



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



DISTANCIA GENÉTICA AL CENTRÓMERO DE  
MICROSATÉLITES EN HEMBRAS DE ABULÓN  
ROJO *Haliotis rufescens* Swainson, 1822 A  
PARTIR DE ANÁLISIS DE PROGENIES  
TRIPLOIDES

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
EN  
MANEJO DE RECURSOS MARINOS

PRESENTA

SUSANA ÁVILA ÁLVAREZ

LA PAZ, B.C.S. DICIEMBRE DE 2009.



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

## SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 10 del mes de Noviembre del 2009 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis de grado titulada:

"DISTANCIA GENÉTICA AL CENTRÓMERO DE MICROSATÉLITES EN HEMBRAS DE ABULÓN ROJO  
Haliotis rufescens Swainson, 1822 A PARTIR DE ANÁLISIS DE PROGENIES TRIPLOIDES"

Presentada por el alumno:

ÁVILA  
Apellido paterno

ÁLVAREZ  
materno

SUSANA  
nombre(s)

Con registro: 

B	0	7	1	1	8	2
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al grado de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

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

### LA COMISION REVISORA

Director de tesis  
PRIMER VOCAL

DR. PEDRO CRUZ HERNÁNDEZ

PRESIDENTE

DR. FEDERICO ANDRÉS GARCÍA DOMÍNGUEZ

SECRETARIO

DR. JOSÉ DE LA CRUZ AGÜERO

SEGUNDO VOCAL

DR. FRANCISCO JAVIER GARCÍA RODRÍGUEZ  
2º DIRECTOR

TERCER VOCAL

DRA. BERTHA PATRICIA CEBALLOS VÁZQUEZ

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

DR. RAFAEL CERVANTES DUARTE



IPN  
CICIMAR  
DIRECCION



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 12 del mes Noviembre del año 2009, el (la) que suscribe ING. SUSANA ÁVILA ÁLVAREZ alumno(a) del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS con número de registro B071182 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de: DR. PEDRO CRUZ HERNÁNDEZ y DR. FRANCISCO JAVIER GARCÍA RODRÍGUEZ y ceden los derechos del trabajo titulado:

"DISTANCIA GENÉTICA AL CENTRÓMERO DE MICROSATÉLITES EN HEMBRAS DE ABULÓN ROJO  
Haliotis rufescens Swainson, 1822 A PARTIR DE ANÁLISIS DE PROGENIES TRIPLOIDES"  
al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: avila04@cibnor.mx pcruz@cibnor.mx ffgarcia@ipn.mx  
Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

ING. SUSANA ÁVILA ÁLVAREZ

*nombre y firma*

## INDICE

GLOSARIO.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABLAS.....	viii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. ANTECEDENTES.....	9
3. JUSTIFICACIÓN.....	12
4. OBJETIVOS.....	13
4.1 <i>Objetivo general</i> .....	13
4.2 <i>Objetivos específicos</i> .....	13
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
5.1 <i>Grupos experimentales</i> .....	14
5.2 <i>Obtención de ADN</i> .....	14
5.3 <i>Estandarización de la amplificación por PCR de microsatélites</i> .....	15
5.4 <i>Genotipificación de progenitores</i> .....	18
5.5 <i>Análisis de segregación mendeliana</i> .....	19
5.6 <i>Análisis de frecuencias de recombinación</i> .....	19

5.7	<i>Estimación de las distancias al centrómero.....</i>	20
6.	RESULTADOS.....	22
6.1	<i>Estandarización por PCR de microsatélites.....</i>	22
6.2	<i>Familias informativas.....</i>	22
6.3	<i>Análisis de segregación a partir de individuos diploides.....</i>	23
6.4	<i>Análisis de frecuencias de recombinación (y) del locus al centrómero a partir de individuos triploides.....</i>	26
6.5	<i>Estimación de la distancia genética (locus al centrómero).....</i>	29
7.	DISCUSIÓN.....	32
7.1	<i>Amplificación cruzada y estandarización.....</i>	32
7.2	<i>Familias informativas.....</i>	34
7.3	<i>Análisis de segregación mendeliana.....</i>	36
7.4	<i>Análisis de frecuencias de recombinación (y) del locus al centrómero.</i>	37
7.5	<i>Estimación de la distancia genética (locus al centrómero).....</i>	42
8.	CONCLUSIONES.....	45
9.	RECOMENDACIONES.....	47
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	48
	APÉNDICES.....	57

## **GLOSARIO**

**ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (ADN):** Sustancia química que constituye a los genes. A lo largo de los cromosomas, el ADN se organiza en una cadena doble (doble hélice) de nucleótidos unidos.

**ALELO:** Una de las dos (o más) formas de un gen que existe en un mismo lugar ó locus en el cromosoma y que resulta en un fenotipo diferente.

**ALOTRIPLOIDE:** Organismos híbridos que fueron triploidizados.

**ALOZIMAS:** Formas alternativas de una enzima codificada por diferentes alelos del mismo locus.

**CENTRÓMERO:** Es la región de construcción primaria en los cromosomas que se asocia con las fibras del huso durante la mitosis y la meiosis. Es el sitio en donde las cromátidas hermanas se unen durante la mitosis y meiosis.

**CITOGENÉTICA:** Campo de la genética que comprende el estudio de la estructura y función de la célula, especialmente los cromosomas. Incluye análisis de bandeo G en cromosomas, otras técnicas de bandeo citogenético, y también la citogenética molecular del tipo de hibridación por fluorescencia *in situ* (FISH).

**CROMÁTIDA:** Cada una de las dos subunidades longitudinales (hebras) que se hacen visibles durante la mitosis o la meiosis en todos los cromosomas duplicados. El entrecruzamiento se lleva a cabo entre las cromátidas de los cromosomas homólogos.

**CROMOSOMA:** Componente de las células localizado en el núcleo que contiene la información genética (ácido desoxiribonucleico, ADN) necesaria para transmitir las características de una generación a la próxima.

**CROMOSOMAS HOMÓLOGOS:** Par de cromosomas heredados, uno del padre y otro de la madre que se dicen idénticos con respecto a los loci que contienen y a su estructura visible.

**CUERPOS POLARES:** Las células más pequeñas que se producen durante la meiosis en la oogénesis y que no originan óvulos funcionales.

**DIPLOIDE:** Las células diploides son las que tienen un número doble de cromosomas, a diferencia de un gameto, es decir, poseen dos series de cromosomas.

**DISTANCIA GENÉTICA:** Se define como el valor de la fracción de recombinación en tanto por cien y la unidad que se emplea para medirla es el centimorgan (cM), de manera que un centimorgan equivale a 1% de recombinación.

**ENTRECRUZAMIENTO (CROSSING-OVER):** Intercambio de grupos de genes entre los dos cromosomas homólogos. El entrecruzamiento incrementa la variación genética en la población.

**FENOTIPO:** Las propiedades observables de una célula u organismo, determinadas por el genotipo y el medio ambiente.

**FRECUENCIA DE RECOMBINACIÓN:** Cociente de individuos recombinantes encontrados para un marcador genético en una generación dividido por el número total de individuos de esa generación. Se utiliza para estimar la distancia genética entre dos loci o entre un locus dado y el centrómero

**GAMETO:** Célula que posee la mitad del número de cromosomas característicos de la especie, tales como un óvulo maduro o un espermatozoide, capaces de fertilizar o producir un embrión.

**GEN:** Unidad fundamental de la herencia que lleva la información genética de una generación a la otra. Los genes están hechos de ácido desoxiribonucleico y se encuentran localizados a lo largo de los cromosomas.

**GENÉTICA:** Rama de la biología en la que se estudia la herencia y variación de los caracteres, así como la estructura y función del material genético (ADN).

**GENOTIPIFICACIÓN:** Es reconocer y asignar a cada individuo los alelos que conforman el genotipo para un locus dado. Cada genotipo, se denota por los dos alelos presentes, que pueden ser diferentes en el caso de un heterocigoto, o similares en el caso de un homocigoto. En el caso de los loci microsatélite, cada alelo se denota como el tamaño en pares de bases (tres dígitos), y el genotipo como los dos alelos presentes separados por una diagonal.

**GENOTIPO:** Suma total de la información genética contenida en un organismo.

**GINOGÉNESIS:** Desarrollo de un embrión exclusivamente a partir de células femeninas. Fenómeno donde los espermatozoides penetran en el citoplasma del óvulo, pero no realizan jamás la amfimixia; su misión se limita a activar el huevo que, producirá una larva de tipo materno.

**HETEROCIGOTICO:** Un individuo diploide o poliploide que ha heredado diferentes alelos en uno o más de sus loci.

**HOMOCIGOTICO:** Un individuo que ha heredado el mismo alelo de ambos padres para un determinado locus.

**INTERFERENCIA GENÉTICA:** Medida del grado en que un entrecruzamiento de una cromátida afecta a la probabilidad de un segundo entrecruzamiento de la misma cromátida. La interferencia positiva (negativa) indica que un entrecruzamiento disminuye (aumenta) la probabilidad de un segundo entrecruzamiento.

**LIGAMIENTO GENÉTICO:** Comportamiento de un grupo de genes o fragmentos de ADN que segregan siempre juntos.

**LOCUS:** La posición que un gen tiene en un cromosoma o segmento de ADN genómico. Se aplica el término para referirse a genes o marcadores moleculares aún cuando no se conozca su lugar en el genoma.

**LOCI:** Plural de locus.

**MAPA DE LIGAMIENTO (GENÉTICO):** Mapa cromosómico que muestra el orden lineal de los genes o fragmentos de ADN asociados con el cromosoma. Se establecen distancias genéticas entre los mismos a partir de la frecuencia de recombinación entre ellos.

**MAPEO DEL GEN (LOCUS) AL CENTRÓMERO:** Es un método directo para analizar la distancia relativa de marcadores genéticos desde su ubicación en algún lugar del cromosoma al centrómero del mismo.

**MARCADOR MOLECULAR:** Genes, proteínas o fragmentos de ADN polimórficos que permiten distinguir entre individuos, familias, poblaciones o especies.

**MAS** (Del inglés **Marker Assisted Selection**): Selección asistida por marcadores moleculares. Estrategia de selección que se basa en la aplicación de marcadores moleculares relacionados a la característica comercial de interés.

**MEJORAMIENTO GENÉTICO:** Es la explotación o manipulación de la variación genética presente en una especie, para generar ganancia productiva en el cultivo de ésta.

**MEIOSIS:** Tipo de división celular que produce las células reproductivas haploides (espermatozoides y óvulos), y que contienen la mitad de los cromosomas que se encuentran en otras células del cuerpo.

**MITOSIS:** Tipo de división celular que se presenta durante el crecimiento y produce células genéticamente idénticas que contienen el mismo número de cromosomas que las células progenitoras.

**MICROSATÉLITE:** Regiones de ADN con secuencias cortas de uno a seis pares de bases (pb) repetidas en tandem, es decir la misma secuencia una tras otra, llegando a medir toda la región hasta 100 pb.

**MUTACIÓN:** Cambio en la secuencia del ADN que rara vez se ve reflejada en el fenotipo, pero que puede tener efectos drásticos (algunas veces letales).

**PCR** (Del inglés **Polimerase Chain Reaction**): Reacción en cadena de la polimerasa. Técnica con la que se copian simultáneamente *in vitro* las hebras complementarias de una molécula de ADN blanco, a través de una serie de ciclos, que incluyen una desnaturalización del ADN, alineamiento de iniciadores y extensión (síntesis) mediante una polimerasa (comúnmente Taq polimerasa).

**POISSON (DISTRIBUCIÓN):** Es una distribución de probabilidad discreta. Expresa la probabilidad de un número  $k$  de eventos ocurriendo en un tiempo fijo si estos eventos ocurren con una frecuencia media conocida y son independientes del tiempo transcurrido desde el último evento.

**POLIPLOIDÍA:** En genética, se define como la variación o cambio en el número cromosómico característico de una especie. Tales cambios pueden ser de dos tipos: aquellos que involucran dotaciones completas de cromosomas (euploidía) y aquellos cambios que sólo implican a uno o más cromosomas aislados dentro de una dotación cromosómica (aneuploidía).

**PRIMER (INICIADOR):** Oligonucleótido (alrededor de 20 pb) de una sola hebra que se alinea (homóloga) para iniciar la replicación del ADN mediante una polimerasa. Se requieren dos *primers* (uno para cada hebra de ADN), los cuales flanquearán la región por amplificar.

**PROFASE:** Primera etapa de la meiosis y mitosis. Esta caracterizada por el enrollamiento de los cromosomas que se hacen visibles al microscopio. En la meiosis es durante esta etapa, la cual se subdivide en cinco etapas, donde se lleva a cabo la recombinación.

**PROGENIE:** La nueva generación, la descendencia.

**QTL** (Del inglés **Quantitative Trait Loci**): Loci de caracteres cuantitativos. Marcador molecular (ya sea un gen o un fragmento de ADN) que se encuentra estrechamente asociado con una característica cuantitativa, por ejemplo mayor crecimiento.

**QUIASMA**: Punto donde se lleva a cabo el entrecruzamiento entre las cromátidas no hermanas.

**RECOMBINACIÓN GENÉTICA**: Intercambio de fragmentos de ADN entre las cromátidas no hermanas, producto del entrecruzamiento que se lleva a cabo durante la profase de la primera meiosis.

**SEGREGACIÓN MENDELIANA**: Primera ley de Mendel. En la formación de los gametos, los cromosomas homólogos se separan (segregan) al azar, de forma que cada gameto recibe uno u otro con igual probabilidad.

**TETRADA**: Las cuatro cromátidas (dos por cada cromosoma homólogo de un bivalente) que están en sinapsis durante la primera división meiótica.

**TRIPLOIDE**: Organismo que cuenta con tres juegos de cromosomas, dos heredados generalmente de la madre y el tercero del padre.

**VARIACIÓN (GENÉTICA)**: Número de genotipos posibles considerando todos los alelos existentes para un gen en particular en una muestra poblacional.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema del proceso de recombinación.....	7
Figura 2.	Mecanismo de inducción a la triploidía en moluscos .....	8
Figura 3.	Representación gráfica de alelos separados mediante electroforesis provenientes de organismos triploides con un marcador tipo microsatélite.....	9

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Tamaño de muestra empleado para la obtención de ADN.....	17
Tabla 2.	Microsatélites identificados en diversas especies de abulones del Océano Pacífico.....	18
Tabla 3.	Loci polimórficos y condiciones de amplificación .....	24
Tabla 4.	Genotipos de progenitores y relación de familias informativas en donde la hembra es heterocigota y con alelos diferentes a los del macho .....	25
Tabla 5.	Análisis de segregación en familias diploides.....	26
Tabla 6.	Frecuencias de recombinación entre el microsatélite y el centrómero y proporción de homocigotos .....	29
Tabla 7.	Tablas de contingencia (r x c) para pruebas de homogeneidad.....	30
Tabla 8.	Distancia genética del microsatélite al centrómero, en los loci donde hubo homogeneidad de $y$ entre al menos dos familias.....	32
Tabla 9.	Distancia genética del microsatélite al centrómero en los loci donde solamente se evaluó una familia o hubo heterogeneidad entre familias.....	33

## RESUMEN

A partir de cinco familias triploides de abulón rojo se determinó la distancia al centrómero de 10 loci microsatélites mediante los valores de las frecuencias de recombinación. Como primer paso se estandarizaron los microsatélites para elegir aquellos con alto polimorfismo y con ellos poder determinar las familias que fueran informativas para cada loci; esto es, donde la hembra fuera heterocigota y no compartiera alelos con el macho. Para verificar el ajuste de los loci a una herencia mendeliana se procedió a realizar un análisis de segregación con una prueba de  $\chi^2$  utilizando 30 larvas diploides de cada una de las familias informativas. Todos los loci tuvieron herencia mendeliana ( $P > 0.05$ ). Dos loci (*Hka56* y *Hka85*) presentaron alelos nulos en el macho, sin verse afectados los análisis posteriores, una vez detectados. Con las familias triploides se realizó el análisis de frecuencias de recombinación para cada locus, para lo cual se utilizaron 60 larvas de cada familia que fue informativa. El rango en los valores de frecuencias de recombinación fue de 0.01, la más baja para el microsatélite *Hka3*, y el valor más alto estimado fue de 0.41 para los loci *Hco97* y *Hka28*. La familia 4 presentó muy bajas frecuencias de recombinación ( $y = 0.05$  a  $0.15$ ) en todos los loci analizados. Se aplicó una prueba  $\chi^2$  ( $P > 0.05$ ) a organismos homocigotos para verificar si la segregación se encontraba en la misma proporción (1:1). Solamente la familia 5 en el microsatélite *Hka80* presentó una desviación significativa ( $P = 0.01$ ). Antes de estimar las distancias al centrómero se hizo una prueba de homogeneidad utilizando tablas de contingencia  $r \times c$ , para las frecuencias de recombinación de un mismo locus entre las familias informativas. De los 10 loci revisados se encontró homogeneidad en seis (*Hka3*, *Hka40*, *Hka56*, *Hka65*, *Hka80* y *Hco97*). Las distancias genéticas se estimaron entre 0.5 y 28.5 cM suponiendo completa interferencia, entre 0.5 y 32.3 cM suponiendo un 50% de interferencia, y entre 0.5 y 42.2 cM suponiendo cero interferencia. Los loci *Hdd229* y *Hka28* no presentaron homogeneidad entre las familias informativas por lo que se sugiere que se encuentran ubicados en lugares en el cromosoma donde hay mucha variación en la frecuencia de recombinación.

