el autor, y los rectángulos rojos los sitios de empalme de los cebadores diseñados para este trabajo.

La viabilidad de cada par de oligonucleótidos candidatos para fungir como cebadores de PCR fue evaluada con la ayuda del programa *Oligo Analyzer v3.0* (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) (Fig. 7A). Dichas pruebas consistieron en calcular la T_m de cada oligonucleótido, verificar que la secuencia del cebador no formara horquillas y dímeros (homodímeros), y comprobar que las secuencias de ambos cebadores no fueran complementarias entre sí (heterodímeros). (Figura 7B)



A



B

Figura 7.- A: sitio web de *Integrated DNA Technologies* que muestra el vínculo a la rutina *OligoAnalyzer 3.0*. B: se muestra una secuencia de cebador que es probada para calcular su T_m (Analyze), posible formación de horquillas (Hairpin) y dímeros (Self-dimer), posible complementariedad (Hetero-dimer) entre cebadores para un locus, y porcentaje de homología en un banco de genes (NCBI Blast).

2.2. Objetivo específico 2: Optimización de amplificación vía PCR

Para descartar la posibilidad de que la amplificación fracasara por causa de ADN degradado, se obtuvieron cinco sardinas adultas frescas de desembarques pesqueros del puerto de Ensenada, Baja California, México. La extracción de ADN genómico se llevó a cabo siguiendo el protocolo de extracción con Cloruro de Litio descrito por Aijanabi y Martínez (1997). Se utilizó tejido muscular del pedúnculo caudal. La presencia y calidad de ADN fueron corroboradas via electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio, expuesto a luz ultravioleta.

Las pruebas de optimización de la amplificación de ADN con los cebadores diseñados se realizaron vía Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Fueron hechas en reacciones de 10 μ l de volumen final de reacción y haciendo combinaciones en las condiciones de la reacción para identificar las condiciones químicas óptimas (Tabla I). La concentración del cebador fue probado en concentraciones finales de 0.15 μ M y 0.2 μ M a 1 μ M en incrementos de 0.1 μ M. La concentración del ADN patrón fue evaluado con 100mg de tejido del cual fue extraído el ADN, y en diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000. Las unidades de enzima ADN polimerasa utilizadas para optimizar las reacciones de amplificación fueron 1U y 0.5U y cloruro de magnesio ($MgCl_2$, cofactor de la enzima), a 1mM, 1.5mM y 2mM de concentración final. Una vez identificadas las condiciones químicas óptimas para la amplificación, se realizaron combinaciones del tiempo y temperatura de anillamiento del cebador. Para ello se probaron tres tiempos distintos de anillamiento (45, 60 y 75 segundos) y gradientes de temperatura dentro de tres intervalos de temperatura basados en la T_m teórica de los cebadores diseñados (Tabla II). Los productos de PCR fueron verificados en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio y expuestos a luz UV.

TABLA I- Combinaciones de las condiciones químicas evaluadas para optimizar las reacciones de PCR. Las concentraciones representan concentraciones finales. (*) indica la combinación con mejor funcionalidad para la amplificación. Los cuadros sombreados representan las condiciones de PCR probadas.

Taq	MgCl ₂	ADN	Cebador (μM)							
			0.15	0.2	0.3	0.4	0.5	0.8	0.9	1
1U	1mM	Stock								
		1:10								
		1:100								
1:1000										
1.5mM	Stock	1:10								
		1:100								
		1:1000								
2mM	Stock	1:10								
		1:100								
		1:1000								
0.5U	1mM	Stock								
		1:10								
		1:100								
1:1000										
1.5mM	Stock	1:10								
		1:100								
		1:1000								
2mM	Stock	1:10								
		1:100								
		1:1000								

TABLA II.- Condiciones de tiempo y temperatura de anillamiento evaluadas para optimizar la reacción de PCR. (*) marca el tiempo y las temperaturas con mejor funcionalidad para la amplificación; las otras combinaciones de temperatura y tiempo no formaron productos de PCR o estos no fueron del tamaño esperado, lo que significa que los cebadores amplificaron otras regiones del genoma.

Gradiente (°C)	Tiempo de anillamiento (segundos)	Temp. de anillamiento (°C)					
		45	46.3	49.2	53.9	57.7	59.7
45-60	45			*			
	60						
	75						
45-55	45	45	45.9	47.8	51	53.5	54.8
	60				*		
	75						
50-65	45	50	51.3	54.2	58.9	62.7	64.7
	60	*	*				
	75						

2.3. Objetivo específico 3. Selección de loci con amplificaciones consistentes y reproducibles

La selección de los loci candidatos consistió en elegir entre los loci potencialmente amplificados aquellos que originaran productos de PCR de una sola banda menores a 700 pb (tamaño esperado máximo de los fragmentos por aislar). Se buscó que las amplificaciones fueran consistentes y reproducibles utilizando los mismos tipos de reactivos en diferentes termocicladores. Para ello se utilizaron los termocicladores MJ Research PTC-225, MJ Research PTC-200 y el kit de PCR Amplitaq Gold de Perkin-Elmer®. El perfil de termociclado para esta prueba fue el siguiente: 95°C (10min); 9 ciclos de 95°C (45 s) + 55°C (-0.5°C por ciclo)(15s) + 72°C (45s); 30 ciclos de 94°C (30s) + 50°C

(15s) + 72°C (45s); 72°C (5min) y las siguientes concentraciones finales de reacción: 1X buffer de PCR (10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl), 1.6mM MgCl₂, 0.4mM (todos) dNTP's, cada uno de los cebadores a 0.33µM, 0.4U de Taq-polimerasa AmpliTaq Gold (Perkin-Elmer, California), 4µl de ADN genómico diluido 1:10.

2.4. Objetivo específico 4 : Selección de loci en función de su secuencia nucleotídica y variabilidad alélica

Para la identificación de loci positivos, se seleccionaron aquellos loci en los cuales se demostró que las amplificaciones fueran consistentes y reproducibles, por lo que fueron secuenciados y genotipificados. Para secuenciar, se tomaron los productos de PCR de ocho individuos para cada uno de los loci candidatos y fueron purificados con el protocolo de limpieza de *Sephadex*. Después fueron secuenciados con la finalidad de corroborar en la secuencia nucleotídica la existencia de motivos de repetición y confirmar que efectivamente se había aislado un locus microsatelital. Las reacciones de secuenciación se hicieron utilizando 3µl del producto de PCR purificado, 1µl de cebador (3.2 µM), 1µl de BigDye Terminator v3.1, 2µl de BigDye sequencing buffer 5X y 4µl de agua desionizada. El perfil de termociclado fue de 96°C (60seg) + 45 ciclos de 96°C (10seg) + 50°C (10seg) + 60°C (4min). Se utilizó un secuenciador automático ABI Prism® 3730 DNA Analyzer. La limpieza y edición de las secuencias nucleotídicas fueron hechas con ayuda del programa SEQUENCHER 4.7

Otra forma de verificar la presencia de un locus microsatelital fue mediante la genotipificación de los loci candidatos. Para ello se marcó en todos los loci candidatos el

cebador designado como “forward” o “F” con un fluoróforo (Tabla III). Con estos cebadores marcados fueron genotipificados 96 individuos en cada uno de los loci candidatos. Así fue posible caracterizar los tamaños alélicos en cada uno de los loci.

TABLA III.- Nombre del fluoróforo utilizado para marcar el cebador F en cada uno de los loci candidatos. El color del fluoróforo fue seleccionado en función del tamaño del fragmento en cada locus; de manera que el mismo tipo de fluoróforo no se usara en loci con fragmentos de tamaño similares.

Locus	Tipo de Fluoróforo	Tamaño esperado del fragmento
alalfa01	HEX	101
alfafa01	FAM	148
alfafa02	HEX	172
alsabr01	HEX	270
alsabr03	FAM	358
alsabr05	TET	261
cupami08	TET	485
cupaol05	FAM	314
sapi10	TET	225

Las reacciones de PCR para la genotipificación se hicieron en un volumen final de 15µl, que incluyó 4µl de ADN templado (diluído 1:20), 1.5mM de MgCl₂, 0.33µM de cada

cebador, 0.4 μ M de dNTP's (todos), 1X buffer de PCR (10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl) y 0.17U de Taq-Polimerasa. El perfil de termociclado fue el siguiente: 95°C (2 min); 9 ciclos de 95°C (15 s) +53°C (15 s) + 72°C (45 s); 24 ciclos de 89°C (15 s) + 55°C (15 s) + 72°C (45 s); 72°C (5 min). Los productos de PCR fueron examinados por medio de electroforesis en un secuenciador automático ABI Prism® 377 (Applied Biosystems, California). La determinación de los tamaños y el conteo de alelos se realizaron utilizando el programa GENOTYPER 2.0 (Applied Biosystems, California).

2.5. Caracterización de los loci microsatelitales

Para determinar los tamaños alélicos, se buscó que los cromatogramas de genotipificación cumplieran con estándares de calidad como la consistencia en la forma de los picos de cada locus, presencia de picos de alta intensidad adyacentes al pico principal, formas inusuales del pico de acuerdo al patrón de la forma del pico observado en cada locus, desproporción en la razón altura: distancia entre picos. Fueron excluidos aquellos datos que no satisficieran estos estándares.

Se utilizaron un total de 96 sardinas provenientes de Oregon (n=25), California (n=25), Bahía Magdalena (n=25) y el Golfo de California (n=21) para evaluar el nivel de polimorfismo. Los polimorfismos se cuantificaron con base en el número de alelos por locus positivo. Además, se calculó tanto la distribución de frecuencias alélicas como las heterocigosidades observada y esperada por locus y por localidad. Tanto el polimorfismo como la heterocigosidad fueron cuantificados utilizando el programa Fstat 2.9.3.2 (Goudet, 1995).

Se realizó la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) por locus, utilizando el programa ARLEQUIN 3.1. (Excoffier y Schneider, 2005) para probar si la heterocigosidad observada fue estadísticamente diferente de la esperada. Finalmente, se estimó el grado de similitud entre las secuencias de los loci positivos y aquellas de las que fueron diseñados los cebadores. Para ello se alinearon para cada locus las secuencias de las regiones flanqueantes del locus descrito originalmente y aquella obtenida para la sardina monterrey. La región flanqueante Forward corresponde a la secuencia comprendida entre el primer nucleótido que sigue después de la región de empalme del cebador Fw y el que antecede el comienzo de la región de repetición, y la región flanqueante Reverse corresponde a la secuencia entre el primer nucleótido después de la región de repetición y el que antecede la región de empalme del cebador Rv. El porcentaje de similitud fue determinado con base en el número de sitios (nucleótidos) conservados en la secuencia. Los alineamientos fueron hechos utilizando el programa MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2004).

3. RESULTADOS

3.1. Diseño de cebadores

Se diseñaron 48 pares de cebadores para loci microsatelitales a partir de secuencias de seis especies de clupeidos (Tabla IV): arenque del Pacífico (*Clupea pallasii*; 23 loci), arenque del Atlántico (*Clupea harengus*; cinco loci), sábalo americano (*Alosa sapidissima*; cinco loci), sábalo europeo (*Alosa fallax*; dos loci), sábalo común (*Alosa alosa*; un locus) y la parrocha europea (*Sardina pilchardus*; 12 loci). La mayoría de los cebadores diseñados fueron di-nucleótidos. La secuencia y Tm de los cebadores diseñados se muestran en la Tabla V, así como el motivo esperado.

TABLA IV.- Especie de origen, cantidad y tipo de microsatélites cuyas secuencias fueron utilizadas para el diseño de cebadores en este trabajo.

Especie de origen	Secuencias	Motivo nucleotídico en especie de origen		
		di	tri	tetra
<i>Alosa alosa</i>	1	1		
<i>Alosa fallax</i>	2	2		5
<i>Alosa sapidissima</i>	5		3	2
<i>Clupea harengus</i>	5			5
<i>Clupea pallasii</i>	23	10		13
<i>Sardina pilchardus</i>	12	12		
TOTAL	48	25	3	20

TABLA V.- Cebadores diseñados para este trabajo y su Temperatura de anillamiento teórica (Tm). El motivo esperado es el motivo que se observó en la secuencia a partir de la cual se diseñó el cebador.

Nombre del Locus	Secuencia de los cebadores diseñados. F, R...5'-3'	Longitud	Tm	Motivo esperado	Acceso Genbank
cupaol01f	GCG TTT GTC CAT ACC ACA TT	20	53.5	atct	AF406950
	CTG TCA TCC CCA ATA CGT TA	20	51.7		
cupaol02f	TGT CCA TCT GTC CAT TCA GC	20	54.8	atct	AF406949
	TTA GAC GTG TGT ATT AAA GGC T	22	51.5		
cupaol03f	GAG AGG GAG TTA AAA TTG ACA GC	23	53.7	taga	AF406948
	AGT GAA GGC CCT GAA GGA ACT AA	23	57.9		
cupaol04f	TGT CCA GTA AAA CAT GCC TGA	21	54.3	taga	AF406947
	CTT TTG CGG GTA GTT GTG TTT T	22	54.3		
cupaol05f	ATG ATT TTT CGC CTT TTG CT	20	51.2	atct	AF406943
	GGC TAA ATT AAC ATC ATG AGC C	22	51.9		
cupaol06f	TGA TTG GGT CCT TTT GAA CAT	21	52.4	atct	AF406940
	TTT CTC CAT TGT TAC ATC GTG A	22	52.0		
cupaol07f	TGT TTA AAT TAC CTT ACA TTA CCC AC	26	51.6	taga	AF406939
	TCT CAA GCA TCT TAA GGT GTA A	22	51.3		
cupaol08f	GGC TGA AGT CAC CCT TCT AGA	21	56.0	atct	AF406937
	CAC CCT GAA GAT GAT GAG GA	20	53.8		
cupami01f	AGG AGG GCC TTA ATT CCC CTT	21	58.2	ac	AF318286
	GAG TCT ACA CAC TCC TGT TCA A	22	54.0		
cupami02f	CGA CCA CGT TTG TCT TTG TT	20	53.7	gaca	AF309804
	GGT TGT TGA CGA TCT ATC AAA GAT A	25	52.7		
cupami03f	CAG GCT CAA ATA GGA ACA CA	20	52.4	gata	AF309803
	TTC CCC TAT GTG TAT GTG ATG	21	51.7		
cupami04f	CTA AAA CAG ACC ACA GTA CCA	21	52.0	gata	AF309801
	TGT GCA CGT TAC AAA TAT CAC T	22	52.5		
cupami05f	TGC CAC AGC TTG TTA AGT TAA G	22	53.4	gaca	AF309800
	GTA TTA CAT TAG TTT GAA CAC AAC TCA G	28	52.7		
cupami06f	TGC ATT TGC AGT TGG AGC AG	20	56.6	gaca	AF309799
	CAT TGC TTG TGT TTT AGA GTC CTG C	25	56.7		
cupamio7f	CGC TCT AGA ACT AGT GGA TCT T	22	53.4	ca	AF309798
	ACT AAA GGG AAC AAA AGC TGG	21	53.1		
cupami08f	TCA CTA TAG GGC GAA TTG GA	20	53.0	ca	AF309795
	ACT AAA GGG AAC AAA AGC TGG	21	53.1		
cupami09f	TCA CTA AAG GGA ACA AAA GCT G	22	53.2	ct	AF309793
	CGG CTC ACA AAC AAC ACT AAT T	22	53.9		
cuhamc01f	CCC CTA CAA GCT AGT TTA TCT G	22	52.4	gaca	AF290885
	GTT CTT ACT GAT GTT CTC TGG G	22	52.8		
cuhamc02f	GTA CTG ATT CAG TGT TTC TTC TTC A	25	53.0	atag	AF289096
	CCC TAT GCG TAT TGT TTT ACT GT	23	53.0		
cuhamc03f	TCA GAA TGT TCC TTC CTG GA	20	53.1	acag	AF289095
	GTA TTT TAA TAA ATC AGC CAT TGT CAA TC	29	52.0		

TABLA V.- Continuación

Nombre del Locus	Secuencia de los cebadores diseñados. F, R...5'-3'	Longitud	Tm	Motivo esperado	Acceso Genbank
cuhamc04f	GAT TGT CCA AAC AGC GCC	18	54.7	gata	AF304361
	AAA CCA GGA CCA GAA AAG AAG T	22	54.4		
cuhamc05f	CTA GAG ACC TTG CCA AAC AT	20	52.2	gaca	AF304359
	GGT TGT ACT GCA GAT GGA	18	51.7		
cupaoc01f	ATT TCG CTA CGG CAC TCA TA	20	53.9	gt	AF019994
	CCA GTG CAG TCT GAC TTT AC	20	53.1		
cupaoc02f	GAG ACT TAC TCT CAT CGT CCG	21	54.2	tg	AF019993
	TGG AAC CAA TCT ACT GTG CTT	21	54.0		
cupaoc03f	ACA GTT CTC CAT TCG GGA C	19	54.4	tg	AF019992
	TGA TTG GCT ATC ATT CCA TCC AT	23	54.2		
cupaoc04f	CCT ATG CTA TCC TAA CGA TGG T	22	53.6	tg	AF019991
	ACG AAC AGC TAT GAC CAT GA	20	53.6		
cupaoc05f	CTT TTG TGG CTT TGC TAA GTG A	22	53.9	tg	AF019989
	GAC AAG ACA GTA AAG ATG AGC TAT TC	26	53.4		
cupaoc06f	TGC CTG CTG AAG ACT TCC TTA	21	56.0	tg	AF019987
	CGG TAC CCC CTA AAT GTG TTC	21	55.4		
alsabr01f	AAG TTC CGT TTG AAT CAC CG	20	53.4	gtt	AF049462
	ACG TCA ATT AGG ATA AAT TGA GTT GAC	27	53.7		
alsabr02f	TTT GAC TTG CAT CTG ATG TCG	21	53.3	tttc	AF039661
	TGT ATC CCT GCA CAT TTT AAT TGG	24	53.8		
alsabr03f	GCT CTA AGC AGC ATA CAT CCT T	22	54.8	tttg	AF039660
	CGG GTC AGG TTT GTC CT	17	54.5		
alsabr04f	CAA AGG AAC TGA GGA GCA G	19	53.1	aac	AF039659
	GTC TAG GTC TGA ATG TAC ATA CTG T	25	53.6		
alsabr05f	CCA TTA CTC CAA GTT GCT TTT ATT	24	51.8	ttc	AF039657
	GCT AGT GAA GTG ACA TTG ATA TC	23	51.1		
alfafa01f	GCT AAT GGA CAT ATC TGC TGG	21	53.1	ca	AY617116
	GAG CAA GGT GTG AAG GAA TTT AA	23	53.4		
alfafa02f	ACG AAG TCA AAA GGA TAC ATA GTC	24	52.5	ca	AY617114
	TGG AGT GTC ACG TTT CAC	18	52.4		
alalfa01f	GGC ATT CGT TGA CTT TAC TCA	21	53.0	gt	AY617109
	CAG CAC TTT GAC AGG ACA TT	20	53.2		
sapi01f	ATG TGG GTG GAT TGA AAT GA	20	52.0	ag	AJ639616
	TAG GGA AAG TTA TAA CGT TTA TCT CC	26	52.3		
sapi02f	GAC CAG TGA AAA GAA AAT GAC AAA	24	52.3	ac	AJ639617
	TTG GAA TGA TTA GGC TAC TAT TGC	24	52.9		
sapi03f	ACA CTT GAT ACA ATA ACA GTG GC	23	53.2	ca	AY241288
	AGC CGG ATT TTT ACA TGT CTG	21	53.2		
sapi04f	AAT GAG CAT CAG TCT AAG AAA TGT	24	52.4	tc	AY241287
	TGA TCA CTG CCA GAG GAA	18	53.1		
sapi05f	TGA AGG ATT GAC AGC CCT	18	53.4	ac	AY241285
	AGT CCT GAG TAA CGT GTC AAT A	22	53.1		