## ABSTRACT

Distance to the centromere was estimated in five families of triploid red abalone analyzing the recombination frequencies of 10 microsatellite loci. First, microsatellites highly polymorphic were chosen and informative families were determined; those where the females were heterozygous and not shared alleles with the male. For each microsatellite loci, in order to verify the adjustment to Mendelian inheritance a segregation analysis was carried out with a  $\chi^2$  Test using 30 diploid larvae from each informative family. In this study all loci were in agreement to Mendelian inheritance expectations ( $P > 0.05$ ). Although two loci (*Hka85* and *Hka56*) showed null alleles it did not affect the analysis since null alleles were seen in the male. Then, triploid families were used to calculate recombination frequencies, using 60 larvae from each family and microsatellite combination. The recombination frequencies ranged from 0.01 for the *Hka3* locus to 0.41 for the *Hka28* locus. Family 4 had a very low recombination frequency ( $r = 0.05$  to  $0.15$ ) in all loci analyzed, indicating that the female parent has a low recombination rate.  $\chi^2$  Test was applied to verify the expected 1:1 segregation of homozygous for alternative female alleles, and only in the family 5 with the microsatellite *Hka80* there was a significant deviation ( $P=0.01$ ). A homogeneity test of recombination rates for each locus in the different families was carry on using  $r \times c$ , contingency tables. Six from ten loci, had homogeneous recombination rates (*Hka3*, *Hka40*, *Hka56*, *Hka65*, *Hka80* and *Hco97*) in the informative families evaluated. Genetic distances ranged between 0.5 and 28.5 cM assuming complete interference, between 0.5 to 32.3 cM with 50% interference, and between 0.5 and 42.2 cM assuming zero interference. The heterogeneity observed at *Hka28* and *Hdd229* may indicate that both loci are in a region with variable recombination rates at chromosome.

## 1. INTRODUCCIÓN

El abulón es un recurso pesquero de gran importancia en las costas de Baja California. A partir de los años 80's, la captura de estas especies se colapsó debido a la sobre explotación, a los malos manejos del recurso y a los cambios ambientales ocurridos a gran escala (Ponce-Díaz *et al.*, 1998). Las especies que se explotan comercialmente son *Haliotis rufescens*, *H. cracherodii*, *H. fulgens*, *H. sorenseni* y *H. corrugata*. El abulón rojo (*H. rufescens*) es la especie más cultivada (Ponce-Díaz, 2003).

Los abulones son gasterópodos marinos, distribuidos mundialmente en los océanos Pacífico, Atlántico e Índico; se han reportado 130 especies y subespecies, todas dentro del género *Haliotis*. Estos moluscos viven adheridos a los fondos rocosos de aguas templadas, desde la zona intermareal hasta profundidades de 50 m. Después que acaban con las reservas de vitelo se alimentan de diatomeas bentónicas, esto sucede después del asentamiento, cambiando paulatinamente a macroalgas. Son organismos dioicos y de reproducción externa. Llegan a vivir de 15 a 60 años dependiendo de la especie. Son de hábitos nocturnos (Ponce-Díaz, 2003).

Para obtener una producción adecuada del recurso y permitir que las poblaciones silvestres puedan recuperarse, la acuicultura está siendo una alternativa viable (Ramírez, 1992). Uno de los inconvenientes del cultivo, es la baja tasa de crecimiento que presentan los individuos ya que tardan de tres a cinco años en alcanzar la talla comercial (McBride, 1998). Por tal motivo, una alternativa que la industria de la acuicultura está aplicando para mejorar características de interés comercial (ej. el aumento en la tasa de crecimiento), es el mejoramiento genético. La implementación de programas de mejoramiento genético en acuicultura incluye diferentes estrategias como: programas de selección, cruzamiento interpoblacional e hibridación, manipulación cromosómica (ploidias), reversión sexual, producción de organismos uniparentales (partenogénéticos), manipulación de genes (transgénicos),

marcadores genéticos, mapeo genético, QTL's y selección asistida por marcadores moleculares, entre otros (Hulata, 2001).

El desarrollo de técnicas moleculares, que van desde la extracción del ADN y la amplificación del mismo a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa, hasta el uso de la secuenciación automatizada y la implementación de paquetes estadísticos, ha permitido la identificación de un gran número de marcadores moleculares (proteínas, genes o fragmentos de ADN), que permiten diferenciar entre individuos, familias, poblaciones, especie o grupos taxonómicos de mayor jerarquía. Uno de los tipos de marcadores moleculares son los llamados microsátélites, los cuales son regiones de ADN con secuencias cortas (1 a 6 pb) repetidas varias veces en tandem. Se encuentran ampliamente distribuidos en el genoma nuclear, son codominantes y altamente polimórficos (Schlotterer & Harr, 2001). Por estas características, en la actualidad están siendo ampliamente utilizados como marcadores genéticos.

Un programa de selección tiene como propósito mejorar la producción de una característica a través de la elección de los individuos que en la población presentan los más altos valores de la característica sujeta a selección y emplearlos como progenitores de la siguiente generación (Gjedrem & Thodesen, 2005).

Una estrategia dentro de los programas de mejoramiento genético es la selección asistida por marcadores (MAS). En esta estrategia se pretende que los organismos en los primeros estadios de vida sean seleccionados en base a un marcador molecular que esté relacionado con un mejor desempeño de una característica dada. La ventaja de la MAS comparada con la selección tradicional es que no será necesario cultivar a los organismos hasta tallas adultas para verificar si tendrán o no un buen desempeño. La selección de individuos podrá realizarse desde las primeras etapas de vida mediante análisis de ADN (Dunham, 2004).

Una de las bases primordiales para la detección de QTL's y la aplicación de MAS es el desarrollo de mapas de ligamiento genético de la especie en estudio. Cuanto más cerca se encuentren estos genes en un cromosoma, existirá una menor posibilidad

de que se forme un quiasma entre ellos, por lo que, genes estrechamente ligados se heredarán juntos. Al conjunto de loci situados en un mismo cromosoma se le llama grupo de ligamiento. Por lo tanto un organismo tiene tantos grupos de ligamiento como dotaciones cromosómicas haploides (Dunham, 2004).

La frecuencia de recombinación y la distancia genética son las bases para la identificación de grupos de ligamiento. En organismos diploides con reproducción sexual, el proceso de formación de gametos haploides contempla tres procesos importantes en el mismo: la replicación, la recombinación y la segregación de los cromosomas (Ayala & Kiger, 1984). La recombinación genética, consiste en que una de las copias idénticas y ancladas de cada cromosoma (cromátida) es intercambiada con una de las dos copias idénticas de su cromosoma homólogo (Fig. 1). La frecuencia de recombinación entre cromátidas no hermanas, y específicamente la frecuencia de recombinación de genes específicos contenidos en los fragmentos intercambiados, dependerá de la distancia física a la que se encuentran del centrómero (el 'ancla' entre cromátidas hermanas): entre más alejados estén del mismo, mayor será la probabilidad de recombinación y viceversa (Ott, 1999). Dicho de otra forma la frecuencia de recombinación mide la probabilidad de intercambio genético.

De esta forma la frecuencia de recombinación es un parámetro genético, de mapeo genético, que se emplea como indicador cuantitativo de la distancia que existe entre dos genes o loci. Su unidad es la unidad de mapa genético (u.m.) o centimorgan (cM), en honor de Tomas Hunt Morgan (1866-1945). Un centimorgan equivale a un 1%, lo que quiere decir que 1 de cada 100 productos meióticos es recombinante, por lo que en este caso la distancia genética entre dos loci o genes sería de 0.01 cM, recordando que la frecuencia de recombinación es proporcional a la distancia entre los genes o loci (Klug & Cummings, 2003).

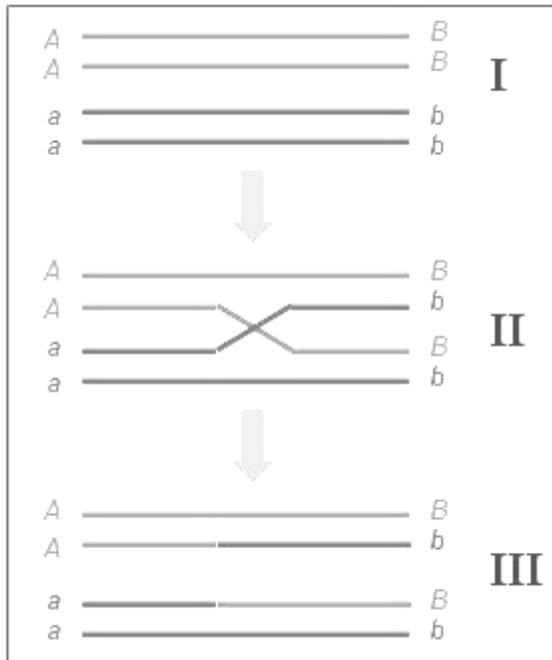


Figura 1. Esquema del proceso de recombinación. I) Cromosomas homólogos, replicados (4 cromátidas); II) Recombinación entre cromátidas no hermanas; III) Cromosomas recombinantes (*Ab*, *aB*).

Por otra parte, la triploidía es una técnica de manipulación genética a través de la cual es posible producir individuos con una carga cromosómica extra, los cuales pueden ser individuos de mayor peso corporal o mayor eficacia biológica y por ello son de interés en la acuicultura. En moluscos, la triploidía es inducida aprovechando el hecho de que el ovocito liberado está detenido en metafase II de la gametogénesis y cuenta con dos copias de cada cromosoma (Fig. 2). Los cromosomas homólogos encontrados en esos ovocitos son copias exactas, excepto en aquellos segmentos en donde previamente ocurrió el intercambio genético. En la meiosis el ovocito sufre dos divisiones, resultando en la liberación de dos cuerpos polares, esto es hay dos reducciones cromosómicas (Fig. 2). De impedir la segunda reducción cromosómica en este ovocito, se formará un cigoto que contará con tres juegos de cromosomas, dos de la madre y uno del padre, lo que originará un individuo triploide. Los cromosomas heredados de la madre portarán la misma forma alélica en todos sus genes en ambos cromosomas, excepto cuando haya existido recombinación entre

cromátidas hermanas, y los cromosomas homólogos hayan portado diferentes formas alélicas, esto es, si la madre era heterocigota (Beaumont & Hoare, 2003).

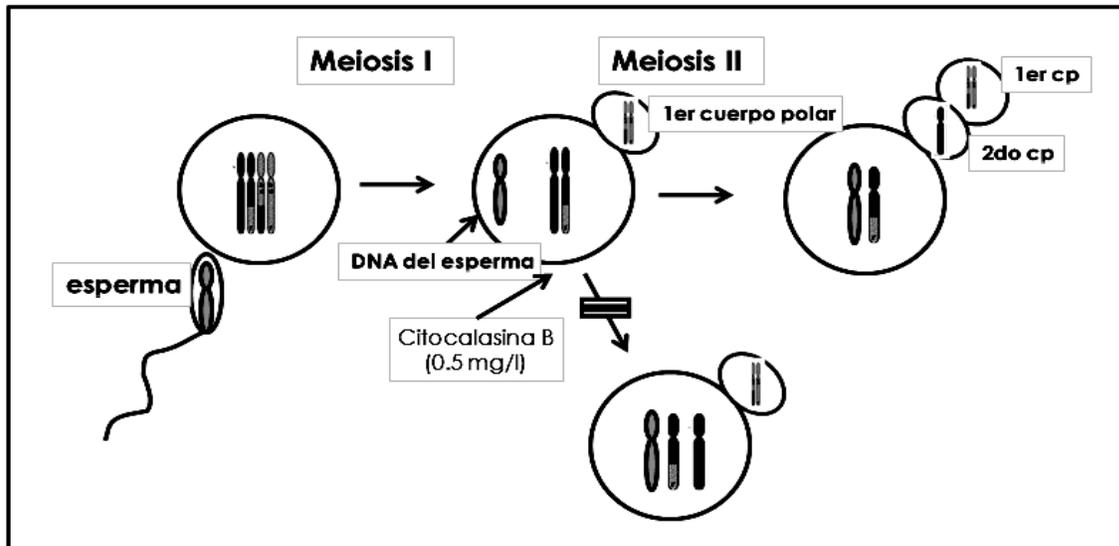


Figura 2. Mecanismo de inducción a la triploidía en moluscos.

De esta manera, cuando la madre es heterocigota para el locus microsatélite evaluado, y el padre presenta alelos diferentes a los de la madre, es posible determinar en su progenie cuantos organismos portan los dos alelos diferentes de la madre (genotipos recombinantes) y cuantos dos copias de un mismo alelo (genotipos no recombinantes). Es precisamente la proporción de organismos con los genotipos recombinantes, la que permite determinar la frecuencia de recombinación para cualquier loci (Fig. 3) (Nomura *et al.*, 2006; Hubert *et al.*, 2009).

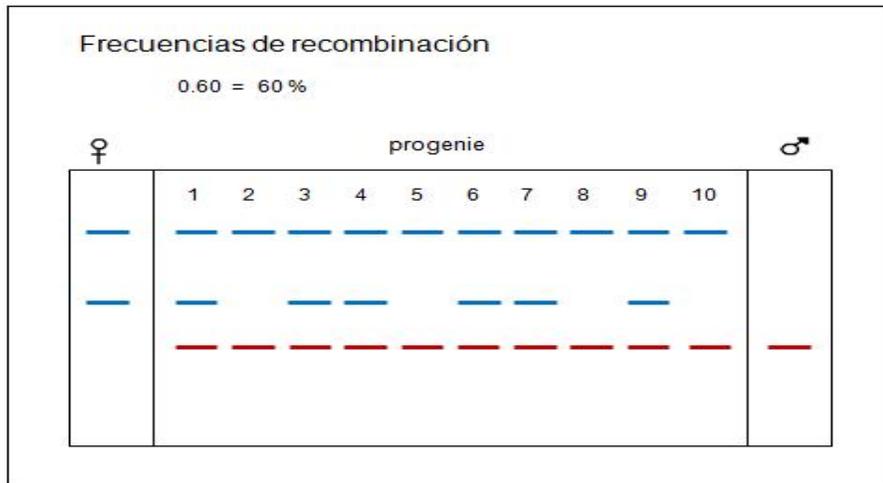


Figura 3. Representación gráfica de alelos separados mediante electroforesis provenientes de organismos triploides con un marcador tipo microsatélite. Cada una de las columnas representa un organismo diferente. Las bandas observadas en el diagrama representan los dos alelos de la madre (azules) y el alelo del padre (rojo).

El propósito de este trabajo fue estimar las distancias genéticas del locus al centrómero de diez loci microsatélites. Se estimaron a partir de las frecuencias de recombinación de los loci microsatélites. Para este propósito se utilizaron larvas triploides de cinco familias de abulón rojo.

El conocer las frecuencias de recombinación y la distancia al centrómero de éstos loci microsatélites generará conocimiento básico no existente sobre la tasa de recombinación en *H. rufescens*, lo cual tendrá aplicaciones futuras en los estudios asociados a mapas genéticos de ligamiento, y con los que se puede conocer si genes que se encuentran en el mismo cromosoma se segregan juntos, esto es, se encuentran ligados y se heredan siempre juntos (Klug & Cummings, 2003). Además, este conocimiento tendrá una aplicación inmediata de los marcadores con alta frecuencia de recombinación en la certificación de organismos alotriploides (híbridos triploides).

## 2. ANTECEDENTES

Uno de los primeros organismos donde se pudo detectar de forma directa la recombinación genética fue el hongo *Neurospora*. Estos organismos producen esporas agrupadas en una estructura reproductiva (ascus). El orden que presentan las esporas en el ascus es el resultado de la segregación de la segunda meiosis, por lo que permite observar si hubo recombinación (Whitehouse, 1942). Por otra parte, en *Drosophila melanogaster*, se estableció que entre las cromátidas hermanas no se da la recombinación y que el entrecruzamiento entre las cromátidas no hermanas se da al azar (Beadle y Emerson, 1935; Welshons, 1955).

El mapeo del gen al centrómero (o mitad de las tétradas) es un método directo para analizar la distancia relativa de marcadores genéticos desde su ubicación en algún lugar del cromosoma, al centrómero del mismo (Danzmann & Gharbi, 2001). La distancia genética entre un locus dado y el centrómero puede ser fácilmente estimada por la medición de la frecuencia de segregación de la segunda división meiótica (la frecuencia de recombinación  $y$ ) de organismos ginogenéticos o triploides (Morishima *et al*, 2001). Como los organismos ginogenéticos y triploides cuentan con dos copias del genoma de la madre, entonces si la progenitora fue heterocigota (dos alelos diferentes) para un locus dado, es posible determinar la frecuencia de recombinación para ese locus. Si hubo recombinación se detectan los dos alelos, y si no hubo recombinación solamente se detecta un alelo.

Es importante considerar que el entrecruzamiento genético toma lugar entre cuatro cromatidas (hebras). Por lo que hay dos aspectos relevantes en la recombinación, la distribución de los entrecruzamientos a lo largo del paquete de las cuatro cromátidas y qué par de cromátidas no hermanas están involucradas en cada entrecruzamiento (McPeck & Speed, 1995). Al respecto, se debe considerar cuando se hace mapeo del gen al centrómero, el grado de interferencia genética; en este caso interferencia de entrecruzamiento (también conocida como interferencia de quiasmas). El fenómeno de interferencia es definido como la ubicación no azarosa de quiasmas

entre cromátidas (Broman & Weber, 2000), en otras palabras, se refiere al hecho de que la ocurrencia de un entrecruzamiento impide que otro se lleve a cabo en la misma región.

Diferentes funciones de mapa se han generado para estimar la distancia genética en base a las frecuencias de recombinación, considerando diferentes grados de interferencia. La función de Haldane asume que la interferencia entre entrecruzamientos es cero y que se distribuyen como una variable de Poisson (Haldane, 1919). La función de Kosambi, asume que la interferencia disminuye con la distancia (Kosambi, 1944) y la función que asume completa interferencia, solo un intercambio genético ocurre entre dos cromátidas (Thorgaard *et al.*, 1983).