TABLA V.- Continuación

Nombre del Locus	Secuencia de los cebadores diseñados. F, R...5'-3'	Longitud	Tm	Motivo esperado	Acceso Genbank
sapi06f	GAT GGC CTT ATG ATG GAC C	19	52.8	ac	AY241283
	ACT AAT CTA TAA TCT GCA CTT GAT CTG	27	52.6		
sapi07f	CGT GTA AAA CCT CAT TGG GT	20	52.9	gt	AY241282
	TGA GAA GTC AAT TTC CTT CAA AAA AC	26	52.7		
sapi08f	GTT GAG TCT TTA CAT CTG AGG TAA	24	52.2	gt	AY241281
	TGA GAA GTC AAT TTC CTT CAA AAA AC	26	52.7		
sapi09f	TGG ATG GAC CAT TTA TTT TAG GT	23	52.0	gt	AY241280
	TGC ATC CAA AAG CTA GAC AA	20	52.1		
sapi10f	AAA ATA AGT TTA AGA TCT GTA AAG CGA	27	51.5	gt	AY241279
	GCA CTG TTC AAT CAA TTT TCA AC	23	51.5		
sapi11f	ACC AGC AAA GCA GAG TG	17	52.7	gt	AY241278
	GGA CCA ACT TAC AGG ATC C	19	52.3		
sapi12f	AGG CTG GAC TGA AAA ATG G	19	52.8	gt	AY241277
	CTT TTG CAC TAC TTT TGC ATC TAT	24	52.0		

TABLA VI.- Evolución en la designación por categorías de los loci durante el desarrollo de las pruebas; desde los primeros en los que se obtuvieron productos de amplificación (loci potenciales) hasta aquellos que se confirmaron como loci microsatelitales (loci positivos).

Loci Potenciales	Loci Candidatos	Loci Positivos
alfafa01	+	-
alfafa01	+	+
alfafa02	+	-
alsabr01	+	+
alsabr03	+	+
alsabr05	+	+
cuhamc01	-	-
cuhamc05	-	-
cupami01	-	-
cupami04	-	-
cupami07	-	-
cupami08	+	+
cupaoc01	-	-
cupaoc02	-	-
cupaoc03	-	-
cupaoc06	-	-
cupaol05	+	+
cupaol08	-	-
sapi01	-	-
sapi02	-	-
sapi04	-	-
sapi10	+	+
sapi12	-	-

3.2. Optimización de la reacción de amplificación

Con base en las pruebas de optimización realizadas (Tablas I y II) se logró obtener productos de amplificación en reacciones de 10µl de volumen final bajo las siguientes condiciones de concentración final: dNTPs 0.2mM (todos), MgCl₂ 1.5mM, 0.5U de enzima Taq, cebador 0.5µM (cada uno) y buffer 1X (10mM Tris-HCl pH8.3, 50mM KCl, 15mM MgCl₂) en combinación con 95°C (5 min); 34 ciclos de 95°C (45 s) + 49°C -51°C (45 s) + 72°C (60 s); 72 °C (5min). De los 48 loci ensayados, se logró obtener productos de PCR de una sola banda <700 pb en 23 loci; los otros 25 loci o no generaron productos de PCR o presentaron múltiples productos no específicos. A estos 23 loci se les designó como loci potenciales (Tabla VI).

3.3. Selección de loci con amplificación consistente y reproducible

Para probar que las amplificaciones fueran consistentes y reproducibles, se realizó un ajuste en las condiciones de amplificación de las reacciones con las cuales se obtuvieron los loci potenciales. El nuevo perfil optimizado fue 95°C (10min); 9 ciclos de 95°C (45 s) + 55°C (-0.5°C por ciclo)(15s) + 72°C (45s); 30 ciclos de 94°C (30s) + 50°C (15s) + 72°C (45s); 72°C (5min) y las siguientes concentraciones finales de reacción: 1X buffer de PCR (10mM Tris-HCl pH8.3, 50mM KCl), 1.6mM MgCl₂, 0.4mM (todos) dNTP's, cada uno de los cebadores a 0.33µM, 0.4U de Taq-polimerasa AmpliTaq Gold (Perkin-Elmer, California), 4µl de ADN genómico diluido 1:10. Solamente nueve de los 23 loci potenciales presentaron amplificación de manera consistente. Estos nueve loci se categorizaron como loci candidatos (Tabla VI).

3.4. Selección de loci en función de secuencia nucleotídica y variabilidad alélica

Una vez que los loci candidatos fueron secuenciados y genotificados, se identificaron aquellos que resultaron positivos. Por razones de limitación de recursos, sólo seis (*alsabr01*, *alsabr03*, *alsabr05*, *alfafa01*, *sapi10* y *cupami08*) (Tabla VII) de los nueve loci candidatos fueron secuenciados. Se corroboraron e identificaron dos loci con motivo de repetición dinucleótido, dos trinucleótido y uno tetranucleótido (Tabla VIII). La secuenciación del locus *cupami08* no fue exitosa.

Los nueve loci candidatos fueron probados por genotipificación de 96 individuos. Seis de los nueve loci candidatos fueron genotipificados con éxito bajo las condiciones descritas en la metodología (*alsabr01*, *alsabr03*, *alfafa01*, *sapi10*, *cupaol05* y *cupami08*). Para la genotipificación del locus *alsabr05* fue necesario ajustar el perfil de termociclado: 95°C (2 min); 9 ciclos de 95°C (15 s) + 51°C (15 s) + 72°C (45 s); 24 ciclos de 89°C (15 s) + 55°C (15 s) + 72°C (45 s); 72°C (5 min). Dos de los nueve loci candidatos (*alalfa01* y *alfafa02*) no pudieron ser genotipificados probablemente porque las temperaturas de anillamiento (51°C y 53°C) usadas en la reacción de genotipificación no fueron idóneas para el funcionamiento de los cebadores. De esta manera, siete loci fueron genotipificados con éxito, de los cuales cinco fueron secuenciados y se verificó la presencia de motivos de repetición. Estos siete loci fueron considerados loci positivos (Tabla VI y VIII).

TABLA VII.- Secuencias de cinco loci positivos identificados en este trabajo. Sólo se muestra la secuencia correspondiente a un individuo de los ocho secuenciados por locus. La región de repetición está subrayada.

Locus	Secuencia
alsabr01	TTAGTTCCGTTTGAATCACCGCGAACAAATTAAGGGTGGGGGCGGGGAGGT ACGGGTGTGGTATTTACTGACGAGCGGCCCGTCCGGTCACAGTTACTGCC GCTGCTGCCGCCCRATGTAGTTGCTGTG <u>TTGTTGTTGTTGTTGTTCTG</u> <u>TTGTTGTTGTTGTTGCGTTCTTTAGACCCTCTCAAGGACACATACTCT</u> TTTCTCCCGTCAACTCAATTTATCCTAATTGA
alsabr03	CCCTTACTGCTCTAAGCAGCATACATCCTTATTTGCACAGCCCGGAGGTC TCAGCACATCTCCATTACATAGAGCAGTAAGGGCAGTTGGCTGCTGCATC AGAGGAGAGTACAGTATGCTTG <u>TTTGTGTTGTTGTTGATTGTTGTTG</u> <u>TTTG</u> CAGGGATGTTCTGTGCCCTGCCGGTCAATTGGAACCTACTGGGCC ATGTCAGGAGGGGTTCCACTGTTCCCCGGTTCAGCAGCCCAAACGGAA CTGGAGTCATCATGGTACTTCAGCCCCTTTCTCCGGCCAGCCGCTCAGTC CAGTGTCCAGGGACATGCTCTTTTCTGTGGTCTGCCAGTTATCCAATAAAA ATAAATTGGACAGGACAACCCTGACCCGA
alsabr05	CCATTACTCCAAGTTGCTTTTATTTTCGTC <u>TTCTTC</u> TTTTTCTTCTCCTT <u>CTTCTC</u> TTTTTCTCTC <u>TTCAATTCTC</u> TGTCATCTCTGCTTTCTTTTCC TCAACAGCAGTTGAATAAACAGAGGGGGCCAGAGGAACAAATCGGAGGGG CCACCGCCTCGCTCGCGCCACCTCCCCTTGCCATGACTGACTATGT GTTGTGCCACGTCTCATTCCGGCCGAGTCACAACGATATCAATGTCACTT CACTAGCAA
alfafa01	GTTTTTAGAGATATATGTTGGCCATGTGTGTCTATGCCAACACCCCCCA AATGCACACACACACACACACACACAACACACACTTA <u>CACACACA</u> <u>CACACACACACACACA</u> ACCACTGACAGACCCACAATATGGTTAAATTT TACACCCAGTGGAGATAAATTCCTTCACATTTGCACA
sapi10	ATAAAAAATTTAAGATATATAAAAAGATATAAAAACCCCCCTCCCCGGC TGAGATCACTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTATATATCTATAGTA TGTTTTACCAACAAAAGCGATAGATGAGATAAGGGTGTGTGTGTGTGTG <u>IGTGTGTGTGTGTG</u> CCAGAGGTCACAA

TABLA VIII.- Loci candidatos y positivos, motivo obtenido a partir de secuenciación y rango de tamaños alélicos. (ND) no determinado.

Locus	Asignación	Secuencia de motivo	Tamaño del fragmento (pb)
alafa01	Candidato	ND	260-300
alafa01	Positivo	CA	170-230
alafa02	Candidato	ND	390-430
alsabr01	Positivo	GTT	200-280
alsabr03	Positivo	TTTG	360-410
alsabr05	Positivo	TTC	250-290
cupami08	Positivo	ND	70-100
cupaol05	Positivo	ND	280-310
sapi 10	Positivo	GT	210-280

3.5. Evaluación del polimorfismo de loci positivos

El grado de polimorfismo (número y frecuencia de alelos) fue variable. El número de alelos observados por locus se encontró entre 3 y 30. Los loci *alsabr05* y *alsabr01* presentaron el menor polimorfismo (3 y 6, alelos respectivamente), mientras que los cinco restantes presentaron entre 9 y 30 alelos (Tabla IX).

TABLA IX.- Número de alelos (A) y de organismos genotipificados (n) para cada locus positivo entre 96 sardinias monterrey provenientes de cuatro localidades.

Locus	A	n
alafa01	30	71
alsabr01	6	88
alsabr03	17	91
alsabr05	3	91
cupami08	9	66
cupaol05	24	88
sapi10	30	77

La distribución de frecuencias alélicas presentó dos patrones. El primer patrón fue de bajo polimorfismo, comprendido por los loci *alsabr01*, *alsabr05* y *cupami08*, en los que se observaron pocos alelos la mayoría de ellos raros y pobremente representados excepto por un alelo muy dominante (Figura 8A). El segundo patrón fue de alto polimorfismo, comprendido por los loci *alsabr03*, *alfafa01*, *sapi10* y *cupaol05*, en los que se observaron muchos alelos, siendo pocos de ellos raros (Figura 8B).

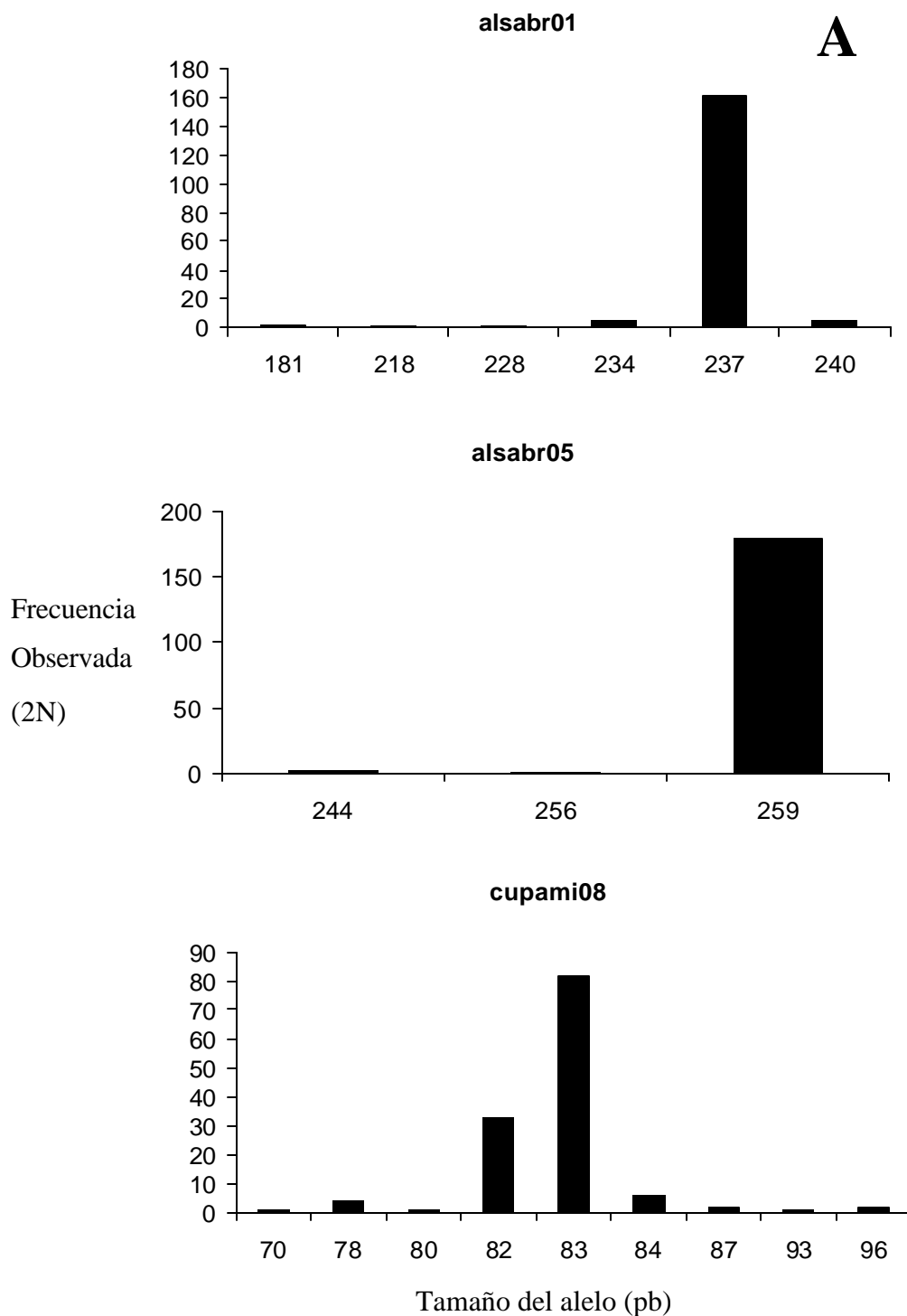


Figura 8.- Distribución de frecuencias de los tamaños alélicos en los siete loci positivos. Alsabr01(n=88), alsabr03 (n=91), alsabr05 (n=91), alfafa01 (n=71), sapi10 (n=77), cupaol05 (n=88), cupami08 (n=66). A) loci con bajo número de alelos, la mayoría de ellos raros y pobremente representados excepto por un alelo predominante.

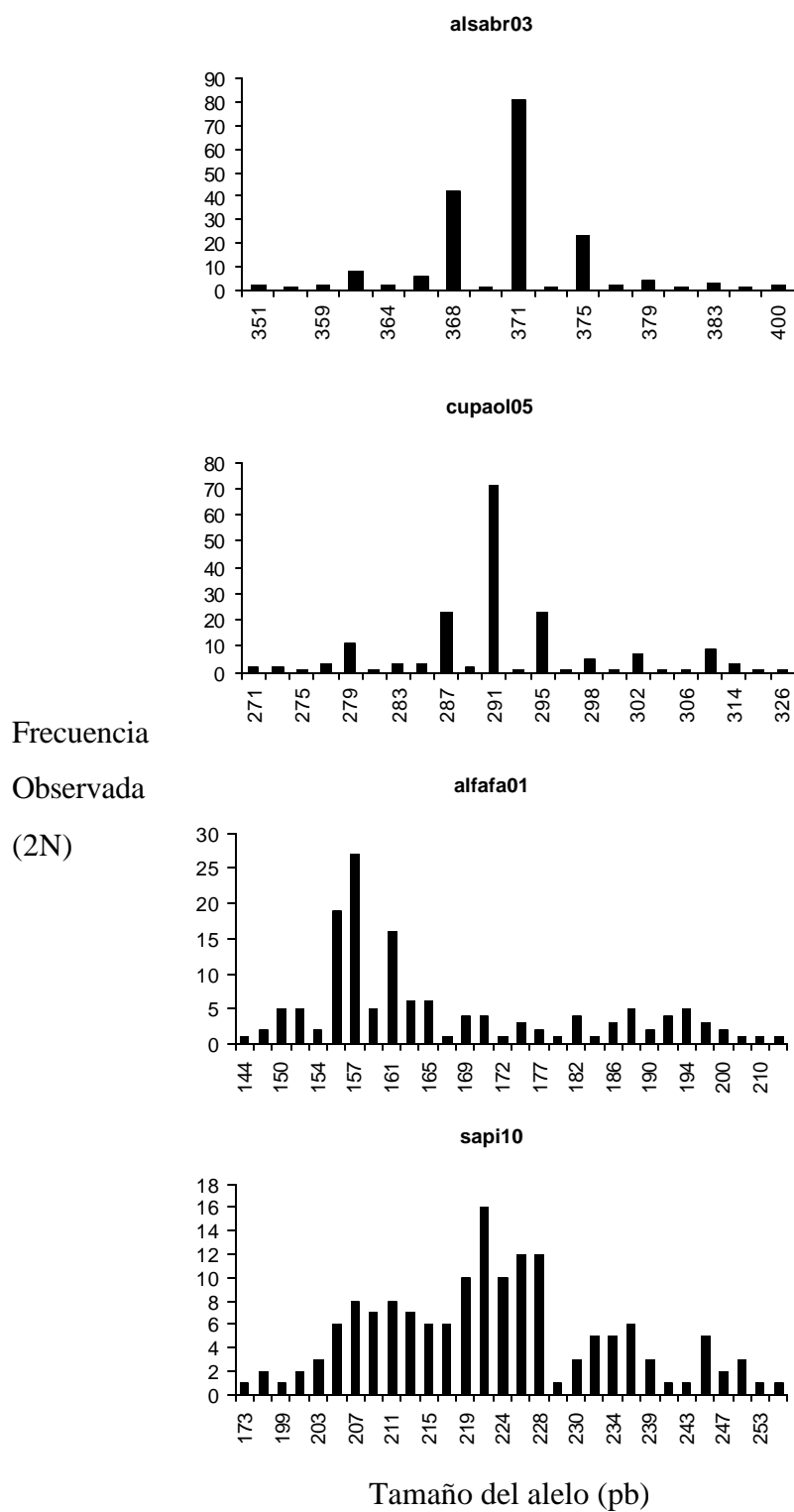
B

Figura 8.- B) Loci con alto número de alelos, la mayoría se encuentran bien representados, pocos de ellos son raros.