En animales acuáticos, estimaciones de la distancia del gen al centrómero han sido obtenidas para loci de alozimas en varias especies de peces, utilizando organismos ginogenéticos. En todos los casos se asume completa interferencia, de manera casi general en peces se adopta esta función bajo el argumento del tamaño reducido de los cromosomas de los peces y que en algunos casos ha sido soportado con análisis citogenéticos (Thorgaard *et al.*, 1983; Allendorf *et al.*, 1986; Liu *et al.*, 1992; Matsuoka *et al.*, 2004). Estimaciones de la distancia de marcadores moleculares tipo microsatélites también se han estimado en peces, con familias ginogenéticas (Linder *et al.*, 2000; Morishima *et al.*, 2001; Lahrech *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2008; Morishima *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008); y tan solo en un caso con familias triploides (Nomura *et al.*, 2006).

Entre las especies de crustáceos, al camarón chino *Fenneropenaeus chinensis* se le ha elaborado un mapa genético. Wang *et al.* (2008), utilizando nueve familias triploides de esta especie y 12 loci microsatélites, encontraron frecuencias de recombinación entre 19 y 63%. La distancia genética fue calculada bajo los tres supuestos de interferencia; para completa interferencia reportan una distancia genética de 9.6 a 37 cM; asumiendo 50% de interferencia de 9.7 a 47.5 cM, y con cero interferencia de 10.6 a 67.4 cM.

En moluscos, el ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* es la especie donde se han realizado más este tipo de estudios. Guo y Gaffney (1993), a partir de tres familias de organismos ginogenéticos y doce alozimas polimórficas, reportan un valor promedio de recombinación de 0.74. Li y Kijima (2006) con cinco familias ginogenéticas de *C. gigas* analizaron ocho loci microsátélites y reportan un intervalo de 0.62 a 0.77 en la frecuencia de recombinación. La distancia genética entre los loci microsátélite y el centrómero que ellos estiman se basó en los tres supuestos de interferencia: bajo completa interferencia de 31 a 39 cM; 50% de interferencia de 36 a 51 cM y con cero interferencia de 48 a 73 cM. Hubert *et al.*, (2009) reportan también para el ostión del Pacífico la distancia genética de 56 loci microsátélites a partir de siete familias triploides, basándose en grupos de ligamiento previamente reportados por Hubert y Hedgecock (2004).

Otra especie de molusco donde se han reportado resultados sobre la recombinación genética, es la almeja *Chlamys farreri*. Li *et al.* (2009), utilizando tres familias ginogenéticas, examinaron 27 loci microsátélites y obtuvieron frecuencias de recombinación de entre 0.05 y 0.78, sugiriendo la existencia de interferencia positiva después de la formación de un solo quiasma. Ellos calculan la distancia genética bajo el supuesto de interferencia completa, en el rango de 3 a 39 cM.

Específicamente para especies de abulón, Fujino *et al.* (1992) analizaron cuatro loci de alozimas en *Haliotis diversicolor diversicolor* y diez loci de alozimas en *H. discus hannai* empleando familias triploides. El rango en las frecuencias de recombinación para *H. diversicolor diversicolor* fue de 0.08 a 0.361 y de 0.016 a 0.396 para *H. discus hannai*. Li y Kijima (2005), estimaron las frecuencias de recombinación para nueve loci microsátélites entre 0.10 y 0.60 en *H. discus discus*, con tres familias ginogenéticas. La distancia entre los loci microsátélites y el centrómero lo calcularon de acuerdo con los tres supuestos de interferencia. Para interferencia completa reportan distancias de entre 5 y 30 cM; considerando 50% de interferencia de 5 a 35 cM y valores de 5 a 46 cM considerando cero interferencia.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El cultivo de abulón se tiene controlado en todas las etapas del ciclo de vida. De esta manera es posible enmarcar estudios de acuerdo con la tendencia de investigación actual, cuyo enfoque es el de mejorar características biológicas de interés comercial. Una alternativa para tal fin es el mejoramiento genético a través de la identificación, y aplicación de marcadores asociados a características productivas (QTL's), para proseguir con programas asistidos por marcadores moleculares (MAS). Para tal finalidad, es necesario generar el conocimiento básico del abulón rojo *Haliotis rufescens* relativo a las frecuencias de recombinación de un conjunto de microsatélites. Esta información será relevante para determinar la distancia de los loci microsatélites al centrómero del cromosoma. Las frecuencias de recombinación y la distancia al centrómero (en este caso de loci microsatélites) sustentan las bases que permitirán construir un mapa genético de ligamiento, que a su vez ayudará a la identificación de QTL's.

En el año 2004, en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) se empezó a desarrollar un proyecto de poliploidización e hibridación de especies de abulón (CONACYT 38860-B, A.M. Ibarra). Como parte de este proyecto se produjeron individuos diploides y triploides de abulón rojo como control de los grupos híbridos y alotriploides de abulón azul y rojo que se produjeron (Hernández-Ibarra, 2008). Debido a las bajas frecuencias de recombinación no se pudieron certificar a los organismos como alotriploides con los microsatélites utilizados en ese momento. Esto generó la necesidad de estudiar las frecuencias de recombinación de loci microsatélites en hembras de abulón rojo (CONACyT 52191, P. Cruz). Por tanto, es necesario definir cuales marcadores microsatélites presentan las mayores frecuencias de recombinación y poderlos aplicar en la certificación de organismos alotriploides (híbridos triploides).

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 *Objetivo general*

Aportar información básica relativa a las frecuencias de recombinación y distancia al centrómero para múltiples loci microsatélites de abulón rojo, con la intención de sentar las bases para la elaboración de mapas genéticos y el diseño futuro de QTL's.

### 4.2 *Objetivos específicos*

1. Estandarizar la amplificación cruzada de microsatélites previamente reportados para especies del género *Haliotis* del Océano Pacífico en el abulón rojo (*Haliotis rufescens*).
2. Determinar los loci microsatélites de más elevado polimorfismo a partir del análisis de los organismos progenitores.
3. Determinar las familias informativas para los diferentes microsatélites polimórficos, en donde la hembra progenitora sea heterocigota y además se observe un ajuste a la herencia mendeliana.
4. Conocer las frecuencias de recombinación alélica ( $y$ ) en los loci de microsatélites polimórficos, así como la homogeneidad de este estimador por locus entre familias.
5. Estimar la distancia al centrómero de cada uno de los loci microsatélites, aplicando los tres modelos que existen en base al grado de interferencia.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Grupos experimentales**

Se trabajó con familias diploides y triploides de abulón rojo, previamente generadas en un Proyecto de poliploidización e hibridación de especies de abulón (CONACYT 38860-B, A.M. Ibarra).

Como parte de dicho Proyecto se generaron cinco familias, cada una resultante de la cruce por separado de una hembra con el esperma de dos machos (Hernández-Ibarra, 2008). Una parte de las larvas de cada familia se indujo a la triploidía por lo que se generaron cinco grupos triploides y cinco diploides.

Todas las familias generadas, así como los progenitores fueron muestreados y preservados en tubos para microcentrífuga de 1.6 ml con alcohol al 70 % y mantenidos en refrigeración (8-10°C) para la posterior obtención de ADN (tentáculos del epipodio en progenitores, y en el caso de las progenes larvas veliger).

### **5.2 Obtención de ADN**

Para la obtención del ADN se siguió el método reportado por Selvamani *et al.* (2001) y modificado por Morelos-Castro (2008).

Los progenitores empleados en este trabajo fueron seis organismos (las cinco hembras y uno de los machos). Solamente fue considerado un macho debido a que este individuo fue el único que contribuyó con la progenie (ver Morelos-Castro, 2008). Se utilizó un fragmento del tentáculo de aproximadamente 300 µm (micras) de cada uno de los seis progenitores. En el Apéndice I se describe el procedimiento implementado para la obtención de ADN de los progenitores.

Para la obtención de ADN en larvas veliger se utilizaron 30 larvas diploides y 60 larvas triploides de cada una de las cinco familias, el procedimiento se describe en el Apéndice II.

En total se obtuvo el ADN de 456 individuos, correspondiente a un macho, cinco hembras, 150 larvas diploides y 300 larvas triploides (Tabla 1).

**Tabla 1.** Tamaño de muestra empleado para la obtención de ADN

	Familias					TOTAL
	1	2	3	4	5	
<b>PROGENITORES</b>						
Hembras	1	1	1	1	1	5
Machos	Un individuo					1
<b>PROGENIE</b>						
Larvas diploides	30	30	30	30	30	150
Larvas triploides	60	60	60	60	60	300
						456

### 5.3 Estandarización de la amplificación por PCR de microsatélites

Se evaluó la amplificación cruzada de 35 loci microsatélites previamente identificados en otras especies de abulón del Océano Pacífico y también se probó la amplificación del único microsatélite reportado de abulón rojo (Kirby *et al.*, 1998) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Microsatélites identificados en diversas especies de abulones del Océano Pacífico que fueron evaluados en el presente estudio para la amplificación en abulón rojo.

Especie	loci	Secuencia de primers	Referencia
<i>Haliotis rufescens</i>	<i>Hruf200</i>	F:GAGATAGTTCGATTCAAGAT R:CCATTATAAAGGGCCGGACTA	Kirby <i>et al.</i> , 1998
<i>H. kamtschatkana</i>	<i>Hka3</i> *	F:GTGAGATGTTGGTGACT R:GTTTCCGTTATTCACCTCTTA	Miller <i>et al.</i> , 2001
	<i>Hka6</i>	F:CTCAAACCCAAACAAGAA R:GTTTCTGAAGGAGCGCGTCAAA	

Tabla 2. (Continuación)

<b>Especie</b>	<b>loci</b>	<b>Secuencia de primers</b>	<b>Referencia</b>
<b><i>H. kamtschatkana</i></b>	<i>Hka12</i>	F: TGATGCATGGTAAATCACTTA R: GTTTCAGTATGAAGAGGGTCTAAT	Miller <i>et al.</i> , 2001
	<i>Hka28</i> *	F: GTGGACAAGCACTCTAAA R: GTTTCGCCTGTTACGTTTTAGT	
	<i>Hka37</i>	F: GGTGTGGTTCTAAAAATAG R: GTTTCTCTGAACAAAGTGACTAAC	
	<i>Hka40</i> *	F: CCCTAACAGATATTGACAAT R: GTTTCTAGCAATATTCAAAATTACAAG	
	<i>Hka48</i>	F: CGTTAGTGGGGAAAGATA R: GTTTGCCTGATTTGTTTTGACCAA	
	<i>Hka56</i> *	F: CGATAATCGTGTGGTAAGA R: GTTTGTGGCATGGTATCTCATT	
	<i>Hka65</i>	F: GGGTTCAATTGGACACA R: GTTTACGGTTGTAAAGTACGTTATA	
	<i>Hka80</i> *	F: CCTAACTATAGACGTAGTCA R: GTTTCGACGCGATGAATGAAT	
	<i>Hka85</i>	F: TCCACGGGTAAGAAGTA R: GTTTCAGTGAGTGAGTGAGTAT	
<b><i>H. discus discus</i></b>	<i>Hdd6C</i>	F: TTTAAGACCCAACTTGTAGACATCC R: AACGCCGCCTTGATTTCGTTTGTTTGT	Sekino y Hara, 2001
	<i>Hdd108C</i>	F: ACTGTTATTCGACATCCAGTCCGG R: GGCATTGTAGAGGATCTGAGGGAGAA	
	<i>Hdd114B</i>	F: ACCTGACAGCGAAACGTTGTTCT R: TGTGACGGCGGTCTGTAAATTATCTA	
	<i>Hdd115B</i>	F: CTAAATTAATAACAGGCCGTCATTGA R: TTATGTTAAAGATCCGATCGGTTCCAG	
	<i>Hdd229</i>	F: TAGCTAAACGCAGCGAAGAAA R: AACGACCCCGTCAATTACAAC	
<b><i>H. discus hannai</i></b>	<i>Hdh78</i>	F: GTCGAAACTAGCACAAACATCT R: GATCACCGGTCACATCATA	Li <i>et al.</i> , 2002
	<i>Hdh1321</i>	F: TTCTGAGATGAGACGCACCAC R: TTGGCAGCAGGCGTCGTGT	
	<i>Hdh1457</i>	F: CACCTGTGTTTCGTACCCAC R: GGGACAATTCCAAGTAGATGC	
	<i>Hdh1761</i>	F: GTCCAACACAACCAACTCCTC R: CCTGAGCATGTTTGTGGATAAC	
<b><i>H. discus hannai</i></b>	<i>Hdh57</i>	F: ATCAGGATGGGAATGTACCTG R: CCAATGGTGCCTGTGTAATTCA	Li <i>et al.</i> , 2003
	<i>Hdh145</i>	F: TAGTTGTTGAACCTTTCTGTTG R: TAGACAAACAGAAAACCTTCACC	
	<i>Hdh512</i>	F: CCGAGATGTTTACAGAGAGA R: CACACTCGCTTTCTCACTCA	
	<i>Hdh513</i>	F: GAGACAGACTGAGTGAGAAA R: TAACATGCTTACATTCTTCCTC	
<b><i>H. fulgens</i></b>	<i>Hful369</i> *	F: TACGACCTGTGTCGCTATGG R: AACTTCAGGGATCGAAACCA	Cruz <i>et al.</i> , 2005

Tabla 2. (Continuación)

Especie	loci	Secuencia de primers	Referencia
<i>H. corrugata</i>	<i>Hco6</i>	F:CCACGCACATACCAAACACA R:AAGGAGGCAGTGGTGTCAAA	Díaz-Viloria <i>et al.</i> , 2008
	<i>Hco12</i>	F: CTGTGTTGCCCCATTTC R:GCACGTGCATGTAAGCTGTT	
	<i>Hco15</i> *	F:CTGACGCAACCTCCTATGGT R:CTTCTCAGGGCTTTCACAGG	
	<i>Hco19</i>	F:CGATCCACGCAATTGGAATA R:CACCGAGTCGTGTGAGCATA	
	<i>Hco22</i>	F:GTCTCTGTCCGATCCTCCTT R:CACAACCGTAGGCAATATCA	
	<i>Hco43</i>	F:GGTATCTCAGTGAGCTTGCAC R:CCTACAATGGACTCCGGTTT	
	<i>Hco47</i>	F:AGGCTCGCTGACTTGGTT R:CCTCAGGCCGAAAATGTTA	
	<i>Hco69a</i>	F: AGTGCAGTCGTAAAGTCTCAGC R:TGACCACAATGGGCCTTTAG	
	<i>Hco97</i> *	F:CTTCCACCCGCATTGTTC R:CGAGAGAGCGACAGAAAGAC	
	<i>Hco194</i>	F:TAAGCTCAGGCACCGAAAGT R:TCAGCCGTATAGCAACGAGA	

\* Loci microsatélite anteriormente amplificados exitosamente en abulón rojo: *Hka3*, *Hka28*, *Hka40*, *Hka56*, *Hka80* (Gruenthal *et al.*, 2007); *Hco15*, *Hco97* (Díaz-Viloria *et al.*, 2008) y *Hful369* (Morelos-Castro, 2008).

Con los microsatélites que aún no estaban estandarizados se probaron gradientes de temperatura de alineamiento y gradientes de cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) para optimizar su amplificación con la técnica de PCR. Para esta actividad se utilizó el ADN de seis abulones rojos adultos, independientes del diseño experimental, y el ADN de ocho larvas excedentes del experimento de Hernández-Ibarra (2008). Para cada loci microsatélite a estandarizar se trabajaron reacciones de PCR en volúmenes de 11  $\mu$ l, con las siguientes concentraciones de reactivos: 0.025 U/ $\mu$ l de Taq polimerasa (Platinum-invitrogen), 1X de buffer para Taq, 0.2 mM de cada dNTP y 0.48  $\mu$ M de cada "primer" (Tabla 2); además de probar un gradiente de  $MgCl_2$  (1.5, 2.0, 2.5, 3.0 y 3.5 mM). Las condiciones de PCR fueron: un ciclo de 2 min a 95°C, seguido de 35 o 40 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a la temperatura de alineamiento (se probó un gradiente de 45, 46.1, 48, 50.7, 54.5, 57.2, 59 y 60°C), 45 s a 72°C, finalmente una extensión de 10 min a 72°C (modificado de Miller *et al.*, 2001).

Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 5%, 7.5 M de urea, bajo las siguientes condiciones eléctricas: 2,400 voltios, 100 miliamperes y 90 watts (modificado de Sambrook *et al.*, 1989), el procedimiento se describe en el Apéndice III. Posterior a la electroforesis, los geles se cubrieron con agarosa al 1% conteniendo 0.005 % del fluorocromo Sybr gold (10,000X) (Rodzen *et al.*, 1989). Finalmente los productos amplificados se visualizaron en un escáner y analizador de imágenes FMBIO III (Hitachi Genetic System, San Francisco CA, USA) (ver Apéndice IV).

#### **5.4 Genotipificación de progenitores**

La amplificación en los progenitores se realizó considerando las concentraciones y condiciones de PCR determinadas en el apartado anterior. Los detalles de la reacción de amplificación, así como de las condiciones de PCR se encuentran en el Apéndice V. La electroforesis y visualización de los productos se realizó en las mismas condiciones señaladas en el apartado anterior, solo que en éste caso se agregó una escalera de 10 pares de bases (pb) (Invitrogen 10821-015). Esta escalera se incluyó en la electroforesis para estimar el tamaño de los fragmentos amplificados (alelos), medidos en pb.

Los loci microsatélites que amplificaron exitosamente y que fueron polimórficos, se utilizaron para la genotipificación de los progenitores (cinco hembras y un macho). La genotipificación consistió en reconocer y asignar los alelos que presenta cada progenitor en los loci microsatélites. Cada genotipo, se denota por los dos alelos presentes, que pueden ser diferentes en el caso de un heterocigoto, o similares en el caso de un homocigoto. Cada alelo se denota como el tamaño en pares de bases (tres dígitos), y el genotipo de un individuo como los dos alelos presentes separados por una diagonal. Con esta genotipificación se pudo definir qué loci podían ser evaluados y en qué familias. De esta manera, para el análisis de frecuencias de recombinación se eligieron las familias, donde la hembra resultó heterocigota y no compartía alelos con el macho.