Respecto a la variabilidad genética, la heterocigosidad (H) se estimó en primera instancia por locus. La H esperada por locus fue variable, (entre 0.032 para *alsabr05* y 0.953 para *sapi10*). Los valores más bajos de heterocigosidad correspondieron a los loci menos polimórficos, que fueron *alsabr01* y *alsabr05* (Tabla X). Las frecuencias genotípicas se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg para todos los loci ($P > 0.05$). Por localidad, la heterocigosidad esperada fue baja y poco variable (entre 0.53 para California y 0.62 para Bahía Magdalena).

TABLA X.- Heterocigosidades esperadas (He) y observadas (Ho) y significancia de la prueba de desequilibrio de Hardy-Weinberg por locus considerando a todas las localidades juntas.

Locus	He	Ho	P
alfafa01	0.924	0.620	1
alsabr01	0.152	0.091	1
alsabr03	0.732	0.593	1
alsabr05	0.032	0.033	1
cupami08	0.552	0.136	1
cupaol05	0.797	0.693	1
sapi10	0.953	0.779	1

La heterocigosidad por locus por localidad fue nula para tres de estas combinaciones, dos loci dentro del Golfo de California (*alsabr01* y *alsabr05*) y uno (*alsabr05*) en California, en virtud de que las muestras de estos sitios se encontraron fijadas para estos loci (Tabla XI). Lo anterior es consistente porque el Golfo de California fue la

localidad con el valor más bajo de heterocigosidad observada (Figura 9) como consecuencia de que dos de los siete loci analizados fueron monomórficos en esa localidad.

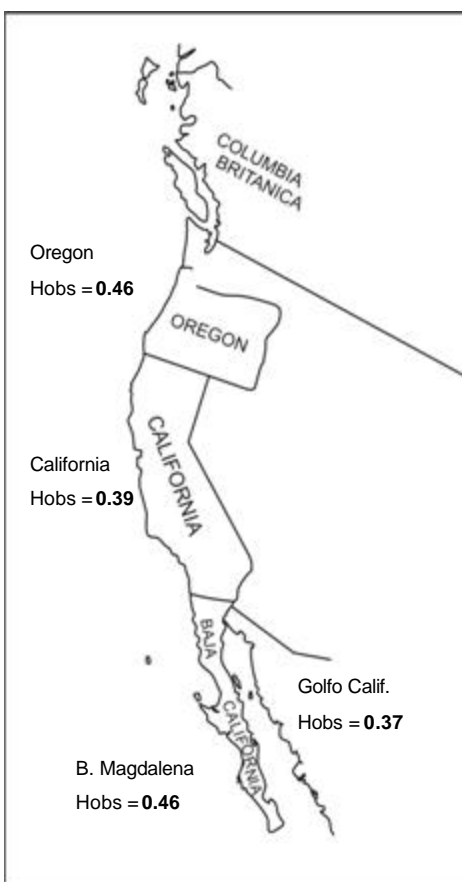


Figura 9- Heterocigosidad promedio observada por localidad. En cada una de ellas se consideraron todos los loci. No se observó ningún gradiente latitudinal en la heterocigosidad.

TABLA XI.- Variabilidad de siete loci microsatelitales en *Sardinops sagax caeruleus* capturadas en cuatro localidades. (A) número de alelos por localidad, (n) número de individuos genotipificados por muestra y locus, (H obs) heterocigosidad observada y (H esp) esperada por locus en cada localidad. Las negritas indican valores significativos de heterocigosidad después de la corrección de Bonferroni.

Locus	Golfo Calif.	B. Magdalena	California	Oregon
<i>alsabr 01</i>				
n	15	25	24	24
A	1	4	3	3
H esp		0.257	0.159	0.121
H obs		0.120	0.167	0.043
P		0.006	1	0.021
<i>alsabr 03</i>				
n	20	25	23	23
A	8	8	7	12
H esp	0.771	0.722	0.677	0.777
H obs	0.550	0.560	0.565	0.696
P	0.186	0.025	0.538	0.591
<i>alsabr 05</i>				
n	20	25	24	22
A	1	2	1	3
H esp		0.040		0.081
H obs		0.040		0.091
P		1		1
<i>alfafa 01</i>				
n	19	22	15	15
A	16	19	12	17
H esp	0.913	0.941	0.867	0.959
H obs	0.526	0.682	0.533	0.733
P	<0.001	<0.001	0.008	0.005
<i>sapi10</i>				
n	17	21	19	20
A	17	18	19	20
H esp	0.938	0.951	0.967	0.958
H obs	0.765	0.810	0.684	0.850
P	0.027	0.127	<0.001	0.145
<i>cupaol 05</i>				
n	20	24	21	23
A	12	17	13	11
H esp	0.792	0.842	0.801	0.752
H obs	0.600	0.792	0.667	0.696
P	0.048	0.796	0.154	0.032

TABLA XI.- Continuación

Locus	Golfo Calif.	B. Magdalena	California	Oregon
<i>cupami 08</i>				
n	18	21	12	15
A	5	6	3	4
H esp	0.643	0.584	0.2356	0.561
H obs	0.111	0.190	0.083	0.133
P	<0.001	<0.001	0.043	<0.001
Promedio de A	8.57	10.57	8.29	10.00
Promedio de H esp	0.811	0.620	0.618	0.602

Respecto al porcentaje de homología entre las secuencias de la sardina monterrey y las secuencias de las especies a partir de las cuales fueron diseñados los primers de los loci positivos, se encontró en ambas regiones flanqueantes (Fwd y Rev) más del 80% de similitud nucleotídica en todos los loci (Tabla XII), excepto en el locus *sapi10* el cual presentó 33% y 57% respectivamente, mientras que el locus *alsabr05* presentó los valores de similitud más altos (92% y 94% respectivamente).

TABLA XII.- Porcentaje de similitud de los loci positivos. Se calculó para la región Forward (Fwd) y Reverse (Rev). *La porción Fw de este locus corresponde solamente a la secuencia del cebador, ya que es el mismo que el descrito originalmente. *n* indica el número de secuencias de sardina monterrey empleadas en el alineamiento.

Locus	Fwd			Rev			n
	Longitud (pb)	Sitios conservados	% similitud	Longitud (pb)	Sitios conservados	% similitud	
Alfafa01	37	30	81	47	43	91	1
Alsabr01	120	100	83	47	37	79	1
Alsabr03	99	81	82	211	179	95	1
Alsabr05*	25	23	92	178	170	96	3
Sapi10	117	39	33	104	85	81	1

4. DISCUSIÓN

En general, los marcadores moleculares microsatelitales son preferentemente usados en genética de poblaciones porque exhiben un alto número de alélos por locus (polimorfismo) y altos valores de heterocigosidad (van Oppen *et al.*, 2000). En este sentido, de los siete loci microsatelitales indentificados en este trabajo, es posible que solamente cuatro (*alsabr03*, *alfafa01*, *sapi10* y *cupaol05*) presenten suficiente polimorfismo para ser utilizados en estudios de genética poblacional de la sardina monterrey.

Nuestros resultados muestran que cebadores diseñados a partir de secuencias de la región flanquante de loci microsatelitales, amplifican exitosamente secuencias microsatelitales homólogas en especies de peces pertenecientes a otros géneros dentro de la misma familia cuyo registro fósil data del Eoceno –50Ma-- (Jerzmanska, 1991; Murray *et al.*, 2005). El alto porcentaje de similitud (>80%) entre la secuencia fuente y las secuencias obtenidas en este trabajo para cada uno de los loci, sugieren que las regiones flanqueantes se encuentran altamente conservadas. El lograr la amplificación cruzada es de gran utilidad, porque a través de la creación de bibliotecas genómicas la obtención de loci moleculares microsatelitales continúa siendo costoso, además de que muchos loci son eliminados durante el proceso de aislamiento de microsatélites (Figura 4). Por lo tanto, la amplificación cruzada permite ahorrar mucho tiempo, dinero y esfuerzo al identificar loci microsatelitales de una especie de interés a partir de cebadores diseñados para especies cercanamente emparentadas.

Uno de lo criterios más comúnmente usados para seleccionar un locus microsatelital para estudios de estructura poblacional, es el número de alelos presentes. Los

loci con más alelos producen estimaciones (distancia genética p.ej.) más precisas que aquellos con pocos alelos (Kalinowski, 2002). Por esta razón, se utilizó como criterio de selección de loci potenciales en la sardina monterrey loci polimórficos de otras especies de clupeidos. Sin embargo, el polimorfismo en una especie no garantiza niveles de polimorfismo similares en otras especies, aunque se encuentren emparentadas (Zane *et al.*, 2002; Ellegren, 2004). Conforme aumenta el tiempo de divergencia evolutiva entre especies, se espera mayor divergencia entre el nivel de polimorfismo de sus loci, debido a que ha transcurrido tiempo suficiente para acumular mutaciones (Rico *et al.*, 1996; Morin *et al.*, 1998). A diferencia de los 450Ma de tiempo de divergencia entre las especies analizadas por Rico *et al.* (1996), el tiempo de divergencia máximo entre los géneros de clupeidos de este trabajo es menor (35Ma).

En este trabajo se esperó que el éxito de amplificación fuera mayor al utilizar primers diseñados a partir de especies del género *Sardina*, en comparación con los géneros *Clupea* y *Alosa*. De acuerdo a Lavoué *et al.* (2007), el género *Sardinops* está filogenéticamente más emparentado con *Sardina*, seguido por el género *Alosa* y finalmente *Clupea*. En relación a los géneros *Sardina* y *Alosa*, el género *Clupea* representa un linaje basal y más distante filéticamente de *Sardinops* (Figura 10). Nuestros resultados son consistentes con esto, ya que se observó un mayor porcentaje de éxito de amplificación en los primers diseñados a partir de *Sardina* (1 locus positivo de 12 probados), que los derivados de *Clupea* (2 loci positivos de 28 probados). De manera similar Julian y Barton, (2007) reportaron que al realizar amplificaciones cruzadas de primers diseñados para *Alosa sapidissima*, tanto el número de loci que generan productos como su polimorfismo fueron menores en el género *Dorosoma* en comparación con otras especies de *Alosa*.

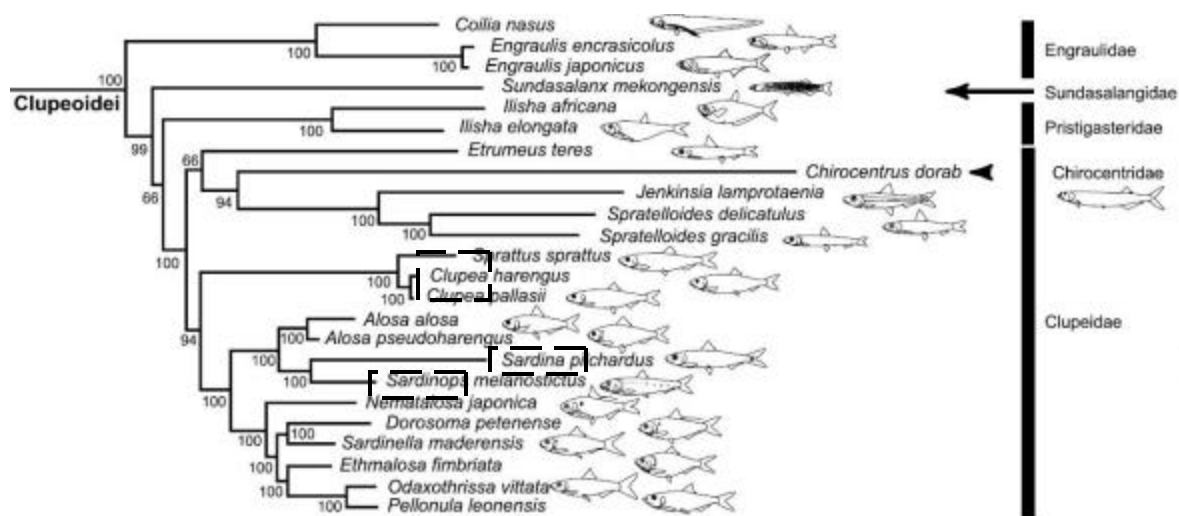


Figura 10.- Relaciones filogenéticas dentro del suborden Clupeoidei con base en el ADNmit. Modificado de Lavoué *et al.* (2007).

La amplificación cruzada o utilización de cebadores aloespecíficos es una estrategia metodológica común en peces (Leclerc *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2005; Ovenden *et al.*, 2006; Julian y Barton, 2007; Vyskocilova *et al.*, 2007a; Vyskocilova *et al.*, 2007b) y otros taxa marinos (Cruz *et al.*, 2005; Iglesias-Rodríguez *et al.*, 2006; Coughlan *et al.*, 2006; Carlon y Lippé, 2007). En todos estos casos, más de la mitad de los cebadores que fueron diseñados a partir de bibliotecas genómicas de ciertas especies, generaron mediante amplificación cruzada productos microsatelitales polimórficos en otras especies congénicas y no congénicas. En este trabajo, el éxito fue del 14% de los loci probados, el cual es relativamente bajo en comparación con trabajos previos. Esta diferencia puede deberse a que los cebadores utilizados en este trabajo no fueron diseñados por el método

tradicional, ya que en principio se diseñaron nuevos cebadores para obtener fragmentos más grandes y buscar SNP's en las secuencias.

Incrementar el tamaño de muestra en un estudio no es la única forma de llegar a estimaciones de estructura o distancia genética más precisas, sino que la precisión se mejora incrementando el número de loci analizados. Es decir, si se cuenta con suficientes loci, es posible obtener estimaciones poblacionales a partir de muestras pequeñas (Kalinowski, 2005). De acuerdo a lo anterior, la amplificación cruzada puede ser un método útil para tener acceso a más loci sin necesidad de caracterizarlos *de novo*. Sin embargo, en este trabajo la efectividad de amplificación cruzada fue muy pequeña; tan sólo el 14% de los primers probados produjo loci positivos, mientras que por el método tradicional de construcción de bibliotecas genómicas la efectividad de los primers que llegan a producir loci funcionales es de >40% (Miller *et al.*, 2001; Olsen *et al.*, 2002; Pereyra *et al.*, 2004; Faria *et al.*, 2004; Julian y Barton, 2007).

Los loci con éxito en la amplificación cruzada fueron principalmente microsatélites con motivos di-nucleótidos. La baja eficiencia de loci con motivos de repetición tri o de repetición tetra-nucleótidos probablemente se deba a que este tipo de loci se encuentra con menor frecuencia entre clonas positivas (Zane *et al.*, 2002) cuando se les caracteriza por el método tradicional (bibliotecas genómicas). Esto podría dificultar su amplificación cruzada. Además estos tipos de motivos de repetición son frecuentes y polimórficos en comparación con motivos di-nucleótidos (Tóht *et al.*, 2000). Aún así no debe entenderse que este tipo de motivos no puedan encontrarse conservados entre taxa.

La amplificación cruzada de loci microsatelitales se basa en la premisa de conservación de secuencias homólogas o genes ortólogos en las regiones flanqueantes de

estos loci nucleares. Lo anterior ha sido reportado para varios taxa marinos, en especial aquellas ectotérmicas como tortugas (FitzSimmons *et al.*, 1995) y peces óseos (Rico *et al.*, 1996); dado que la sustitución nucleotídica es más lenta que en organismos homeotermos (Martin y Palumbi, 1993). Las diferencias en la tasa de sustitución nucleotídica pueden estar vinculadas a varios aspectos de los organismos, como el tiempo generacional, la edad de primera reproducción y el tamaño poblacional, aunque no tenemos los elementos para identificar un factor responsable de la evolución y conservación de las regiones flanqueantes de los loci probados en este trabajo. Si bien se asume que los microsatélites son primordialmente ADN no codificante cuyas mutaciones son neutrales, se han reportado dentro de genes estructurales en los cuales los polimorfismos se han asociado a variaciones funcionales del locus (Brais *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2004). Por lo tanto, es posible que un locus microsatelital y su secuencia flanqueante sean selectivamente conservados y que por ende sea exitosa la amplificación cruzada entre taxa. Aunque si estos loci son sujetos a la selección directa, por encontrarse en una región codificante, o indirecta, por encontrarse ligados a un gen seleccionado (genetic hitchhiking), serán de poca utilidad para la estimación de parámetros genéticos poblacionales que requieran neutralidad.

5. CONCLUSIONES

- ✓ Con los resultados de este trabajo se cuenta con nuevos loci microsatelitales para el estudio del arreglo poblacional de la sardina monterrey.
- ✓ Como se esperaba, el éxito en la amplificación de loci homólogos de otras especies disminuye conforme incrementa la distancia evolutiva entre las especies.
- ✓ La amplificación cruzada es un buen método para ahorrar tiempo, costo y esfuerzo en la identificación de loci microsatelitales
- ✓ Los altos valores de identidad en la secuencia de la región flanqueante entre *Sardinops* y los géneros cuyas secuencias sirvieron para diseñar cebadores, sugiere que estos loci pueden ser útiles en otras especies de clupeidos.