### **5.5 Análisis de segregación mendeliana**

Para determinar si los loci microsatélites se ajustaban a una herencia mendeliana, se evaluaron los genotipos de las 30 larvas diploides de cada familia que resultó informativa. A partir de los genotipos de los progenitores se determinaron las clases genotípicas esperadas en la progenie, así como sus frecuencias. Con las frecuencias esperadas y las observadas para cada clase genotípica se hicieron pruebas de  $\chi^2$ . La ecuación utilizada con sus respectivos grados de libertad (g.l.) (Zar, 1996) fue la siguiente:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k (O-E)^2/E \quad \text{g.l.} = k-1$$

Donde  $O$  es el número de individuos observados en cada clase genotípica,  $E$  es el número esperado de individuos en la misma clase genotípica y  $k$  es el número de clases genotípicas. Se fijó un nivel máximo de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05.

### **5.6 Análisis de las frecuencias de recombinación**

Para determinar las frecuencias de recombinación de los loci microsatélites se evaluaron los genotipos de 60 larvas triploides de cada familia informativa. La frecuencia de recombinación alélica ( $y$ ) se determinó en el componente materno de las progenies utilizando la siguiente fórmula (Li & Kijima, 2005):

$$y = ab / (ab + aa + bb)$$

Donde:

$y$  = frecuencia de recombinación alélica,

$ab$  = la proporción de genotipos recombinantes observados (dos alelos diferentes),

$aa$  ó  $bb$  = proporción de genotipos no recombinantes observados (un mismo alelo).

Posteriormente al análisis de frecuencias de recombinación se realizó un análisis de segregación de los homocigotos para ver si éstos no presentaban una desviación de la proporción 1:1, la cual se espera ya que son los genotipos no recombinantes y deben de estar por ende en similar proporción ( $aa=bb$ ). Esta prueba se realizó en

cada familia informativa de cada uno de los loci analizados. Para éste análisis se empleó una prueba de bondad de ajuste ( $\chi^2$ ) y se fijó un  $\alpha$  de 0.05.

Para cada loci microsatélite se obtuvo un promedio de las frecuencias de recombinación entre las familias informativas, siempre y cuando los valores fueran homogéneos. Por tal motivo, se realizaron pruebas de homogeneidad. Se emplearon tablas de contingencia ( $r \times c$ ), donde “r” representa a las familias que es la variable predeterminada (pudiendo ser 2, 3 o 4 familias informativas) y “c” las columnas con el número de recombinantes y no recombinantes de cada familia (siendo por tanto 2 categorías). Se aplicó una prueba de homogeneidad de  $\chi^2$  en tablas de  $2 \times 2$ ,  $3 \times 2$  y  $4 \times 2$ ; en los casos donde las frecuencias esperadas fueron menores de 5 se utilizó una prueba exacta para tablas de contingencia de  $3 \times 2$  y se utilizó una prueba exacta de Fisher para las tablas de contingencia de  $2 \times 2$  (Hubert *et al*, 2009; Zar, 1996), las tablas de contingencia se hicieron con la ayuda del programa en línea “Statistics to use” (Kirkman, 1996).

### **5.7 Estimación de las distancias al centrómero**

A partir de los valores promedio de la frecuencia de recombinación alélica ( $y$ ), se obtuvieron los valores de la *distancia genética* ( $x$ ) entre el locus microsatélite y su centrómero, expresados en centimorgans (cM). Se utilizaron tres modelos propuestos en la literatura, basados en el grado de interferencia supuesto:

[1] Supone Interferencia completa (Thorgaard *et al.*, 1983);

$$x = y/2 (100)$$

[2] Supone 50 % de interferencia (Kosambi, 1944);

$$x = [\ln(1 + y) - \ln(1 - y)] \times 100/4$$

[3] Supone Cero por ciento de interferencia (Haldane, 1919).

$$x = -[\ln(1 - y)] \times 100/2$$

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Estandarización de la amplificación por PCR de microsatélites

De la amplificación cruzada, 22 de los 35 loci microsatélites probados amplificaron correctamente en *H. rufescens*. De estos 22, 13 fueron polimórficos: tres originalmente obtenidos de *H. corrugata*, uno de *H. discus discus*, uno de *H. fulgens* y ocho de *H. kamtschatkana* (Tabla 3). Las concentraciones de cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) variaron de 1.5 a 2.0 mM y las temperaturas de alineamiento ( $T_a$ ) de 50 a 61° C. En el Apéndice V se encuentran las concentraciones de las reacciones para la amplificación así como las condiciones de PCR para cada uno de los loci.

### 6.2 Familias informativas

Al genotipificar a los progenitores con cada uno de los microsatélites que resultaron polimórficos se pudieron determinar las familias que serían informativas para el análisis de las frecuencias de recombinación, aquellas donde la progenitora resultó heterocigota y con alelos diferentes al progenitor macho.

**Tabla 3.** Loci polimórficos y condiciones de amplificación.

Locus	[MgCl <sub>2</sub> ] (mM)	T <sub>a</sub> (°C)
<i>Hco12</i>	2.0	61
<i>Hco15, Hco97</i>	1.5	61
<i>Hdd229</i>	1.5	55
<i>Hful369, Hka80</i>	1.5	54
<i>Hka3, Hka40</i>	1.5	52
<i>Hka12</i>	2.0	50
<i>Hka28, Hka56</i>	2.0	54
<i>Hka65, Hka85</i>	2.0	55

Finalmente, 10 loci microsatélite fueron útiles para el análisis. En la familia 1 se analizaron ocho microsatélites, cuatro en la familia 2, tres en la familia 3, seis en la familia 4 y siete en la familia 5. En la Tabla 4 se muestran los genotipos de cada progenitor para cada uno de los microsatélites, el número de alelos para cada locus y las familias que resultaron informativas.

**Tabla 4.** Genotipos de progenitores, número de alelos por locus y relación de familias informativas en donde la hembra es heterocigota y con alelos diferentes a los del macho.

Locus	Hembras					Macho	No alelos locus	de por	Familias informativas
	1	2	3	4	5				
<b>Hco15</b>	514/570	528/634	414/634	448/542	438/634	430/634	9		<b>1,4</b>
<b>Hco97</b>	206/226	218/218	224/256	224/238	222/232	244/268	10		<b>1,3,4,5</b>
<b>Hdd229</b>	170/194	178/186	158/182	156/186	172/172	178/190	9		<b>1,3,4</b>
<b>Hka3</b>	278/304	286/290	276/294	274/274	268/274	286/294	8		<b>1,5</b>
<b>Hka28</b>	232/238	230/234	232/232	232/236	220/240	230/222	8		<b>1,4,5</b>
<b>Hka40</b>	153/155	143/165	143/143	141/149	141/143	133/159	8		<b>1,2,4,5</b>
<b>Hka56</b>	106/128	108/116	110/112	118/128	110/112	110/110	7		<b>1,2,4</b>
<b>Hka65</b>	158/176	128/160	158/166	154/158	154/198	158/170	8		<b>2,5</b>
<b>Hka80</b>	123/141	127/153	135/147	121/147	117/141	121/139	9		<b>1,2,3,5</b>
<b>Hka85</b>	200/200	194/194	194/194	194/194	194/200	203/203	3		<b>5</b>

### **6.3 Análisis de segregación a partir de individuos diploides**

Todos los microsatélites presentaron concordancia con la segregación mendeliana (1:1:1:1) ( $P > 0.05$ ), los resultados de la prueba de bondad de ajuste ( $\chi^2$ ), se presentan en la Tabla 5. Aunque cabe señalar que el locus *Hco97* en la familia 3 y el *Hka40* en la familia 2 se encuentran en el límite con un valor de  $P$  de 0.06 y 0.07, respectivamente (Tabla 5).

En los loci *Hka56* y *Hka85* se observaron alelos nulos en el progenitor macho, lo cual se dedujo al analizar la segregación alélica en la progenie. En el caso del locus *Hka56*, en la mitad de la progenie, de las tres familias analizadas (1, 2 y 4), no se observó el alelo (110) del padre, lo cual hace suponer que el progenitor no era homocigoto (110/110), sino más bien heterocigoto con un alelo nulo (110/AN) que fue heredado a la mitad de la progenie. Lo mismo ocurrió para la familia evaluada con el locus *Hka85*, en donde el macho en realidad es un heterocigoto con un alelo nulo (203/AN) y no así un homocigoto (203/203), como se consideró originalmente (Tabla 4).

**Tabla 5.** Análisis de segregación en familias diploides (2n).

Locus	Familia (# org)	Genotipos parentales		Clases de genotipo y No. de progenies: observadas (esperadas)				X <sup>2</sup>	P
		♀	♂						
<b>Hco15</b>	1 (26)	514/570	430/634	430/514 6 (6.5)	514/634 11 (6.5)	430/570 5 (6.5)	570/634 4 (6.5)	4.47	0.22
	4 (29)	448/542	430/634	430/448 11(7.25)	448/634 5(7.25)	430/542 8(7.25)	542/634 5(7.25)	3.42	0.33
<b>Hco97</b>	1 (29)	206/226	244/268	206/244 6(7.25)	206/268 7(7.25)	226/244 10(7.25)	226/268 6(7.25)	1.49	0.69
	3 (27)	228/256	244/268	228/244 7(6.75)	228/268 6(6.75)	244/256 12(6.75)	256/268 2(6.75)	7.51	0.06
	4 (28)	224/238	244/268	224/244 7(7)	224/268 6(7)	238/244 5(7)	238/268 10(7)	2.0	0.57
	5 (30)	222/232	244/268	222/244 12(7.5)	222/268 8(7.5)	232/244 3(7.5)	232/268 7(7.5)	5.47	0.14
<b>Hdd229</b>	1 (30)	170/194	178/190	170/178 9(7.5)	170/190 5(7.5)	178/194 9(7.5)	190/194 7(7.5)	1.46	0.69
	3 (30)	158/182	178/190	158/178 8(7.5)	158/190 8(7.5)	178/182 6(7.5)	182/190 8(7.5)	0.39	0.94
	4 (29)	156/186	178/190	156/178 11(7.25)	156/190 9(7.25)	178/186 4(7.25)	186/190 5(7.25)	4.48	0.21
<b>Hka3</b>	1 (30)	278/304	286/294	278/286 9(7.5)	278/294 7(7.5)	286/304 7(7.5)	294/304 7(7.5)	0.40	0.94
	5 (30)	268/274	286/294	268/286 6(7.5)	268/294 10(7.5)	274/286 4(7.5)	274/294 10(7.5)	3.60	0.31

**Tabla 5.** (Continuación).

Locus	Familia (# org)	Genotipos parentales		Clases de genotipo y No. de progenies: observadas (esperadas)				X <sup>2</sup>	P
		♀	♂						
<b>Hka28</b>	1 (29)	232/238	222/230	222/232 8(7.25)	230/232 7(7.25)	222/238 9(7.25)	230/238 5(7.25)	1.21	0.75
	4 (29)	232/236	222/230	222/232 6(7.25)	230/232 6(7.25)	222/236 7(7.25)	230/236 10(7.25)	1.5	0.69
	5 (28)	220/240	222/230	220/222 6(7)	220/230 8(7)	222/240 5(7)	230/230 9(7)	1.42	0.7
<b>Hka40</b>	1 (30)	153/155	133/159	133/153 5(7.5)	153/159 8(7.5)	133/155 8(7.5)	155/159 9(7.5)	1.20	0.75
	2 (30)	143/165	133/159	133/143 12 (7.5)	143/159 9 (7.5)	133/165 2 (7.5)	159/165 7 (7.5)	7.06	0.07
	4 (30)	141/149	133/159	133/141 8(7.5)	141/159 9(7.5)	133/149 9(7.5)	149/159 4(7.5)	2.27	0.52
	5 (22)	141/143	133/159	133/141 6(5.5)	141/159 3(5.5)	133/143 8(5.5)	143/159 5(5.5)	2.38	0.5
<b>Hka56</b>	1 (30)	106/128	110/AN	106/110 8(15)	110/128 9(15)	106/AN 7(0)	128/AN 6(0)		0.13
	2 (27)	108/116	110/AN	108/110 6(13.5)	110/116 9(13.5)	108/AN 5(0)	116/AN 7(0)		0.13
	4 (26)	118/128	110/AN	110/118 7(13)	110/128 10(13)	118/AN 7(0)	128/AN 2(0)		0.33
<b>Hka65</b>	2 (28)	128/160	158/170	128/158 6(7)	128/170 8(7)	158/160 8(7)	160/170 6(7)	0.56	0.9
	5 (21)	154/198	158/170	154/158 6(5.25)	154/170 7(5.25)	158/190 3(5.25)	170/198 5(5.25)	1.67	0.64
<b>Hka80</b>	1 (30)	123/141	121/139	121/123 7(7.5)	123/139 6(7.5)	121/141 8(7.5)	139/141 9(7.5)	0.67	0.88
	2 (28)	127/153	121/139	121/127 7(7)	127/139 5(7)	121/153 6(7)	139/153 10(7)	2.0	0.57
	3 (30)	135/147	121/139	121/135 9(7.5)	135/139 7(7.5)	121/147 7(7.5)	139/147 7(7.5)	0.4	0.94
	5 (29)	117/141	121/139	117/121 8(7.25)	117/139 10(7.25)	121/141 6(7.25)	139/141 57(7.25)	2.03	0.56
<b>Hka85</b>	5 (30)	194/200	203/AN	194/203 9(15)	200/203 7(15)	194/AN 9(0)	200/AN 5(0)		0.08

Prueba de X<sup>2</sup> (con 3 g.l.) para examinar la herencia mendeliana en los microsatélites.

P (0.05 y 3 g.l.), valor de significancia para la prueba de X<sup>2</sup>.

#### **6.4 Análisis de frecuencias de recombinación ( $y$ ) del locus al centrómero a partir de individuos triploides**

Para éste análisis no se toma en cuenta el alelo aportado por el macho a la progenie. Cuando un organismo tiene los dos alelos de la madre, se considera un recombinante y cuando solo posee uno de los dos alelos, se considera un no recombinante.

El rango de la frecuencia de recombinación para los 10 loci microsatélites analizados resultó de 0.01 la más baja para el microsatélite *Hka3* y el valor más alto estimado fue de 0.41 para los loci *Hco97* y *Hka28* (Tabla 6). La familia 1 en el microsatélite *Hdd229* y la familia 5 del *Hka28* tuvieron valores de  $y$  más altos que el valor máximo teórico esperado, cuando se asume cero interferencia, que es de 0.67.

La familia 4 (informativa en los loci, *Hco15*, *Hco97*, *Hdd229*, *Hka28*, *Hka40* y *Hka56*) presentó baja frecuencia de recombinación independientemente del locus donde fue informativa ( $y = 0.05$  a  $0.18$ ). Por otra parte la familia 2 tuvo, en dos de los cuatro loci donde fue informativa (*Hka40*, *Hka56*, *Hka65* y *Hka80*), una frecuencia de recombinación alta ( $y = 0.22$  en *Hka40* y  $y = 0.46$  en *Hka80*) con respecto a las otras familias analizadas para esos loci ( $y$  promedio =  $0.09$  y  $0.13$  para *Hka40* y *Hka80*, respectivamente). Las familias 1, 3 y 5 tuvieron frecuencias de recombinación variables de acuerdo al locus analizado (Tabla 6).

La proporción de homocigotos o no recombinantes, se ajustó estadísticamente ( $P > 0.05$ ) a una proporción 1:1 en la mayoría de las familias, a excepción de la familia 5 en el microsatélite *Hka80* que tuvo una desviación significativa ( $P = 0.01$ ) (Tabla 6).

La prueba de homogeneidad para frecuencias de recombinación ( $y$ ) se aplicó a los loci donde más de una familia fue informativa. En los loci *Hco15*, *Hco97*, *Hdd229* y *Hka28* no hubo homogeneidad entre los valores de  $y$ , de las distintas familias donde se realizó el análisis. En los loci *Hdd229* y *Hka28*, aún excluyendo de la prueba a la familia con los valores más extremos (familia 4), no se observó homogeneidad. Con el locus *Hco97* se hicieron varias combinaciones en la tabla de contingencia y resultaron homogéneas las dos combinaciones que incluían a la familia 1 (familias 1-

3 y familias 1-5), que para este locus tiene valores intermedios de  $y$  (0.49), pero no hubo homogeneidad en la combinación de las familias 3- 5 que tienen los valores

**Tabla 6.** Frecuencias de recombinación ( $y$ ) en heterocigotos, entre el microsatélite y el centrómero (M-C) y proporción de homocigotos.