6. LITERATURA CITADA

- Aijanabi S. M. y Martinez I. 1997. Universal and rapid SALT extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*. 22:4692-4693
- Arnegard M. E., Markert J.A., Danley P. D., Stauffer J. R., Ambali A. J. y Kotcher T. D. 1999. Population structure and colour variation of the cichlid fish *Labeotropheus fuelleborni* Ahl along a recently formed archipelago of rocky habitat patches in southern Lake Malawi. *Proceeding of the Royal Society of London Series B*. 266:119-130
- Avise J. 2004. *Molecular markers, natural history, and evolution*. Sinauer. USA. 684pp
- Balloux F. y Lugon-Moulin N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*. 11:155-165
- Bembo D. G., Carvalho G. R., Cingolani N. Y Pitcher T. J. 1996. Electrophoretic analysis of stock structure in northern Mediterranean anchovies, *Engraulis encrasicolus*. *ICES Journal of Marine Science*. 53:115-128
- Bowen B. W. y Grant W. S. 1997. Phylogeography of the sardines (*Sardinops* spp): Assessing biogeographic models and population histories in temperate upwelling zones. *Evolution*. 51:1601-1610
- Brais B., Bouchard J. P., Xie Y. G., Rochefort D. L., Chrétien N., Tomé F. M. S., Lafrentère R. G., Rommens J. M., Uyama E., Nohira O., Blumen S., Korcyn A. D., Heutink P., Mathieu J., Duranceau A., Codère F., Fardeau M. y Rouleau G. A. 1998. Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nature Genetics*. 18:164-167
- Brown R. C., Tsalavouta M., Terzoglou V., Magoulas A. y Mcandrew B. J. 2005. Additional microsatellites for *Sparus aurata* and cross-amplification within the Sparidae family. *Molecular Ecology Notes*. 5:605-607
- Cadrin S. X., Friedland K. D. y Waldman J. R. 2005. Stock identification methods: An overview. *En: Cadrin S. X., Friedland K. D. y Waldman J. R. (Eds.). Stock Identification Methods, Applications in Fishery Science*. Elsevier Academic Press, USA. 3-6 p

- Carlson D. B. y Lippé C. 2007. Eleven new microsatellite markers for the tropical sea urchin *Tripneustes gratilla* and cross-amplification in *Tripneustes ventricosus*. *Molecular Ecology Notes*. En prensa
- Chlaida M., Kifani S., Lenfant P. y Ouragh L. 2006. First approach for the identification of sardine populations *Sardina pilchardus* (Walbaum 1792) in the Moroccan Atlantic by allozymes. *Marine Biology*. 149:169-175
- Clark F. N. 1931. Dominant size groups and their influence in the fishery for the California sardine (*Sardine caerulea*). *Calif. Div. Fish Game Bulletin*. 31:1-43
- Clark F. N. 1947. Analysis of populations of the Pacific sardine on the basis of vertebral counts. *Calif. Dep. Fish Game Fish. Bulletin*. 65:1-26
- Coughlan J., Mirimin L., Dillane E., Rogan E. y Cross F. 2006. Isolation and characterization of novel microsatellite loci for the short-beaked common dolphin (*Delphinus delphis*) and cross-amplification in other species. *Molecular Ecology Notes*. 6:490-492
- Cruz P., Ibarra A. M., Fiore-Amaral G., Galindo-Sánchez C. E. y Mendoza-Carrión G. 2005. Isolation of microsatellite loci in green abalone (*Haliotis fulgens*) and cross species amplification in two other North American red (*Haliotis rufescens*) and pink (*Haliotis corrugata*) abalones. *Molecular Ecology Notes*. 5:857-859
- De León F. J. G., Chikhi L. y Bonhomme F. 1997. Microsatellite polymorphism and population subdivision in natural populations of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Molecular Ecology*. 6:51-62
- Domanico M. J., Phillips R. B. y Schweigert J. F. 1996. Sequence variation in ribosomal DNA of Pacific (*Clupea pallasii*) and Atlantic (*Clupea harengus*) herring. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 53:2418-2423
- Ellegren H. 2004. Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Nature Review Genetics*. 5:435-445
- Excoffier L. G. Laval y S Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetic data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1:47-50
- FAO 2003. Fishery statistics 2003, <http://www.fao.org/W/statist/statist.asp>

- Faria R., Wallner B., Weiss S. y Alexandrino P. 2004. Isolation and characterization of eight dinucleotide microsatellite loci from two closely related clupeid species (*Alosa alosa* and *A. fallax*). *Molecular Ecology Notes*. 4:586-588
- Faria R., Weiss S. y Alexandrino P. 2006. A molecular phylogenetic perspective on the evolutionary history of *Alosa* spp. (Clupeidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 40:298-304
- Felin F. E. 1954. Population heterogeneity in the Pacific pilchard. *United States Fish and Wildlife Service Fisheries Bulletin*. 86, 54:201-225
- Félix-Uraga R., Gómez-Muñoz V. M., Quiñones-Velázquez C., Melo-Barrera F. N., Gracia-Franco W. 2004. On the existence of pacific sardine groups off the west coast of Baja California and southern California. *CalCOFI Rep*. 45:146-151
- Félix-Uraga R., Quiñones-Velázquez C., Hill K. T., Gómez-Muñoz V. M., Melo-Barrera F. N., Gracia-Franco W. 2005. Pacific sardine (*Sardinops sagax*) stock discrimination off the west coast of Baja California and Southern California using otolith morphometry. *CalCOFI Rep*. 46:113-121
- FitzSimmons N. N., Moritz C. y Moore S. S. 1995. Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Molecular Biology and Evolution*. 12:432-440
- Freeland J. R. 2006. *Molecular ecology*. John Wiley and Sons Inc. USA.388pp
- Gold J. R., Pak E., y DeVries D. A. 2002. Population structure of king mackerel (*Scomberomorus cavalla*) around peninsular Florida, as revealed by microsatellite DNA. *U.S. National Marine Fisheries Service Bulletin*. 100:491-509
- Goudet J. 1995. Fstat: A computer program to calculate F-satistics. *Journal of Heredity*. 86: 485-486
- Grant W. S. 1986. Biochemical genetic divergence between Atlantic, *Clupea harengus*, and Pacific, *C. pallasii*, herrings. *Copeia*. 46:714-719
- Grant W. S., Clark A. M. y Bowen B. W. 1998. Why restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA failed to resolve sardine (*Sardinops*) biogeography: insights from mitochondrial DNA cytochrome b sequences. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 55:2539-2547

- Grant W. S. y Leslie R.W. 1996. Late Pleistocene dispersal of Indian-Pacific sardine populations in an ancient lineage of the genus *Sardinops*. *Marine Biology*. 126:133-142
- Grant W. S, Leslie R. W y Bowen B. W 2005. Molecular genetic assessment of bipolarity in the anchovy genus *Engraulis*. *Journal of Fish Biology*. 67:1242-1265
- Gutierrez-Flores C. 2007. Estructura genética poblacional de la sardina del Pacífico Nororiental *sardinops sagax caeruleus*. Tesis de maestría. CICESE. México 102pp
- Hedgecock D., Hutchinson E. S., Li G., Sly F. L., Nelson K. 1989. Genetic and morphometric variation in the Pacific sardine, *Sardinops sagax caeruleus*: Comparisons and contrasts with historical data and with variability in the northern anchovy, *Engraulis mordax*. *Fishery Bulletin*. 87:653-671
- Hedrick, P. W. 2000. *Genetics of Populations*. Jones and Bartlett Publishers. 553pp
- Iglesias-Rodríguez M. D., Probert I. y Batley J. 2006. Microsatellite cross-amplification in coccolithophores: application in population diversity studies. *Hereditas*. 143:99-102
- Jarne P. y Lagoda P. J. L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*. 11:424-429
- Jerzmanska A. 1991. First articulated teleost fish from the Pacific of west Antarctica. *Antarctic Science*. 3:309-316
- Julian S. E., y Bartron M. 2007. Microsatellite DNA markers for American shad (*Alosa sapidissima*) and cross-species amplification within the family Clupeidae. *Molecular Ecology Notes*.
- Kalinowski S. T. 2002. How many alleles per locus should be used to estimate genetic distances? *Heredity*. 88:62-65
- Kalinowski S. T. 2005. Do polymorphic loci require large sample sizes to estimate genetic distances? *Heredity*. 94:33-36
- Kimura M. y Crow J. F. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite populations. *Genetics*. 49 :725-738
- Kimura M. y Ohta T. 1978. Stepwise mutation model and distribution of alleles frequencies in a finite populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 75:2868-2872

- Kinsey S. T., Orsoy T., Bert T. M. y Mahmoudi B. 1994. Population structure of the Spanish sardine *Sardinella aurita*: natural morphological variation in a genetically homogeneous population. *Marine Biology*. 118:309-317
- Knight M. E., Turner G. F., Rico C., van Oppen M. J. H. y Hewitt G. M. 1998. Microsatellite paternity analysis in captive Lake Malawi cichlids supports reproductive isolation by direct mate choice. *Molecular Ecology*. 7:1605-1610
- Koljonen, M. L. y Wilmot, R. 2005. Genetic analysis: Allozymes. *En: Cadrin S. X., Friedland K. D. y Waldman J. R. (Eds.). Stock Identification Methods, Applications in Fishery Science. Elsevier Academic Press, USA. 295-310 p*
- Kumar S., Tamura K. y Nei M. 2004. MEGA 3.1: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. *Briefings in Bioinformatics*. 5: 150-163
- Larsson L. C., Laikre L., Palm S., André C., Carvalho G. R. y Ryman N. 2007. Concordance of allozyme and microsatellite differentiation in a marine fish, but evidence of selection at a microsatellite locus. *Molecular Ecology*. 16:1135-1147
- Lavoué S., Miya M., Saitoh K., Ishiguro N. B. y Nishida M. 2007. Phylogenetic relationships among anchovies, sardines, herrings and their relatives (Clupeiformes), inferred from whole mitogenome sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 43:1096-1105
- Le Corre M., Sabatie M. R., Aprahamian M. W. y Baglinière J. L. 2005. Genetic characterisation of the Rhodanian twaite shad, *Alosa fallax rhodanensis*. *Fisheries Management and Ecology*. 12:275-282
- Leclerc D., Wirth T. y Bernatchez L. 2000. Isolation and characterization of microsatellite loci in the yellow perch (*Perca flavescens*), and cross-species amplification within the family Percidae. *Molecular Ecology Notes*. 9:993-1011
- Lecomte F., Grant W. S., Dodson J. J., Rodríguez-Sánchez R., Bowen B. 2004. Living with uncertainty: genetic imprints of climate shifts in East Pacific anchovy (*Engraulis mordax*) and sardine (*Sardinops sagax*). *Molecular Ecology*. 13:2169-2182
- Lewontin R. C. y Hubby J. L. 1966. A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations II. Amount of variation and degree of

- heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*. 54:594-609
- Li, C. y Ortí, G. 2007. Molecular phylogeny of Clupeiformes (Actinopterygii) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 44:386-398
- Li Y. C., Korol A. B., Fahima T. y Nevo E. 2004. Microsatellites within genes: Structure, function, and evolution. *Molecular Biology and Evolution*. 21:991-1007
- Liu J. X., Gao T. X., Zhuang Z. M., Jin X. S., Yokogawa K. y Zhang Y. P. 2006. Late Pleistocene divergence and subsequent population expansion of two closely related fish species, Japanese anchovy (*Engraulis japonicus*) and Australian anchovy (*Engraulis australis*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 40:712-723
- Madsen T., Olsson M., Wittzell H., Stille B., Gullberg A., Shine R., Andersson S. y Tegelström H. 2000. Population size and genetic diversity in sand lizards (*Lacerta agilis*) and adders (*Vipera berus*). *Biological Conservation*. 94:257-262
- Magoulas A., Tsimenides N. y Zouros E. 1996. Mitochondrial DNA phylogeny and the reconstruction of the population history of a species: the case of the European anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *Molecular Biology and Evolution*. 13:178-190
- Mariani S., Hutchinson W. F., Hatfield E. M. C., Ruzzante D. E., Simmonds E. J., Dahlgren T. G., Andre C., Brigham J., Torstensen E. y Carvalho G. R. 2005. North Sea herring populations structure revealed by microsatellite analysis. *Marine Ecology Progress Series*. 303:245-257
- Marr J. C. 1957. The subpopulation problem in the Pacific Sardine *Sardinops caeruleus*. En: Contributions to the study of subpopulations of fishes, U.S. Dept. Interior Fish. Wildl Svc. Special Scientific report. Fisheries No. 208, Washington DC. 108-125
- Martin A. P. y Palumbi S. R. 1993. Body size, metabolic rate, generation time, and molecular clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 90:4087-4091
- McConnell S. K., O'Reilly P., Hamilton L., Wright J. M. y Bentzen P. 1995. Polymorphic microsatellite loci from Atlantic salmon (*Salmo salar*): genetic differentiations of North American and European populations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 52: 1863-1872

- McPherson A. A., O'Reilly P. T., McParland T. L., Jones M. W. y Bentzen P. 2001a. Isolation of nine novel tetranucleotide microsatellites in Atlantic herring (*Clupea harengus*). *Molecular Ecology Notes*. 1:31-32
- McPherson A. A., Stephenson R. L., O'Reilly P. T., Jones M. W. y Taggart C. T. 2001b. Genetic diversity of coastal Northwest Atlantic herring populations: implications for management. *Journal of Fish Biology*. 59:356-370
- Miller K. M., Laberee K., Schulze A. D. y Kaukien H. 2001. Development of microsatellite loci in Pacific herring (*Clupea pallasii*). *Molecular Ecology Notes*. 1:131-132
- Miller K. M., Le K. D., y Beacham T. D. 2000. Development of tri- and tetranucleotide repeat microsatellite loci in Atlantic cod. *Molecular Ecology*. 9:238-239
- Miller R. R. 1982. First fossil record (Plio-Pleistocene) of threadfin shad, *Dorosoma petenense*, from the Gatuna formation of southeastern new México. *Journal of Paleontology*. 56:423-425
- Moran P., Lundy C., Rico C. y Hewitt G. M. 1999. Isolation and characterization of microsatellite loci in European hake, *Merluccius merluccius* (Merlucciidae, Teleostei). *Molecular Ecology*. 8:1357-1362
- Morin P. A., Mahboubi P., Wedel S. y Rogers J. 1998. Rapid screening and comparison of human microsatellite markers in baboons: allele size is conserved, but allele number is not. *Genomics*. 53, 12-20
- Moritz C., Dowling T. E. y Brown W. M. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18:269-292
- Murray A. M., Simons E. L. y Attia Y. S. 2005. A new clupeid fish (CLUPEOMORPHA) from the Oligocene of Fayum, Egypt, with notes on some other fossil clupeomorphs. *Journal of Vertebrate Paleontology*. 25:300-308
- Nauta M. y Weissing F. 1996. Constraints on allelic size at microsatellite loci: Implications for genetics differentiation. *Genetics*. 143:1021-1032
- Neff B. D. y Gross M. R. 2001. Microsatellite evolution in vertebrates: inference from AC dinucleotide repeats. *Evolution*. 55:1717-1733
- Nelson J. S. 1994. *Fishes of the world*. John Wiley and Sons. USA. 523pp

- O'Connell M., Dillon M. C. y Wright J. M. 1998a. Development of primers for polymorphic microsatellite loci in the Pacific herring (*Clupea harengus pallasii*). *Molecular Ecology* 7:357-363
- O'Connell M., Dillon M. C., Wright J. M., Bentzen P., Merkouris S. y Seeb J. 1998b. Genetic structuring among Alaska Pacific herring populations identified using microsatellite variation. *Journal of Fish Biology*. 53:150-163
- Olsen J. B., Lewis C. J., Kretschmer E. J., Wilson S. L. y Seeb J. E. 2002. Characterization of 14 tetranucleotide microsatellite loci derived from Pacific herring. *Molecular Ecology Notes*. 2:101-103
- Ovenden J. R., Street R. y Broderick D. 2006. New microsatellite loci for Carcharhinid sharks (*Carcharhinus tilstoni* and *C. sorrah*) and their cross-amplification in other shark species. *Molecular Ecology Notes*. 6:415-418
- Parker P. G., Snow A. A., Schug M. D., Booton G. C. y Fuerst P. A. 1998. What molecules can tell us about population: choosing and using a molecular marker. *Ecology*. 79(2):361-382
- Parrish R. H., Serra R., Grant W. S. 1989. The monotypic sardine, *Sardina* and *Sardinops*: the taxonomy, distribution, stock structure, and zoogeography. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 46:2019-2036
- Pereyra R. T., Saillant E., Pruett C. L., Rexroad III C. E., Rocha-Olivares A. y Gold J. R. 2004. Characterization of polymorphic microsatellites in the Pacific sardine *Sardinops sagax sagax* (Clupeidae). *Molecular Ecology Notes*. 4:739-741
- Reilly A., Elliot N. G., Grewe P. M., Clabby C., Powel R. y Ward R. D. 1999. Genetic differentiation between Tasmanian cultured Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and their ancestral Canadian populations: comparison of microsatellite DNA and allozyme and mitochondrial DNA variation. *Aquaculture*. 173:459-469
- Rico C., Rico I. y Hewitt G. 1996. 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. *Proceeding of Royal Society of London Series B*. 263:549-557
- Rubinsztein D. C., Amos W., Leggo J., Goodburn S., Jain S., Li S. H., Margolis R. L., Ross C. A., Ferguson-Smith M. A. 1995. Microsatellite evolution- evidence for directionally and variation in rate between species. *Nature Genetics*. 10:337-343

- Schlötterer C. 2004. The evolution of molecular markers-just a matter of fashion?. *Nature Reviews Genetics*. 5:63-69
- Selkoe K. A. y Toonen R. J. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*. 9:615-629
- Shaklee J. B. y Bentzen P. 1998. Genetic identification of stocks of marine fish and shellfish. *Bulletin of Marine Science*. 62:589-621
- Squerrell J., Hollingsworth P. M., Woodhead M., Russell J., Lowe A. J., Gibby M. y Powell W. 2003. How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants? *Molecular Ecology*. 12: 1339-1348
- Tessier N., Bernatchez L. y Wright J. M. 1997. Population structure and impact of supportive breeding inferred from mitochondrial and microsatellite DNA analyses in land-locked Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Molecular Ecology*. 6:735-750
- Tóth G., Gáspári Z. y Jurka J. 2000. Microsatellite in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research*. 10:967-981
- Tringali M. D. y Wilson, Jr R. R. 1993. Differences in haplotype frequencies of mtDNA of the Spanish sardine *Sardinella aurita* between specimens from the eastern Gulf of Mexico and southern Brazil. *Fishery Bulletin*. 91:362-370
- van Oppen M. J. H., Rico, C., Turner, G.F. y Hewitt, G.M. 2000. Extensive Homoplasmy, nonstepwise mutations, and shared ancestral polymorphism at a complex microsatellite locus in Lake Malawi Cichlids. *Molecular Biology and Evolution*. 17: 489-498
- Vrooman A. M. 1964. Serologically differentiated subpopulations of the Pacific sardine, *Sardinops Caerulea*. *Journal of Fisheries Research Board of Canada*. 21:691-701
- Vyskocilová M., Ondracková M., Šimková A. y Martin J. F. 2007a. Isolation and characterization of microsatellites in *Neogobius kessleri* (Perciformes, Gobiidae) and cross-species amplification within the family Gobiidae. *Molecular Ecology Notes*. 7:701-704
- Vyskocilová M., Šimková A. y Martin J. F. 2007b. Isolation and characterization of microsatellites in *Leuciscus cephalus* (Cypriniformes, Cyprinidae) and cross-

- species amplification within the family Cyprinidae. *Molecular Ecology Notes*. En prensa.
- Waldman J. R. 2005. Definition of stock: An evolving concept. *En*: Cadrin S. X., Friedland K. D. y Waldman J. R. (Eds.). *Stock Identification Methods, Applications in Fishery Science*. Elsevier Academic Press, USA. 7-16p
- Waples R. y Gaggiotti O. 2006. What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular Ecology*. 15:1419-1439
- Zane L., Bargelloni L. y Patarnello T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: A review. *Molecular Ecology*. 11:1-16
- Zhivotovski L. A. y Feldman M. W. 1995. Microsatellite variability and genetic distances. *Proceeding National Academic of Science U.S.A.* 92:11549-11552