Locus	Familia (# org)	Genotipo materno a/b (pb)	Número de progenies de cada genotipo			Frecuencia de recombinación	
			aa	ab	bb	M-C ( $y$ )	P
<b>Hco15</b>	1(55)	514/570	13	28	14	0.51	0.85
	4 (56)	448/542	29	10	17	0.18	0.08
						<b>0.35</b>	
<b>Hco97</b>	1 (57)	206/226	10	28	19	0.49	0.09
	3 (57)	228/256	21	20	16	0.35	0.51
	4 (55)	224/238	20	8	27	0.15	0.31
	5 (56)	222/232	12	37	7	0.66	0.25
						<b>0.41</b>	
<b>Hdd229</b>	1 (60)	170/194	12	34	14	0.69	0.69
	3 (58)	158/182	18	14	26	0.24	0.23
	4 (59)	156/186	28	9	22	0.15	0.40
						<b>0.36</b>	
<b>Hka3</b>	1 (59)	278/304	33	0	26	0	0.36
	5 (58)	268/274	24	1	33	0.02	0.23
						<b>0.01</b>	
<b>Hka28</b>	1 (58)	232/238	14	21	23	0.36	0.14
	4 (58)	232/236	26	7	25	0.12	0.89
	5 (57)	220/240	8	43	6	0.75	0.59
						<b>0.41</b>	
<b>Hka40</b>	1 (59)	153/155	27	4	28	0.07	0.89
	2 (60)	143/165	19	13	28	0.22	0.19
	4 (58)	141/149	29	4	25	0.07	0.59
	5 (51)	141/143	22	6	23	0.12	0.88
						<b>0.12</b>	
<b>Hka56</b>	1 (59)	106/128	36	1	22	0.02	0.07
	2 (60)	108/116	27	3	30	0.05	0.69
	4 (60)	118/128	21	3	36	0.05	0.28
						<b>0.04</b>	

**Tabla 6.** Continuación

Locus	Familia (# org)	Genotipo materno a/b (pb)	Número de progenies de cada genotipo			Frecuencia de recombinación M-C (y)	P
			aa	ab	bb		
<b>Hka65</b>	2 (60)	128/160	28	3	29	0.05	0.89
	5 (43)	154/198	20	0	23	0	0.65
						<b>0.025</b>	
<b>Hka80</b>	1(58)	123/141	28	7	23	0.12	0.48
	2(60)	127/153	17	28	15	0.46	0.72
	5(58)	117/141	34	8	16	0.14	<b>0.01</b>
						<b>0.2</b>	
<b>Hka85</b>	5 (60)	194/200	14	30	16	<b>0.5</b>	0.05

(pb), pares de bases.

y, promedio de la frecuencia de recombinación para cada locus.

P (0.05 y 1 g.l.), valor de significancia para la prueba de  $\chi^2$  de homocigotos aa=bb.

Valores en negrita demuestran diferencias significativas entre homocigotos.

extremos ( $y = 0.35$  y  $0.66$  para las familias 3 y 5 respectivamente). En los loci *Hka40* y *Hka80* los valores de  $y$  fueron homogéneos cuando se excluyó de la prueba a la familia 2 (Tabla 7). Por otro lado en el locus *Hka80* la familia 5 quedó fuera de la prueba por la desviación de los homocigotos (no recombinantes) de la proporción 1:1 (Tabla 6).

**Tabla 7.** Tablas de contingencia (r x c) para pruebas de homogeneidad

Locus (familias)	r x c	$\chi^2$	P
<b>Hco15</b>			
(1,4)	2 x 2	13.5	<b>0.000</b>
<b>Hco97</b>			
(1,3,4,5)	4 x 2	33.3	<b>0.000</b>
(1,3,5)	3 x 2	11.8	<b>0.003</b>
(1,3)	2 x 2	2.82	0.091
(1,5)	2 x 2	3.32	0.068
(3,5)	2 x 2	11.8	<b>0.001</b>

**Tabla 7.** (Continuación)

<b>Locus (familias)</b>	<b>r x c</b>	<b>X<sup>2</sup></b>	<b>P</b>
<b>Hdd229</b>			
<b>(1,3,4)</b>	3 x 2	25.9	<b>0.000</b>
<b>(1,3)</b>	2 x 2	12.9	<b>0.000</b>
<b>Hka28</b>			
<b>(1,4,5)</b>	3 x 2	48.6	<b>0.000</b>
<b>(1,5)</b>	2 x 2	17.9	<b>0.000</b>
<b>Hka40</b>			
<b>(1,2,4,5)</b>	4 x 2	8.35	<b>0.039</b>
<b>(1,4,5)</b>	3 x 2	1.13	0.569
<b>Hka80</b>			
<b>(1,2,3)</b>	3 x 2	30.6	<b>0.000</b>
<b>(1,3)</b>	2 x 2	0.451	0.502
<b>Hka56</b>			
<b>(1,2,4)</b>	3 x 2	*	0.702
<b>Hka3</b>			
<b>(1,5)</b>	2 x 2	**	0.496
<b>Hka65</b>			
<b>(2,5)</b>	2 x 2	**	0.193

$P(0.05)$ , valor de significancia para la prueba  $X^2$ .

\*, Prueba exacta para tablas de contingencia.

\*\*, Prueba exacta de Fisher para tablas de contingencia de 2 x 2.

Valores en negrita indican no homogeneidad estadística.

### **6.5 Estimación de la distancia genética (locus al centrómero)**

En la Tabla 8 se presentan las distancias genéticas considerando solamente los loci microsatélites donde al menos dos familias resultaron homogéneas, destacando que fueron aquellos con menor frecuencia de recombinación, con excepción del locus *Hco97*. Este locus fue informativo en cuatro familias (1, 3, 4 y 5), la familia 4 fue excluida del análisis y se incluyen en la tabla 8 las dos combinaciones donde presenta homogeneidad que tienen como dato común a la familia 1.

**Tabla 8.** Distancia genética del microsatélite al centrómero (M-C), en los loci donde hubo homogeneidad de  $y$  entre al menos dos familias.

Locus	No. de familias	No. de organismos	$y$	Distancia genética M-C (cM)		
				Thorgaard	Kosambi	Haldane
<i>Hco97</i>	2(1,3)	114	0.42	21.0	22.3	27.2
<i>Hco97</i>	2(1,5)	113	0.57	28.5	32.3	42.2
<i>Hka3</i>	2(1,5)	117	0.01	0.5	0.5	0.5
<i>Hka40</i>	3(1,4,5)	168	0.09	4.5	4.5	4.7
<i>Hka56</i>	3(1,2,4)	179	0.04	2.0	2.02	2.05
<i>Hka65</i>	2(2,5)	103	0.025	1.25	1.26	1.26
<i>Hka80</i>	2(1,3)	118	0.1	5	5	5.25

Cálculo de la distancia genética en centimorgans (cM) con diferentes grados de interferencia. Thorgaard: interferencia completa ( $X = (100) y/2$ ). Kosambi: 50% de interferencia ( $X = [\ln(1 + y) - \ln(1 - y)] \times 100/4$ ). Haldane: cero interferencia ( $X = - [\ln(1 - y)] \times 100/2$ ).

En la Tabla 9 se presentan las distancias genéticas de los loci donde solamente una familia resultó informativa o hubo heterogeneidad entre ellas. Con excepción del locus

*Hka85* para el que desde un principio solamente la familia 5 fue informativa, en el locus *Hco15* se descartó la familia 4 por los valores tan bajos de  $y$  en comparación con la otra familia involucrada (familia 1), por lo que para la estimación de la distancia genética, se considera que solamente la familia 1 fue informativa. En los casos de los loci *Hco97*, *Hdd229* y *Hka28* se descartó a la familia 4 y se considera un rango de frecuencias de recombinación al igual que rangos en la distancia del locus al centrómero.

**Tabla 9.** Distancia genética del microsatélite al centrómero (M-C), en los loci donde solamente se evaluó una familia o hubo heterogeneidad entre familias.

Locus	No. de familias	No. de organismos	rangos de $y$	Rangos de distancia genética M-C (cM)		
				Thorgaard	Kosambi	Haldane
<i>Hco97</i>	3 (1,3,5)	170	0.35 - 0.66	18 - 33.0	18.28 - 39.65	21.54 - 53.95
<i>Hdd229</i>	2 (1,3)	115	0.24 - 0.69	12 - 34.5	12.12 - 42.4	13.7 - 58.55
<i>Hka28</i>	2 (1,5)	115	0.36 - 0.75	18 - 37.5	18.82 - 48.65	22.3 - 69.3
<i>Hco15</i>	1(1)	55	0.51	25.5	28.12	35.65
<i>Hka85</i>	1(5)	60	0.5	25	27.45	34.65

Cálculo de la distancia genética en centimorgans (cM) con diferentes grados de interferencia.

Thorgaard: interferencia completa ( $X = (100) y/2$ ). Kosambi: 50% de interferencia

( $X = [\ln(1 + y) - \ln(1 - y)] \times 100/4$ ). Haldane: cero interferencia( $X = - [\ln(1 - y)] \times 100/2$ ).

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1 Amplificación cruzada y estandarización

El único locus microsatélite identificado directamente a partir del genoma de *Haliotis rufescens* (Kirby *et al.*, 1998), no se logró amplificar con éxito. Además, de que no se encontraron reportes del uso de éste locus en ningún trabajo con *H. rufescens*, ni tampoco en otra especie de abulón. Una de las posibilidades para no haber podido amplificarlo, es tal vez porque el diseño de los *primers* no fue el más correcto, o coincidió con una región de elevada tasa de mutación en uno de los *primers* diseñados en el organismo usado como fuente de ADN.

La amplificación cruzada es una alternativa cuando no se cuenta con los microsatélites identificados directamente en la especie de trabajo, además de que reduce el tiempo y los costos implicados en el aislamiento de estos marcadores moleculares. Varios trabajos reportan, además del aislamiento de los microsatélites en una especie específica, la amplificación de éstos en otras especies. Takagi *et al.* (1997) reportan cinco loci microsatélite aislados en el pez *Pragus major* y probados en otras especies de la familia Sparidae logrando amplificar de uno a cuatro loci. En la almeja *Nodipecten subnodosus*, se identificaron 35 loci microsatélite y se hizo la amplificación cruzada en otras cuatro especies de la familia Pectinidae, de las cuales el 25% no amplificó en ninguna de las especies: en tres especies del género *Argopecten* amplificaron de cero a 11 loci y en una especie del mismo género (*N. nodosus*) amplificaron 26 loci (Ibarra *et al.*, 2006). Petersen *et al.* (2009), adicionalmente reportaron el aislamiento de 37 loci y su amplificación cruzada en las mismas especies, obteniendo resultados similares: en *A. ventricosus* no amplificó ningún microsatélite; en *A. irradians* y *A. purpuratus* amplificaron cinco y dos loci, respectivamente y en *N. nodosus* amplificaron 16 loci.

En abulón hay varios reportes de aislamiento de microsatélites y su amplificación cruzada en otras especies, como los aislados en *H. fulgens* y probados en *H. rufescens* y *H. corrugata* (Cruz *et al.*, 2005). De ocho loci identificados en *H. fulgens*,

cinco amplificaron de manera cruzada en *H. rufescens*, y se plantearon como potencialmente útiles para la certificación de especies. Sekino y Hara (2007a) para distinguir diferencias entre especies del Japón y basados en microsatélites aislados de *H. discus hannai*, de manera adicional trabajaron con amplificación cruzada en cinco especies que se piensa son más divergentes. *H. fulgens* y *H. corrugata* fueron dos de las cinco especies donde se hizo amplificación cruzada, pudiendo amplificar siete loci en *H. fulgens* y seis en *H. corrugata*, de 24 loci analizados. Evans *et al.* (2001) hicieron amplificación cruzada de 22 loci microsatélites de *H. rubra* en otras 12 especies, incluidas *H. fulgens* y *H. corrugata*, donde pudieron amplificar tres de los 22 loci probados. Díaz-Viloria *et al.* (2008) reportaron el aislamiento de 10 loci microsatelites en *H. corrugata* y su amplificación cruzada en *H. fulgens* y *H. rufescens*, logrando la amplificación de ocho loci.

Para este trabajo, se tenía la información previa de la amplificación cruzada en abulón rojo (Morelos-Castro, 2008), de los loci microsatélite de *H. fulgens* (Cruz *et al.*, 2005) y se sabía que solamente el locus *Hful369* podría ser informativo en base a los genotipos que las hembras presentaron para esos microsatélites. En el caso de *H. corrugata*, en donde Díaz-Viloria *et al.* (2008) reportan la amplificación cruzada en abulón rojo de ocho loci, en el presente estudio se probaron dos loci más (*Hco12* y *Hco69a*) reportados por Díaz-Viloria (2009). Se obtuvo amplificación cruzada exitosa en tres (*Hco12*, *Hco15* y *Hco97*) de estos diez loci reportados. Los resultados del presente trabajo, coincidieron con Gruenthal *et al.* (2007) en la amplificación cruzada de cinco loci de *H. kamtschatkana* (*Hka3*, *Hka28*, *Hka40*, *Hka56* y *Hka80*; Miller *et al.*, 2001) en abulón rojo. Además de que se probaron seis loci más de ésta especie, amplificando tres exitosamente. En el caso de los loci microsatélites aislados en las especies de abulón del Pacífico *H. discus discus* y *H. discus hannai* no se encontraron reportes de la amplificación cruzada de éstos en abulón rojo, de los 13 loci probados solamente fue informativo uno (*Hdd229*), cabe aclarar que de las distintas especies, varios loci microsatélite amplificaron, pero no con patrones de bandeo claros, por lo que se dejaron fuera de la estandarización, ya que por los mismos objetivos del trabajo no permitían invertir demasiado tiempo en los loci, que

no daban buenos resultados en las primeras pruebas, de gradientes de magnesio y/o temperatura.

Los loci microsatélites que se utilizaron para estandarizar en *H. rufescens*, fueron elegidos en base a la relación filogenética con las otras especies de *haliotidos*, en donde se consideran tres grupos filogenéticos, que engloban a las especies por zona geográfica: Pacífico Norte, Europa y Australia (Lee & Vacquier, 1995; Coleman & Vacquier, 2002). Lee y Vacquier (1995), para inferir la filogenia del género *Haliotis*, hicieron un estudio a partir de la secuencia del gen de la lisina espermática, para lo que analizaron 27 especies. Sus resultados sugieren que hay tres grupos, donde se engloban las especies analizadas: (1) donde están todas las especies de California y tres especies Japonesas; (2) una especie de Nueva Zelanda; y (3) un grupo que incluye una especie Japonesa, las especies del Indo-Pácifico Oeste y las especies europeas. Coleman y Vacquier (2002), usaron marcadores moleculares tipo espaciadores internos transcritos (ITS, por sus siglas en inglés) del ADN ribosomal (rDNA) y clasificaron en tres grupos (del Pacífico Norte, de Europa y de Australia), 19 especies de *Haliotis*. En el grupo del Pacífico Norte se encuentran, *H. rufescens*, *H. kamtschatkana*, *H. fulgens* y *H. corrugata*. En los dos trabajos antes mencionados, *H. rufescens* y *H. kamtschatkana*, resultan más relacionados genéticamente entre sí, que con *H. fulgens* y *H. corrugata*. Los resultados del presente estudio, coinciden con los antes mencionados, en cuanto a una mayor similitud genética de *H. rufescens* con *H. kamtschatkana* y menor con *H. corrugata*, ya que de *H. kamtschatkana* amplificaron ocho de 11 loci probados, en tanto que de *H. corrugata* amplificaron tres de 10 loci probados.

## **7.2 Familias informativas**

Los 10 loci microsatélites analizados fueron polimórficos, el número de alelos por locus, detectados en los progenitores, varió de tres en *Hka85* hasta 10 alelos en *Hco97*. Díaz-Viloria *et al.* (2008), reportaron ocho alelos en *Hco15* y cinco alelos en *Hco97* cuando trabajaron con cinco organismos de *H. rufescens*, y encontraron

valores aproximados a los observados en el presente estudio (nueve y 10 alelos, respectivamente) al analizar de igual manera una muestra pequeña: seis individuos (cinco hembras y un macho). Gruenthal *et al.* (2007), hicieron un estudio de genética de poblaciones en *H. rufescens*, utilizaron los loci *Hka3*, *Hka28*, *Hka40*, *Hka56*, y *Hka80* y reportan un rango de 26 a 75 alelos por locus, ellos analizaron alrededor de 400 individuos por locus, por otro lado en el presente trabajo se analizaron seis individuos (los progenitores) por locus, con un rango mucho menor de alelos (tres a nueve). Adicionalmente, los organismos de *H. rufescens* usados para conformar los grupos experimentales de este estudio, eran organismos cultivados en condiciones artificiales, los que normalmente presentan una menor variabilidad genética. De hecho, solamente se presentaron 28 casos de familias informativas, considerando que las hembras fueran heterocigotas y sin compartir alelos con el macho, de un total de 50 posibles combinaciones (10 loci x 5 familias). En otras palabras, si se tomara una muestra silvestre de 6 individuos de *H. rufescens* del estudio de Gruenthal *et al.* (2007) posiblemente se observaría una mayor variabilidad genética y por ende menos alelos compartidos.

El uso de cinco familias, en éste caso familias triploides, se encuentra en los rangos de lo reportado en trabajos previos. En camarón, el trabajo realizado por Wang *et al.* (2008) reportan el uso de tres familias triploides. En *Crassostrea gigas*, Guo y Gaffney (1993) emplearon tres familias ginogenéticas, Li y Kijima, (2006) reportan cinco familias ginogenéticas y Hubert *et al.* (2009) utilizaron siete familias triploides. En *Chlamys farreri* Li *et al.* (2009) reportan tres familias ginogenéticas. En abulón, Li y Kijima, (2005) utilizaron tres familias ginogenéticas de *Haliotis discus hannai*.

Por tanto, en este trabajo se reporta el uso de cinco familias triploides, analizadas con 10 loci microsatélite polimórficos. En donde, no necesariamente todas las familias fueron informativas para los 10 loci, de una a cuatro familias fueron informativas para cada locus. Para el locus menos polimórfico, *Hka85* solo fue informativa la familia 5, en tanto que para los loci mas polimórficos (*Hco97*, *Hka40*, y *Hka80*) fueron informativas cuatro familias.

### **7.3 Análisis de segregación mendeliana**

Ninguno de los loci microsatélite presentó distorsión a la segregación mendeliana, lo cual se debe probablemente a que el estudio se hizo con organismos en estadios tempranos del desarrollo, con larvas veliger de cuatro días y posiblemente aún no se han eliminado genotipos de manera natural. Esto de acuerdo a lo que se ha reportado para diferentes especies de moluscos, incluido el abulón (Hubert & Hedgecock, 2004; Li & Kijima, 2006; Li *et al.*, 2009) ya que las mayores mortalidades se presentan cuando experimentan la metamorfosis, en el caso del abulón durante el asentamiento. En otras palabras, es más adecuado evaluar la herencia mendeliana antes de que se den mortalidades masivas durante el desarrollo de los organismos. Diaz-Viloria (2009), de igual manera observó que 10 loci microsatélites se ajustan a una herencia mendeliana, al examinar su segregación en progenies larvales de tres familias de *H. corrugata*.

Pero por otra parte, una de las principales limitantes de los microsatélites es la presencia de alelos nulos (Li & Kijima, 2005). Los alelos nulos en los marcadores tipo microsatélite, se dan por mutaciones puntuales en las regiones flanqueantes, que es donde se alinean los *primers*, lo cual disminuye la capacidad de reconocimiento de estos últimos durante la amplificación del fragmento por *PCR* (Callen *et al.*, 1993; Reece *et al.*, 2004). La presencia de alelos nulos en los estudios de genética de poblaciones trae consigo la ausencia de equilibrio de Hardy-Weinberg debido a un déficit de heterocigotos (Callen *et al.*, 1993; Li *et al.*, 2003) y múltiples alelos nulos hacen confusos los análisis de estructura poblacional (Reece *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2009). En el campo del mapeo genético la presencia de alelos nulos puede reducir la información de segregación de los marcadores y se generan mapas de ligamiento poco confiables (Callen *et al.*, 1993; Sekino & Hara, 2007b). De los 10 loci utilizados, *Hka56* y *Hka85* presentaron alelos nulos en el genotipo del macho. Sin embargo, aún con la presencia de un alelo nulo, se observó un ajuste a la herencia mendeliana. Los alelos nulos no representan gran problema para el análisis de mapeo del gen al centrómero cuando se manejan cruzas controladas como es el caso del presente trabajo (Li & Kijima, 2005; Li *et al.*, 2009). Además, para el análisis

de las frecuencias de recombinación los alelos que se consideran, son los segregados por la hembra y en éste caso los alelos nulos se presentaron en el macho. Al utilizar microsatélites aislados en otras especies, se espera observar alelos nulos ya que la causa principal de su presencia es por alguna diferencia entre el *primer* y la región en el abulón rojo donde debe alinearse. Lo anterior, apoya la relación filogenética cercana entre *H. rufescens* y *H. kamtschatkana* y concuerda también, con el estudio poblacional de Gruenthal *et al.* (2007), quienes encontraron una gran frecuencia de alelos nulos en *Hka56*, pero no fue estadísticamente significativa.

#### **7.4 Análisis de frecuencias de recombinación (*y*) del locus al centrómero**

##### Loci polimórficos

La obtención en este trabajo, de 10 loci microsatélite informativos para estimar frecuencias de recombinación (*y*), es comparable con algunos trabajos realizados en otras especies. Tratándose de especies acuícolas, en peces se han realizado más trabajos de mapeo del gen al centrómero, para ello se ha utilizado diferentes marcadores moleculares. Específicamente con microsatélites, Lindner *et al.* (2000), reportan el uso de 31 loci microsatélites en el mapeo del gen al centrómero de un total de 312 marcadores moleculares en el salmón rosado (*Oncorhynchus gorbuscha*). Morishima *et al.* (2001), reportan para el pez *Misgurnus anguillicaudatus*, el mapeo con respecto al centrómero de 15 loci microsatélite. Li *et al.* (2008), analizaron 22 loci en el pez *Pseudosciaena crocea*. En *Scophthalmus maximus* Martínez *et al.* (2008), reportan el análisis de 79 loci microsatélites. En todos estos trabajos con peces, se utilizaron familias de organismos ginogenéticos. En crustáceos, específicamente en camarón (*Fenneropenaeus chinensis*) Wang *et al.* (2008) analizaron la *y* de nueve loci microsatélite, para lo que utilizaron familias triploides. En el molusco, *Crassostrea gigas*, Li y Kijima (2006) con este tipo de mapeo analizaron ocho loci microsatélites en familias ginogenéticas y recientemente Hubert *et al.* (2009), reportaron el análisis de 56 microsatélites en familias triploides.

En *Chlamys farreri* Li *et al.* (2009) reportaron el análisis de 27 loci microsatélites en familias ginogenéticas. En abulón, para *H. discus hannai* Li y Kijima (2005), reportaron el análisis de nueve loci microsatélites en familias ginogenéticas. En todos los trabajos antes mencionados, la mayoría de los loci fueron aislados directamente de la especie en estudio. En el presente trabajo, todos los loci analizados fueron aislados de otras especies por lo que 10 loci analizados son apropiados.

#### Frecuencias de recombinación ( $y$ )

El rango de  $y$  para los 10 loci microsatélites analizados fue de 0.01 (para el locus *Hka3*) a 0.41 (para los loci *Hco97* y *Hka28*); valores menores al valor máximo teórico esperado, cuando se asume cero interferencia, que es de 0.67 (Mather, 1935). En peces existen muchos trabajos de mapeo del gen al centrómero, para diferentes especies reportan valores de  $y$  con alozimas, que van de 0.02 a 1.0, con valores arriba de 0.67 hasta del 50% (Thorgaard *et al.*, 1983; Allendorf *et al.*, 1986; Streisinger *et al.*, 1986; Liu *et al.*, 1992). Para microsatélites se reportan valores de  $y$  muy por arriba de 0.67, por ejemplo, Lindner *et al.*, (2000) en *Oncorhynchus gorbuscha*, para un rango de  $y$  de 0.07 a 1.0 reportaron 64% de los valores arriba de 0.67; de igual forma otros autores encuentran valores similares para diferentes especies de peces (Nomura *et al.*, 2006; Lahrech *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2008). La mayoría de los autores asumen que estos valores se deben a que los cromosomas de los peces son físicamente muy pequeños lo que impide el que se realice más de un entrecruzamiento entre un par de cromátidas no hermanas (Thorgaard *et al.*, 1983). En el camarón chino *Fenneropenaeus chinensis*, Wang *et al.* (2008) reportaron un rango para  $y$  de nueve loci microsatélite de 0.19 a 0.74, en éste caso solo un locus tuvo un valor superior a 0.67. En el bivalvo *Crassostrea gigas*, Guo y Gaffney (1993) reportaron un rango de  $y$  de siete alozimas, de 0.56 a 0.86 con el 71% de los valores arriba del máximo teórico esperado; Li y Kijima (2006), para la misma especie obtuvieron para ocho loci microsatélite valores de  $y$  en el rango de 0.62 a 0.77, el 87% de los loci con valores arriba de 0.67; para *Chlamys farreri* Li *et al.* (2009) reportan el rango de  $y$  de 27 loci microsatélite de 0.05 a 0.78, dos loci tuvieron un valor de  $y$  mayor a 0.67 (7.4%). En abulón, con este tipo de

análisis se han reportado valores de  $y$  de alozimas, para *Haliotis diversicolor diversicolor* de 0.08 a 0.36 y para *H. discus hannai* de 0.02 a 0.4 (Fujino *et al.*, 1992). Li y Kijima (2005), para *H. discus hannai* reportan valores de  $y$  de nueve loci microsatélite en un rango de 0.1 a 0.6. Los dos trabajos de abulón concuerdan con los resultados del presente trabajo, en el sentido de que ninguno de los loci analizados tuvo valores arriba del valor teórico máximo esperado (0.67), aunque cabe la aclaración que una de las familias analizadas para dos loci, la familia 1 con *Hdd229* y la familia 5 con *Hka28*, presentaron valores de  $y$  por arriba de 0.67 (0.69 y 0.75, respectivamente); este punto se discutirá más adelante.

#### Proporción de homocigotos (no recombinantes)

Las distorsiones en la segregación de los genotipos no recombinantes (aa y bb) deben ser consideradas, pues la no proporción 1:1 de los homocigotos puede afectar la proporción de heterocigotos ( $y$ ) y por lo tanto, la distancia del marcador al centrómero (Hubert *et al.*, 2009). En trabajos realizados en peces se reporta ninguno muy pocos casos con diferencias significativas en la frecuencia de los genotipos no recombinantes en familias ginogénicas (Thorgaard *et al.*, 1983; Allendorf *et al.*, 1986; Liu *et al.*, 1992; Lindner *et al.*, 2000; Morishima *et al.*, 2001; Matsuoka *et al.*, 2004; Lahrech *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2008) y triploides (Nomura *et al.*, 2006). Allendorf *et al.* (1986), suponen que en los salmónidos la no evidencia de distorsión en los no recombinantes se debe a la duplicidad de loci por su origen tetraploide, que amortigua los posibles efectos deletéreos de alelos recesivos. Por otro lado, aunque los diferentes trabajos coinciden en presentar pocos casos de diferencias significativas en las frecuencias de no recombinantes (homocigotos aa y bb), una explicación para estas desviaciones en peces ginogénicos, es el efecto de la inducción a la ginogénesis, que puede producir organismos homocigotos con reducida viabilidad, probablemente por encontrarse ligados a genes recesivos letales o semiletal (Morishima *et al.*, 2001; Lahrech *et al.*, 2007). Esta misma explicación se da en los trabajos donde han utilizado familias triploides, en crustáceos (Wang *et al.*, 2008) y moluscos (Li & Kijima, 2005, 2006; Li *et al.*, 2009). Los resultados obtenidos en el presente trabajo, concuerdan con los trabajos

previamente citados ya que solamente los homocigotos de la familia 5 en el locus *Hka80* no se ajustaron a una herencia mendeliana (1:1), por lo que este caso se excluyó de los siguientes análisis. Hubert *et al.* (2009), sugieren que los organismos triploides al poseer un tercer set de cromosomas, son menos afectados por esta selección contra loci ligados a genes recesivos deletereos que los ginogenéticos, llegaron a esta conclusión al comparar los resultados de su trabajo, realizado con familias triploides de *Crassostrea gigas*, con otros previos en la misma especie pero con familias ginogenéticas.

### Homogeneidad entre familias

Para que la distancia genética del gen al centrómero, a partir del análisis de varias familias sea más precisa y reproducible, debe haber homogeneidad entre los valores de frecuencias de recombinación de las familias informativas para un locus dado. De los 10 loci analizados en el presente trabajo, en dos loci no hubo homogeneidad entre las familias analizadas (*Hdd229* y *Hka28*). Trabajos en otras especies han tenido resultados similares: Hubert *et al.* (2009), reportan heterogeneidad en nueve de 25 loci analizados en familias triploides de *Crassostrea gigas*, sugiriendo que esta variación entre las familias puede ser el resultado de una reorganización en el cromosoma. De igual manera Matsuoka *et al.* (2004) refieren sus resultados a la posible reorganización en los cromosomas, ellos utilizaron alozimas para analizar distancia del gen al centrómero en diferentes líneas y familias de *Oncorhynchus gorbuscha* y reportan heterogeneidad entre las familias analizadas, en 11 de 38 loci. Esta reorganización en los cromosomas se da por fusiones, fisiones, translocaciones recíprocas, adiciones y deleciones de regiones del genoma, y algunas de estas modificaciones en la estructura del genoma varían los patrones de recombinación (Dumas & Britton-Davidian, 2002; Matsuoka *et al.*, 2004). En el presente estudio la heterogeneidad en las frecuencias de recombinación entre familias refleja la variación en la tasa de recombinación de los progenitores hembras. Las variaciones pueden ser a nivel de regiones específicas del genoma, como es el caso de las familias 1, 3 y 5 (progenitoras 1, 3 y 5), que fueron heterogéneas para los loci *Hco97*, *Hdd229* y *Hka28* pero fueron homogéneas para otros loci. Los loci *Hco97*, *Hdd229* y

*Hka28*, presentaron altas frecuencias de recombinación (0.41, 0.36 y 0.41 respectivamente), que los ubica en zonas medias del cromosoma, con la posibilidad de estar próximos a puntos calientes (“hotspots”), o regiones que presentan mayor frecuencia de intercambio meiótico (Lichten & Goldman, 1995). Estos puntos calientes en el genoma, son una posible causa de la variación entre organismos, trabajos al respecto se han realizado en nemátodos, plantas y mamíferos (humanos y ratones) (Lichten & Goldman, 1995; Mézard, 2006). En el presente trabajo, se observó aún más variabilidad en el locus *Hco97*, en donde una de las familias (familia 1) está en un punto medio de los valores de  $y$  (0.49), lo que le confiere homogeneidad con los valores extremos (0.35 y 0.66 de las familias 3 y 5, respectivamente), pero no hay homogeneidad entre las familias 3 y 5. Las diferencias antes descritas, se ven como ya se señaló, a nivel de regiones o loci del genoma, al presentar esas mismas familias homogeneidad en otros loci. Hay casos donde la diferencia es a nivel individuo, como se observó con la hembra 4 que en todos los loci donde fue informativa presentó una muy baja frecuencia de recombinación ( $y = 0.05$  a  $0.18$ ). La familia 4 fue informativa para los tres loci antes analizados (*Hco97*, *Hdd229* y *Hka28*) y fue descartada de los análisis de homogeneidad por sus valores extremos de  $y$  (0.15, 0.15 y 0.12, respectivamente). Aún excluyendo a la familia 4 de los análisis no hubo homogeneidad en estos loci, lo anterior confirma que éstos se encuentran en una región del cromosoma que tiene gran variación y la hembra 4 en especial, por alguna de las causas anteriormente mencionadas se ve afectada en su tasa de recombinación, porque no se está dando entrecruzamiento en la o las regiones donde se encuentran los loci; o puede haber dobles entrecruzamientos que evitan la recombinación. En el caso de los loci *Hka40* y *Hka56*, no se excluyó la familia 4 para los análisis de homogeneidad ya que para estos loci los valores de  $y$  son muy bajos (0.12 y 0.04 respectivamente) y fueron similares en todas las familias involucradas. Por sus valores bajos de  $y$ , estos loci se encuentran en la región cercana al centrómero donde no hay mucha recombinación, por lo que los valores de la familia 4 para estos loci son coherentes. En el caso de la familia 2, fue informativa para los loci *Hka40*, *Hka56*, *Hka65* y *Hka80*, pero fue descartada de los loci *Hka40* y *Hka80* porque presentó valores de  $y$  muy altos (0.22 y 0.46, respectivamente) en

comparación con el resto de las familias. Contrariamente, para los loci *Hka56* y *Hka65* la familia 2 si fue homogénea con el resto de las familias analizadas. Los loci que presentaron homogeneidad entre todas las familias analizadas, fueron aquellos donde las frecuencias de recombinación fueron muy bajas (*Hka3*, *Hka40*, *Hka56*, *Hka65* y *Hka80*) y que los ubica en la regiones cercanas al centrómero donde se ha confirmado por varios autores que los eventos de entrecruzamiento son poco probables y la hace una región muy estable (Nachman & Churchill, 1996; Malfroy *et al.*, 1997; Choo, 1998, Anderson *et al.*, 1999). Esta puede ser la razón de que las familias involucradas en estos microsátélites presenten homogeneidad. Todos estos puntos analizados confirman la importancia que la recombinación tiene en la variabilidad genética de los organismos, porque aunque faltan muchos estudios para esclarecer todas las dudas existentes sobre el mecanismo que da inicio a ésta, así como su distribución a través del genoma, se tiene claro que la tasa de recombinación puede variar sustancialmente entre especies, entre organismos, entre sexos y entre regiones del genoma (Nachman, 2002; Hubert & Hedgecock, 2004; Jensen-Seaman *et al.*, 2004).

### **7.5 Estimación de la distancia genética (locus al centrómero)**

Existen diferentes funciones para estimar la distancia genética, las cuales están basadas en el grado de interferencia; esto es, que la presencia de un entrecruzamiento inhibe la formación de otro. En los trabajos que estiman la distancia genética de un locus a su centrómero, la función más empleada es la que asume completa interferencia. Esto es, considera que sólo un entrecruzamiento se da entre un par de cromátidas no hermanas. En peces, la mayoría de los trabajos de mapeo del gen al centrómero emplean esta función, pues sus valores de  $y$  se encuentran por arriba de 0.67. Los autores argumentan, que los cromosomas de peces son pequeños por lo que es muy poco común que se genere más de un entrecruzamiento (Thorgaard *et al.*, 1983; Allendorf *et al.*, 1986; Liu *et al.*, 1992; Lindner *et al.*, 2000; Morishima *et al.*, 2001; Matsuoka *et al.*, 2004; Nomura *et al.*, 2006; Lahrech *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2008; Morishima *et al.*, 2008). Otras funciones

asumen una reducción de la interferencia con la distancia (Kosambi, 1944) o cero interferencia (Haldane, 1919), siguiendo una distribución de Poisson. Estas funciones se pueden ajustar mejor a marcadores que se encuentran distantes del centrómero (Martínez *et al.*, 2008). En moluscos, hay trabajos donde asumen completa interferencia para estimar la distancia del gen al centrómero en base a los valores de  $y$  (Guo & Gaffney, 1993; Guo & Allen, 1996). En varios trabajos se usaron las tres funciones para la distancia genética, en moluscos (Li & Kijima, 2005, 2006; Li *et al.*, 2009) y camarón (Wang *et al.*, 2008). En el presente estudio se utilizaron las tres funciones y se estimó la distancia genética en rangos de 0.5 a 28.5 cM, asumiendo completa interferencia; de 0.5 a 32.3 cM, con 50% de interferencia y 0.5 a 42.2 cM, con cero de interferencia, rangos en las distancias genéticas similares a los reportados para *Chlamys farreri* y para *H. discus hannai* (Li & Kijima, 2005; Li *et al.*, 2009). Li y Kijima (2005), concluyen que los loci microsatélite utilizados en *C. farreri* se encuentran distribuidos a lo largo del cromosoma, desde el centrómero hasta el telómero. En contraste, en el presente trabajo la mayoría de los loci se encuentran muy cercanos al centrómero (*Hka3*, *Hka40*, *Hka56*, *Hka65* y *Hka80*).

Por la heterogeneidad en los loci *Hco97*, *Hdd229* y *Hka28*, se manejó un rango (no un valor puntual) de distancia genética; se requiere del análisis de muchos más loci o más familias para poder obtener un resultado más preciso y con ello poder determinar cuál función se ajusta mejor para la estimación de la distancia genética en *H. rufescens*. Tal como lo hicieron en el pez *Scophthalmus maximus*, para el que determinaron (manejando grupos de ligamiento) que para algunos loci se ajustaban mejor las funciones de Kosambi y Haldane las cuales no asumen interferencia (Martínez *et al.*, 2008). Por otro lado, cuando hay heterogeneidad entre familias se sugiere precaución al aplicar completa interferencia para estimar distancias del gen al centrómero (Nachman & Churchill, 1996; Danzmann & Gharbi, 2001).

La frecuencia de recombinación es una herramienta muy útil para inferir el orden de genes en los cromosomas y construir mapas de ligamiento genético. Con el presente estudio se coloca el primer eslabón de la cadena para construir un mapa de ligamiento en abulón rojo. Una aplicación más directa de las frecuencias de

recombinación de los marcadores moleculares tipo microsatélite, es que se puede explorar cuáles son los loci con mayor tasa de recombinación, y que por tanto permitan certificar genética e inequívocamente organismos alotriploides (los provenientes de híbridos y que han sido sometidos a la inducción a la triploidía). Hernández-Ibarra (2008) utilizó los loci *Hco15*, *Hco97* y *Hka28* por tener tasas de recombinación mayores a 0.3 y pudo certificar un promedio de 71% de larvas veliger, como verdaderos alotriploides (progenitor macho *H. fulgens* y progenitor hembra *H. rufescens*).

## 8. CONCLUSIONES

1. La amplificación cruzada de microsatélites identificados en otras especies de abulón, se realizó exitosamente en *Haliotis rufescens*. Se obtuvieron los mejores resultados con los microsatélites aislados en *Haliotis kamtschatkana*.
2. Los diez loci microsatélites evaluados mostraron segregación de acuerdo con la herencia mendeliana. Esto puede ser consecuencia de utilizar larvas veliger (cuatro días desde la fertilización) para el análisis. A esta edad, los organismos aún no se han enfrentado a las etapas donde se seleccionan algunos genotipos.
3. El rango de las frecuencias de recombinación de los 10 loci analizados varió de 0.01 a 0.41, con un promedio de 0.24. Ninguno de los loci tuvo valores de frecuencia de recombinación mayores a 0.67, valor teórico máximo esperado cuando no hay interferencia. Este resultado indica que en *Haliotis rufescens*, las cromátidas de los cromosomas homólogos posiblemente experimentan más de un evento de entrecruzamiento, es decir no hay interferencia completa.
4. La falta de homogeneidad en los loci *Hco97*, *Hdd229* y *Hka28* entre los valores de frecuencias de recombinación de las distintas familias, indica que existen diferencias en las tasas de recombinación entre individuos (para unos loci eran heterogéneas y para otros homogéneas), en regiones o loci específicos del genoma.
5. La familia 4, que presentó muy bajas frecuencia de recombinación en todos los loci analizados, indica que la progenitora de esa familia tiene una baja tasa de recombinación.

6. Los cinco loci donde hubo homogeneidad entre las familias (*Hka3*, *Hka40*, *Hka56*, *Hka65* y *Hka80*) y se pudo hacer el análisis directo de la distancia genética, se encuentran muy próximos al centrómero. Aunque, con los resultados obtenidos no se puede decir si se encuentran en un mismo cromosoma y si se encuentran ligados entre sí.
  
7. Los loci *Hco97*, *Hdd229* y *Hka28*, por no presentar homogeneidad entre las familias informativas, posiblemente se encuentran ubicados en lugares del cromosoma donde hay puntos de alta frecuencia de recombinación pero muy variable.

## 9. RECOMENDACIONES

Hacer una genoteca de *Haliotis rufescens* y posteriormente identificar marcadores moleculares tipo microsatélite, para aumentar el número de loci que puedan ayudar al mapeo genético. Adicionalmente, utilizar otros tipos de marcadores moleculares nucleares.

Aumentar el número de familias así como el número de loci, para robustecer la información y poder iniciar mapas de ligamiento, que en un futuro puedan llevar a la búsqueda de loci de caracteres cuantitativos en esta especie.

Realizar este tipo de trabajos en especies comerciales locales como *Haliotis corrugata* y *Haliotis fulgens*.

## 10.BIBLIOGRAFÍA

- Allendorf, F.W., J.E. Seeb, K.L. Knudsen, G.H. Thorgaard & R.F. Leary. 1986. Gene-centromere mapping of 25 loci in rainbow trout. *The Journal of Heredity*, 77: 307-312.
- Anderson, L.K., A. Reeves, L.M. Webb & T. Ashley. 1999. Distribution of crossing over on mouse synaptonemal complexes using immunofluorescent localization of MLH1 protein. *Genetics*, 151: 1569-1579.
- Ayala, J.F. & J.A.Kiger Jr. 1984. *Genética Moderna*. Fondo Educativo Interamericano, S.A. México, 836 p.
- Baranski, M., S. Loughnan, C.M. Austin & N. Robinson. 2006. A microsatellite linkage map of the blacklip abalone, *Haliotis rubra*. *Animal Genetics*, 37: 563-570.
- Beadle, G.W. & S. Emerson. 1935. Further studies of crossing over in attached-X chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 20: 192-206.
- Beaumont A.R. & K. Hoare, 2003. *Biotechnology and Genetics in Fisheries and Aquaculture*. Blackwell Publishing. Oxford, 176 p.
- Broman, K.W. & J.L. Weber. 2000. Characterization of human crossover interference. *Am. J. Hum. Genet.*, 66: 1911-1926.
- Callen, D.F., A.D. Thompson, Y. Shen, H.A. Phillips, R.I. Richards, J.C. Mulley & G.R. Sutherland. 1993. Incidence and origin of null alleles in the (AC)<sub>n</sub> microsatellite markers. *Am. J. Hum. Genet.*, 52: 922-927.
- Choo, K.H.A. 1998. Why is the centromere so cold. *Genome Research*, 8: 81-82.
- Coleman, A.W. & V.D. Vacquier. 2002. Exploring the phylogenetic utility of ITS sequences for animals: A test case for abalone (*Haliotis*). *J. Mol. Evol.*, 54: 246-257.

- Cruz, P. 2007-2008. Definición de las frecuencias de recombinación en hembras de abulón rojo para múltiples loci de microsatélites, a partir de abulón triploide (*Haliotis rufescens*) y alotriploide (*H. rufescens* x *H. fulgens*). Proyecto CONACYT 52191.
- Cruz, P., A.M. Ibarra, G. Fiore-Amaral, C.E. Galindo-Sánchez & G. Mendoza-Carrión. 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.
- Daniel, W.W. 2004. Bioestadística, base para el análisis de las ciencias de la salud. Limusa-Wiley. 4ª edición. México. 755 p.
- Danzmann, R.G. & K. Gharbi. 2001. Gene mapping in fishes: a means to an end. *Genetica*, 111: 3-23.
- Díaz-Viloria, N. 2009. Conectividad genética entre poblaciones de abulón amarillo (*Haliotis corrugata*; Wood, 1828). Tesis de Doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. México. 152 p.
- Díaz-Viloria, N., R. Pérez-Enríquez, G. Fiore-Amaral, R.S. Burton & P. Cruz. 2008. Isolation and cross-amplification of microsatellites in pink Abalone (*Haliotis corrugata*). *Molecular Ecology Resources*, 8: 701-703.
- Dumas, D. & J. Britton-Davidian. 2002. Chromosomal rearrangements and evolution of recombination: comparison of chiasma distribution patterns in standard and robertsonian populations of the house mouse. *Genetics*, 162: 1355-1366.
- Dunham, R.A. 2004. Gene mapping, quantitative trait locus mapping and marker-assisted selection, 122-140. En: Dunham, R.A. (Ed.) *Aquaculture and Fisheries Biotechnology: Genetic Approaches*. CABI Publishing. Cambridge, 367 p.
- Elliott, N.G. 2000. Genetic improvement programmes in abalone: what is the future? *Aquaculture Research*, 31: 51-59.
- Evans, B. N. Conod & N.G. Elliott. 2001. Evaluation of microsatellite primer conservation in abalone. *Journal of Shellfish Research*, 20(3): 1065-1070.

- Fujino, K., K. Arai, M. Kudo, K. Takahashi, T. Uematsu & S. Okumura. 1992. Estimating rate of gene-centromere recombination at some isozyme loci in *Haliotis diversicolor diversicolor* and *H. discus hannai*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58(3): 445-459.
- Gjedrem, T. & J. Thodesen. 2005. Selection, 89-111. En: Gjedrem, T. (Ed.) Selection and Breeding Programs in Aquaculture.. Springer. Dordrecht, 364 p.
- Gruenthal, K.M., L.K. Acheson & R.S. Burton. 2007. Genetic structure of natural populations of California red abalone (*Haliotis rufescens*) using multiple genetic markers. *Marine Biology*, 152: 1237-1248.
- Guo, X. & S.K. Allen, Jr. 1996. Complete interference and nonrandom distribution of meiotic crossover in a Mollusc, *Mulinia lateralis* (Say). *Biol. Bull.*, 191: 145-148.
- Guo, X. & P.M. Gaffney. 1993. Artificial gynogenesis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: II. Allozyme inheritance and early growth. *The Journal of Herdity*, 84(4): 311-315.
- Gutiérrez-González, J.L., P. Cruz, M.A. Del Rio-Portilla & R. Perez-Enriquez. 2007. Genetic structure of green Abalone *Haliotis fulgens* population off Baja California, Mexico. *Journal of Shellfish Research*, 26 (3): 839-846.
- Haldane J.B.S., 1919. The mapping function. *J. Genet.*, 8: 299-309.
- Hernández-Ibarra, N.K. 2008. Hibridación y alotriploidía en abulón *Haliotis fulgens* y *H. rufescens*. Tesis de Doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. México, 125 p.
- Hubert, S. & D. Hedgecock. 2004. Linkage maps of microsatellite DNA markers for the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genetics*, 168: 351-362.
- Hubert, S., E. Cognard & D. Hedgecock. 2009. Centromere mapping in triploid families of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*, 288: 172-183.

- Hulata, G. 2001. Genetic Manipulations in Aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. *Genetica*, 111: 155-173.
- Ibarra, A.M. 2004-2007. Poliploidía en dos especies de abulón *Haliotis rufescens* y *Haliotis fulgens* del Pacífico Mexicano: auto y alotriploidía auto y alotetraploidía. Proyecto CONACYT 38860-B.
- Ibarra, A.M., J.L. Petersen, T.R. Famula & B. May. 2006. Characterization of 35 microsatellite loci in the Pacific lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) and their cross-species amplification in four other scallops of the Pectinidae family. *Molecular Ecology Notes*, 6: 153-156.
- Jensen-Seaman, M.I., T.S. Furey, B.A. Payseur, Y. Lu, K.M. Roskin, C-F. Chen, M.A. Thomas, D. Haussler & H.J. Jacob. 2004. Comparative recombination rates in the rat, mouse, and human genomes. *Genome Research*, 14: 528-538.
- Johnson, S.L., M.A. Gates, M. Johnson, W.S. Talbot, S. Horne, K. Baik, S. Rude, J.R. Wong & J.H. Postlethwait. 1996. Centromere-linkage analysis and consolidation of the zebrafish genetic map. *Genetics*, 142: 1277-1288.
- Kirby, V.L., R. Villa & D.A. Powers. 1998. Identification of microsatellites in the California red abalone, *Haliotis rufescens*. *Journal of Shellfish Research*, 17(3): 801-804.
- Kirkman, T.W. 1996. Statistics to Use. <http://www.physics.csbsju.edu/stats/>
- Klug, W.S. & M.R. Cummings. 2003. Concepts of Genetics. Pearson Education Inc. Seventh ed. Upper Saddle River, 693 p.
- Kosambi, D.D., 1944. The estimation of map distances from recombination values. *Ann.Eugenics*, 12: 172-175.
- Lahrech, Z., C. Kishioka, K. Morishima, T. Mori, S. Saito & K. Arai. 2007. Genetic verification of induced gynogenesis and microsatellite-centromere mapping in the barfin flounder, *Verasper moseri*. *Aquaculture*, 272S1: S115-S124.

- Lee, Y-H. & V.D. Vacquier. 1995. Evolution and systematics in Haliotidae (Mollusca: Gastropoda): inferences from DNA sequences of sperm lysine. *Marine Biology*, 124: 267-278.
- Li, Q., C. Park & A. Kijima. 2002. Isolation and characterization of microsatellite loci in the Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*. *Journal of Shellfish Research*, 21: 811-815.
- Li, Q., C. Park & A. Kijima. 2003. Allelic transmission of microsatellites and application to kinship analysis in newly hatched Pacific abalone larvae. *Fisheries Science*, 69: 883-889.
- Li, Q. & A. Kijima. 2005. Segregation of microsatellite alleles in gynogenetic diploid Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*). *Marine Biotechnology*, 7: 669-676.
- Li, Q. & A. Kijima. 2006. Microsatellite analysis of gynogenetic families in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 331: 1-8.
- Li, Q., H. Nie & L. Kong. 2009. Microsatellite-centromere mapping in zhikong scallop (*Chamys farreri*) through half-tetrad analysis in D-shaped larvae of gynogenetic diploid families. *Aquaculture*, 293: 29-34.
- Li, Y., M. Cai, Z.Y. Wang, W. Guo, X. Liu, X. Wang & Y. Ning. 2008. Microsatellite-centromere mapping in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) using gynogenetic diploid families. *Marine Biotechnology*, 10: 83-90.
- Lichten, M. & A.S.H. Goldman. 1995. Meiotic recombination hotspots. *Annu. Rev. Genetics*, 29: 423-444.
- Linder, K.R., J.E. Seeb, C. Habicht, K.L. Knudsen, E. Kretschmer, D.J. Reedy, P. Spruell & F.W. Allendorf. 2000. Gene-centromere mapping of 312 loci in pink salmon by half-tetrad analysis. *Genome*, 43: 538-549.
- Liu, Q., A. Goudie, B.A. Simco, K.B. Davis & D.C. Morizot. 1992. Gene-centromere mapping of six enzyme loci in gynogenetic channel catfish. *Journal of Heredity*, 83: 245-248.

- Malfroy, L., M.P. Roth, M. Carrington, N. Borot, A. Volz, A. Ziegler & H. Coppin. 1997. Heterogeneity in rates of recombination in the 6-Mb region telomeric to the human major histocompatibility complex. *Genomics*, 43: 226-231.
- Martínez, P., M. Hermida, B.G. Pardo, C. Fernández, J. Castro, R.M. Cal, J.A. Álvarez-Dios, A. Gómez-Tato & C. Bouza. 2008. Centromere-linkage in the turbot (*Scophthalmus maximus*) through half-tetrad analysis in diploid meiyogogenetics. *Aquaculture*, 280: 81-88.
- Mather, K. 1935. Reductional and equational separation of the chromosomes in bivalents and multivalents. *Journal of Genetics*, 30: 53-78.
- Matsuoka, M.P., A.J. Gharrett, R.L. Wilmot & W.W. Smoker. 2004. Gene-centromere distances of allozyme loci in even- and odd-year pink salmon, (*Oncorhynchus gorbuscha*). *Genetica*, 121: 1-11.
- McBride, S.C. 1998. Current status of abalone aquaculture in the Californias. *J. Shellfish Res.*, 17(3): 593-600.
- McPeck, M.S. & T.P. Speed. 1995. Modeling interference in genetic recombination. *Genetics*, 139: 1031-1044.
- Mézard, C. 2006. Meiotic recombination hotspots in plants. *Biochemical Society*, 34 (4): 531-534.
- Miller K.M., Laberee K., Kaukinen K.H., Li S., Withler E. 2001. Development of microsatellite loci in pinto abalone (*Haliotis kamtschatkana*). *Molecular Ecology Notes*, 1: 315-317.
- Morelos-Castro, R.M. 2008. Aplicación de marcadores moleculares tipo microsatélites en estadios larvarios de moluscos para la certificación de híbridos y análisis de parentesco. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. México, 92 p.
- Morishima, K., I. Nakayama & K. Arai. 2001. Microsatellite-centromere mapping in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Genetica*, 111: 59-69.

- Morishima, K., I. Nakayama & K. Arai. 2008. Genetic linkage map of the loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae). *Genetica*, 132: 227-241.
- Nachman, M.W. 2002. Variation in recombination rate across the genome: evidence and implications. *Current Opinion in Genetics & Development*, 12: 657-663.
- Nachman, M.W. & G.A. Churchill. 1996. Heterogeneity in rates of recombination across the mouse genome. *Genetics*, 142: 537-548.
- Nomura, K., K. Morishima, H. Tanaka, T. Unuma, K. Okuzawa, H. Ohta & K. Arai. 2006. Microsatellite-centromere mapping in the Japanese eel (*Anguilla japonica*) by half-tetrad analysis using induced triploid families. *Aquaculture*, 257: 53-67.
- Ott, J. 1999. Analysis of Human Genetic Linkage. The Johns Hopkins University Press. Third ed. Baltimore, 382 p.
- Petersen, J.L., A.M. Ibarra & B. May. 2009. Thirty-seven additional microsatellite loci in the Pacific lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) and cross-amplification in other pectinids. *Conservation Genet. Resour.* DOI 10.1007/s12686-009-9025-8.
- Ponce-Díaz, G. 2003. Alternativas para Fortalecer la Cadena Productiva de la Pesquería de Abulón. Reporte Técnico. CIBNOR-CONAPESCA. 215 p.
- Ponce-Díaz, G., A. Vega-Velázquez, M. Ramade-Villanueva, G. León-Carballo & R. Franco-Santiago. 1998. Socioeconomics characteristics of the abalone fishery along the west coast of the Baja California Peninsula, México. *J. Shellfish Res.*, 17 (3): 853-857.
- Ramírez, G.R. 1992. Alternativas científicas para la recuperación de los recursos abuloneros de la Baja California, México: administración, biológico pesquera y acualtura, 361-379. En: Sheperd, S.A., M.J. Tegner y S.A. Guzmán del Proó (Eds). Abalone of the world, biology, fisheries and culture. Fishing News Books. Oxford, 608 p.

- Reece, K.S., W.L. Ribeiro, P.M. Gaffney, B. Carnegie & S.K. Allen, Jr. 2004. Microsatellite marker development and analysis in the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*): Confirmation of null alleles and non-Mendelian segregation ratios. *Journal of Heredity*, 95 (4): 346-352.
- Rodzen, J.R., J.J. Agresti, G.J. Tranah & B.P. May. 1989. Agarose overlays allow simplified staining of Polyacrylamide gels. *BioTechniques*, 25: 584.
- Sambrook, E., F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor, New York, --- p.
- Schlötterer, C. & B. Harr. 2001. Microsatellite Inestability. En: *Nature Encyclopedia of Life Sciences*. London: Nature Publishing Group. <http://www.els.net/> [doi:10.1038/npg.els.0000840].
- Sekino, M. & M. Hara. 2001. Microsatellite DNA loci in Pacific abalone *Haliotis discus discus* (Mollusca, Gastropoda, Haliotidae). *Molecular Ecology Notes*, 1: 8-10.
- Sekino, M. & M. Hara. 2007a. Individual assignment tests proved genetic boundaries in a species complex of Pacific abalone (genus *Haliotis*). *Conserv. Genet.*, 8: 823-841.
- Sekino, M. & M. Hara. 2007b. Linkage maps for the Pacific abalone (genus *Haliotis*) based on microsatellite DNA markers. *Genetics*, 175: 945-958.
- Selvamani, M.J.P., S.M. Degnan & B.M. Degnan. 2001. Microsatellite genotyping of individual abalone larvae: Parentage assignment in aquaculture. *Mar. Biotechnol.*, 3: 478-485.
- Streisinger, G., F. Singer, C.Walker, D. Knauber & N. Dower. 1986. Segregation analyses and gene-centromere distances in zebrafish. *Genetics*, 112: 311-319.
- Takagi, M., N. Taniguchi, D. Cook & R.W. Doyle. 1997. Isolation and characterization of microsatellite loci from red sea bream *Pagrus major* and detection in closely related species. *Fisheries Science*, 63(2): 199-204.

- Thorgaard, G.H., F.W. Allendorf & K.L. Knudsen. 1983. Gene-centromere mapping in rainbow trout : High interference over long map distances. *Genetics Society of America*, 103: 771-783.
- Wang, H., F. Li, J. Xiang, C. Zhang & K.Yu. 2008. Microsatellite-centromere distances and microsatellite diversity in different ploidy classes of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Genetica*, 132: 43-50.
- Welshons, W.J. 1955. A comparative study of crossing over in attached-X chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 40: 918-936.
- Whitehouse, H.L.K. 1942. Crossing-over in *Neurospora*. *New Phytologist*, 41(1): 23-62.
- Zar, J.H. 1996. Biostatistical analysis. Third edition. Prentice-Hall Inc. New Jersey, 662 p.

## APÉNDICES

### APÉNDICE I

#### ***Obtención de ADN a partir de tentáculos epipodales de abulones adultos.***

Modificado de Morelos-Castro (2008). Muestras preservadas en alcohol al 70% y almacenadas a 4°C, en tubos para microcentrifuga de 1.7 ml.

1. Colocar sobre un portaobjetos un tentáculo y unas gotas de alcohol al 70% (para evitar que se seque el tejido). Realizar este paso bajo la lupa de un microscopio estereoscópico.
2. Con la ayuda de un bisturí y unas pinzas cortar una pequeña porción del epipodio (aprox. 300  $\mu\text{m}$ ).
3. Colocar el pedazo de tejido en un tubo para PCR de 200  $\mu\text{l}$ .
4. Dejar los tubos con el tejido bajo la luz de la lupa por aproximadamente 20 min para que se evapore el alcohol.
5. Agregar 20  $\mu\text{l}$  de buffer de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 8.5; KCl 50 mM; Tween-20 0.5%).
6. Agregar 5  $\mu\text{l}$  de proteinasa K 2.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (concentración final en la reacción, 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ).
7. Dar un pulso en la centrifuga a 3700 RPM y dejar incubando toda la noche a 55°C.
8. Poner a incubar por 10 min a 95°C para inactivar la proteinasa K.
9. Guardar a -20°C hasta su utilización como templado de ADN.

## APÉNDICE II

**Obtención de ADN a partir de larvas veliger de abulón.** Modificado de Morelos-Castro (2008). Muestras almacenadas en alcohol al 70% y almacenadas a 4°C, en tubos para microcentrífuga de 1.7 ml.

1. Invertir suavemente un par de veces el tubo donde están almacenadas las larvas para resuspenderlas.
2. Con una micropipeta de 0.1 a 10  $\mu$ l, tomar una muestra de 2  $\mu$ l del sobrenadante.
3. Colocar la muestra en un portaobjetos bajo la lupa del microscopio estereoscópico.
4. Agregar 2  $\mu$ l de alcohol al 70%.
5. Con la micropipeta fijada en 2  $\mu$ l, tomar individualmente cada larva y colocarla en una placa para PCR de 96 posos. Seguir un orden en la placa para identificar las larvas diploides y triploides (ver figura 1). Mantener un orden, facilita el manejo de las muestras para la amplificación y electroforesis de las larvas, principalmente cuando se utilizan pipetas multicanal.
6. Colocar en cada placa 90 larvas de cada familia (30 diploides y 60 triploides).
7. Dejar la placa con las larvas, bajo la luz de la lupa por 20 min para que se evapore el alcohol.
8. Agregar a cada larva (cada poso de la placa) 20  $\mu$ l del buffer de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 8.5; KCl 50 mM; Tween-20 0.5%).
9. Agregar 5  $\mu$ l de proteinasa K 2.5  $\mu$ g/ $\mu$ l (concentración final en la reacción, 5  $\mu$ g/ $\mu$ l).
10. Dar un pulso en la centrifuga a 3700 RPM y dejar incubando aproximadamente 18 horas a 55°C.

11. Poner a incubar por 10 min a 95°C para inactivar la proteinasa K.

12. Guardar a -20°C hasta su utilización como templado de ADN.

Fig. 1 Orden de larvas veliger en placa de 96 pozos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
<b>A</b>	1	2	3	25	26	27	19	20	21	43	44	45	<b>A</b>
<b>B</b>	4	5	6	28	29	30	22	23	24	46	47	48	<b>B</b>
<b>C</b>	7	8	9	1	2	3	25	26	27	49	50	51	<b>C</b>
<b>D</b>	10	11	12	4	5	6	28	29	30	52	53	54	<b>D</b>
<b>E</b>	13	14	15	7	8	9	31	32	33	55	56	57	<b>E</b>
<b>F</b>	16	17	18	10	11	12	34	35	36	58	59	60	<b>F</b>
<b>G</b>	19	20	21	13	14	15	37	38	39				<b>G</b>
<b>H</b>	22	23	24	16	17	18	40	41	42				<b>H</b>
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	



Larvas veliger 2n



Larvas veliger 3n

### **APÉNDICE III**

***Electroforesis en geles de poliacrilamida (5%, 7.5 m urea).*** Modificado de Sambrook *et al.* (1989).

Preparación del molde. El molde consiste de dos placas de vidrio, una completa y una con muesca (pueden ser de 200 x 450 mm o de 340 x 450 mm). Entre ellas van unos separadores de vidrio que dan el espesor del gel (generalmente de 0.4 mm)

1. Colocar las placas de vidrio sobre una superficie horizontal. La placa completa debe estar muy bien nivelada.
2. Limpiar las placas con alcohol de caña. Utilizar un paño de papel suave que no ralle los vidrios. Esperar a que sequen.
3. Verter sobre la placa con muesca unas gotas de antiadherente (Rain-X) y difundirlo con el paño de papel sobre toda la superficie de la placa. Esperar a que seque.
4. Colocar los separadores en la placa completa. Poner unas gotas de agua destilada entre los separadores y el vidrio para que se adhieran y no se deslicen.

Preparación del gel de acrilamida. Se prepara a partir de una solución de acrilamida al 5% y urea 7.5 M.

1. Dependiendo del tamaño del gel, verter 30 o 60 ml de acrilamida en un vaso de precipitado de 100 ml.
2. Agregar 150-300 µl de APS al 10% y 15-39 µl de TEMED.
3. Agitar ligeramente unos segundos (mezclando bien las soluciones).
4. Verter un poco de acrilamida sobre el vidrio completo y empezar a deslizar el vidrio con muesca sobre los separadores. La acrilamida se debe ir esparciendo entre los vidrios.

5. Continuar agregando acrilamida y deslizando suavemente el vidrio hasta que las placas de vidrio queden alineadas, evitando se formen burbujas en la acrilamida.
6. Colocar un “peine” de manera invertida en la parte superior (donde queda la muesca) para generar un espacio, donde posteriormente se cargaran las muestras.
7. Colocar tres o cuatro pinzas a lo largo del “peine” para que quede fijo al gel.
8. Esperar de 30 a 40 min para que polimerice el gel. Se puede verificar en el excedente de acrilamida que queda en el vaso de precipitado.

#### Electroforesis.

1. Retirar pinzas y el “peine” de las placas de vidrio.
2. Enjuagar con agua corriente las placas de vidrio (conteniendo el gel), por la parte exterior para quitar excedentes de acrilamida. Al final enjuagar con agua destilada.
3. Montar el gel en la cámara de electroforesis correspondiente.
4. Llenar las charolas con solución amortiguadora TBE 1X.
5. Verificar que el sistema no tiene fugas de solución amortiguadora.
6. Conectar la cámara a una fuente de poder eléctrica y correr a 2400 voltios, 100 miliamperes y 80 watts.
7. Precalentar el gel hasta que alcance 50-55°C (aprox. 30 min.).
8. En tanto se precalienta el gel, agregar a los productos de PCR un volumen igual de “tinte de cargado” (azul de bromofenol 0.3%, xilene cianol 0.3%, formamida 98%).

9. Desnaturalizar el ADN, calentando por 5 min a 95°C.
10. Cuando el gel alcanza la temperatura de precalentado, desconectar el sistema y con una pipeta pasteur de plástico quitar restos de urea y acrilamida de la ranura donde se colocaran los productos de PCR.
11. Colocar el “peine”, procurando que la punta de los “dientes” entre apenas al gel. La separación entre cada “diente” es un carril por donde migrará la muestra de un producto de PCR.
12. Colocar 3-4 µl de las muestras en cada carril del gel. Cuando sea el caso, colocar también en uno o dos carriles un marcador molecular (“escalera”) de tamaño conocido para identificar los tamaños de los fragmentos de ADN amplificados.
13. Reanudar la corrida de electroforesis a las mismas condiciones eléctricas antes señaladas.
14. Dependiendo del tamaño de los fragmentos amplificados dejar correr la electroforesis de 2 a 3 horas. El azul de bromofenol es una buena guía ya que avanza a la velocidad de un fragmento de 130 pb.
15. Apagar el sistema y desconectar la cámara de la fuente de poder.
16. Desmontar el gel.
17. Apoyadas las placas de vidrio de manera horizontal, remover cuidadosamente el vidrio con muesca. El gel debe quedar fijo al vidrio completo.
18. Proseguir con el método de visualización.

## **APÉNDICE IV**

***Visualización de microsatélites en analizador de imágenes FMBIO III.*** Modificado de Rodzen *et al.* (1989)

1. Colocar en un matraz erlenmeyer 40 ml de agua destilada y 0.8 g de agarosa y calentar 2 min en microondas a potencia alta.
2. Colocar en un matraz erlenmeyer 30 ml de agua destilada y 0.5 µl de Sybr gold (10,000 X).
3. Inmediatamente que la agarosa sale del microondas mezclar con la solución de Sybr gold y agitar por unos segundos.
4. Verter la mezcla sobre el gel de acrilamida, principalmente en la zona donde se encuentran los productos de PCR.
5. Dejar incubar en oscuridad por 15 min.
6. Observar y documentar los fragmentos de ADN en un escáner. En este caso en el escáner y analizador de imagen FMBIO III.

## **APÉNDICE V**

**Reacciones de amplificación y condiciones de amplificación de los loci analizados.** Modificados de Miller *et al.* (2001). En todas las reacciones se utilizó 0.5 µl de templado y un volumen total de reacción de 11 µl. En la amplificación de progenitores no se utilizó BSA.

### ***Hco15 y Hco97***

Solución de amplificación (reacción).

<b>REACTIVOS</b>	<b>CONCENTRACIÓN FINAL EN LA REACCIÓN</b>
Buffer 10X (Para Taq.).....	1X
MgCl <sub>2</sub> (50 mM).....	1.5 mM
Mezcla de dNTP's (10 mM).....	0.2 mM
Primer Forward (10 µM).....	0.48 µM
Primer Reverse (10 µM).....	0.48 µM
BSA (5 mg/ml).....	0.2 mg/ml
Taq polimerasa (5 u/ µl).....	0.024 u/ µl

Condiciones para la amplificación.

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Desnat. inicial	95° C	2 min	1
Desnaturalización	94° C	30 seg	
Alineamiento	61° C	30 seg	40
Extensión	72° C	45 seg	
Extensión final	72° C	2 min	1

## **Hdd229**

Solución de amplificación (reacción).

<b>REACTIVOS</b>	<b>CONCENTRACIÓN FINAL EN LA REACCIÓN</b>
Buffer 10X (Para Taq.).....	1X
MgCl <sub>2</sub> (50 mM).....	1.5 mM
Mezcla de dNTP's (10 mM).....	0.2 mM
Primer Forward (10 µM).....	0.48 µM
Primer Reverse (10 µM).....	0.48 µM
BSA (5 mg/ml).....	0.2 mg/ml
Taq polimerasa (5 u/ µl).....	0.025 u/ µl

Condiciones para la amplificación.

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Desnat. inicial	95° C	4 min	1
Desnaturalización	94° C	30 seg	
Alineamiento	55° C	30 seg	40
Extensión	72° C	45 seg	
Extensión final	72° C	10 min	1

### **Hka3 y Hka40**

Solución de amplificación (reacción).

<b>REACTIVOS</b>	<b>CONCENTRACIÓN FINAL EN LA REACCIÓN</b>
Buffer 10X (Para Taq.).....	1X
MgCl <sub>2</sub> (50 mM).....	1.5 mM
Mezcla de dNTP's (10 mM).....	0.2 mM
Primer Forward (10 µM).....	0.48 µM
Primer Reverse (10 µM).....	0.48 µM
BSA (5 mg/ml).....	0.2 mg/ml
Taq polimerasa (5 u/ µl).....	0.025 u/ µl

Condiciones para la amplificación.

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Desnat. inicial	95° C	2 min	1
Desnaturalización	94° C	30 seg	
Alineamiento	52° C	30 seg	40
Extensión	72° C	45 seg	
Extensión final	72° C	10 min	1

## **Hka28 y Hka56**

Solución de amplificación (reacción).

<b>REACTIVOS</b>	<b>CONCENTRACIÓN FINAL EN LA REACCIÓN</b>
Buffer 10X (Para Taq.).....	1X
MgCl <sub>2</sub> (50 mM).....	2.0 mM
Mezcla de dNTP's (10 mM).....	0.2 mM
Primer Forward (10 µM).....	0.48 µM
Primer Reverse (10 µM).....	0.48 µM
BSA (5 mg/ml).....	0.2 mg/ml
Taq polimerasa (5 u/ µl).....	0.025 u/ µl

Condiciones para la amplificación.

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Desnat. inicial	95° C	2 min	1
Desnaturalización	94° C	30 seg	
Alineamiento	54° C	30 seg	35
Extensión	72° C	45 seg	
Extensión final	72° C	2 min	1

## ***Hka65 y Hka85***

Solución de amplificación (reacción).

<b>REACTIVOS</b>	<b>CONCENTRACIÓN FINAL EN LA REACCIÓN</b>
Buffer 10X (Para Taq.).....	1X
MgCl <sub>2</sub> (50 mM).....	2.0 mM
Mezcla de dNTP's (10 mM).....	0.2 mM
Primer Forward (10 µM).....	0.48 µM
Primer Reverse (10 µM).....	0.48 µM
BSA (5 mg/ml).....	0.2 mg/ml
Taq polimerasa (5 u/ µl).....	0.025 u/ µl

Condiciones para la amplificación.

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Desnat. inicial	95° C	2 min	1
Desnaturalización	94° C	30 seg	
Alineamiento	55° C	30 seg	40
Extensión	72° C	60 seg	
Extensión final	72° C	2 min	1

## **Hka80**

Solución de amplificación (reacción).

<b>REACTIVOS</b>	<b>CONCENTRACIÓN FINAL EN LA REACCIÓN</b>
Buffer 10X (Para Taq.).....	1X
MgCl <sub>2</sub> (50 mM).....	1.5 mM
Mezcla de dNTP's (10 mM).....	0.2 mM
Primer Forward (10 µM).....	0.48 µM
Primer Reverse (10 µM).....	0.48 µM
BSA (5 mg/ml).....	0.2 mg/ml
Taq polimerasa (5 u/ µl).....	0.025 u/ µl

Condiciones para la amplificación.

<b>Etap</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Desnat. inicial	95° C	2 min	1
Desnaturalización	94° C	30 seg	
Alineamiento	54° C	30 seg	35
Extensión	72° C	45 seg	
Extensión final	72° C	2.5 min	1