



Universidad del Mar
Campus Puerto Ángel

**Utilidad de loci microsatelitales nucleares de
Pocillopora spp, como herramientas para análisis de
diversidad genética en *Pavona gigantea*
(Scleractinia: Agariciidae)**

T E S I S

Que como requisito para obtener el título de Licenciado
en Biología Marina

Presenta:

Nayeli Escudero Castelán

Director:

Dr. Rolando Cardeña López

Puerto Ángel, Oaxaca. Agosto de 2013.

Ciudad Universitaria; Puerto Ángel, Oaxaca a 12 de julio de 2013

M. en C. Ana María Torres Huerta
Jefe de la carrera de Biología Marina
De la Universidad del Mar
Presente

Acta de revisión de tesis

Por este conducto le comunicamos que, después de haber analizado y evaluado la tesis **“Utilidad de loci microsatelitales nucleares de *Pocillopora* spp, como herramientas para análisis de diversidad genética en *Pavona gigantea* (Scleractinia: Agariciidae)”** presentada por la PBM Nayeli Escudero Castelán con número de matrícula 06020015, consideramos que cumple con los requisitos académicos para que la citada tesista presente el correspondiente examen profesional.

Sin más por el momento, quedamos de Usted.

Atentamente

Dr. Rolando Cardeña López
Director



Dr. Ramón Andrés López Pérez
Revisor

M. en C. Edgar César Montesinos
Gómez
Revisor

MAIA. Eduardo Juventino Ramírez
Chávez
Revisor

Ocean. Miguel Ángel Ahumada Sempoal
Reviso

Dedicatoria

A mi ángel guardián, mi mamá Magos,
 hace mucho tiempo que te fuiste,
 adelantaste tu camino,
 de ti heredé la fuerza para seguir adelante,
 y te lo agradezco con todo mi corazón.
 Tardé mucho tiempo, y sé que te lo debía
 Este es mi tributo para tí..
 Esta tesis es para tí mamá donde quiera que estés
 sé que me estas viendo
 y espero que estés orgullosa de mí.

A la persona que más admiro en el mundo,
 a mi papá Gemo,
 me enseñaste que la herencia más grande que un padre
 puede darle a un hijo es el estudio, gracias.
 Todo este tiempo has sido mi sostén,
 mi lugar seguro...
 Esta tesis es para tí por todo el apoyo, el cariño y
 la confianza que depositaste en mí.

A mis dos angelitos, mis hermanos Joaquín y Ana,
 sin ustedes mi vida hubiese sido más triste y aburrida
 siempre me dieron fuerza para seguir adelante
 y a pesar de los obstáculos y pasara lo que pasara
 siempre han estado allí para mí..
 Quiero que se sientan orgullosos de su hermana mayor
 es para ustedes también por ser mi luz y mi fuerza.

A mis segundos papás, Ricardo y Luz,
 esta es mi manera de decirles
 gracias por no cerrarme las puertas de su casa,
 por haberme devuelto la sonrisa en los momentos más
 difíciles, por ayudarme a no abandonar mi camino y
 no dejarme caer..
 Es para ustedes por todos los pedacitos de felicidad que
 me han regalado.

A todos ustedes los amo con todo mi corazón.

NO DESISTAS
 Cuando vayan mal las cosas
 como a veces suelen ir,
 cuando ofrezca tu camino
 solo cuestras que subir,
 cuando tengas poco haber,
 pero mucho que pagar,
 y precises sonreír
 aún teniendo que llorar;
 cuando ya el dolor
 te agobie y no puedas ya sufrir;
 descansar acaso debas
 pero nunca desistir.

Tras la sombra de la duda
 ya plateada ya sombría,
 da pues seguir al triunfo
 no al fracaso que temías,
 y no es dable a tu ignorancia
 figurarse cuan cercano puede estar
 el bien que anhelas;
 y que juzgas tan lejano.

Lucha pues, por más que tengas
 en la brega que sufrir.
 Cuando todo esta peor,
 ¡más debemos insistir !

RUDYARD KIPLING

Reconocimientos

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Genética de la Universidad del Mar campus Puerto Ángel, bajo la dirección del Dr. Rolando Cardeña López. Su financiamiento, así como una beca de la sustentante, provinieron del Fondo Sectorial SEP-CONACyT a través del proyecto “Entendiendo los procesos que garantizan la perpetuidad de los sistemas arrecifales. Reproducción, reclutamiento, supervivencia y conectividad de corales arrecifales en la costa de Oaxaca.”, asignado al Dr. Ramón Andrés López Pérez con clave CB-2007-80228-Q.

Agradecimientos

A mi director y comité de revisores por sus consejos y aportaciones que me permitieron mejorar este trabajo y sacarle todo el provecho posible.

A Edgarín, el técnico de laboratorio de genética por sus enseñanzas, su apoyo en el trabajo de laboratorio e infinita paciencia.

A los servicios sociales, Jessica, Mariano y Pantín, que ayudaron con el trabajo pesado de la tinción de los geles.

A mis profesores que contribuyeron en mi educación y me orientaron en el ámbito profesional.

A mi familia que siempre estuvo apoyándome y dándome ánimos para continuar adelante.

A mi kachan por todo el apoyo, las risas y sobre todo por escucharme cuando lo necesitaba.

A mis mejores amigas y amigos que estuvieron conmigo en las buenas y en las malas.

A mis compañeros de la generación 2006-2011 de biología marina, fuimos un excelente grupo.

Índice

Índice.....	iv
Índice de figuras	vi
Índice de tablas.....	vii
Resumen	1
1. Introducción	2
2. Marco Teórico.....	3
2.1 Generalidades de <i>Pavona gigantea</i>	3
2.1.1 Biología.....	3
2.1.2 Distribución	3
2.1.3 Taxonomía.....	4
2.2 Reacción en cadena de la polimerasa.....	5
2.2.1 Definición.....	5
2.2.2 Parámetros que controlan la PCR.....	6
2.2.2.1 Polimerasa	6
2.2.2.2 Solución amortiguadora.....	7
2.2.2.3 Iniciadores o cebadores	8
2.2.2.4 Concentración de dNTPs.....	9
2.2.2.5 Concentración del ión Mg ⁺⁺	9
2.2.2.6 Concentración del ADN molde	9
2.2.2.7 Perfil de temperaturas	10
2.2.3 Aplicaciones de la PCR.....	10
2.3 Marcadores genéticos moleculares	11
2.3.1 Marcadores dominantes y codominantes.....	11
2.3.2 Clasificación.....	12
2.3.2.1 Marcadores no basados en PCR.....	12
2.3.2.1.1 Polimorfismos de Longitud en Fragmentos de Restricción (RFLP).....	12
2.3.2.1.2 Minisatélites, Número Variable de Repeticiones en Tándem (VNTR)..	12
2.3.2.2 Marcadores basados en PCR.....	13
2.3.2.2.1 Técnicas que involucran secuenciamiento	13
2.3.2.2.2 Técnicas que amplifican múltiples fragmentos anónimos	13
2.3.2.2.3 Técnicas que amplifican regiones genómicas conocidas	14

2.3.3 Microsatélites	15
2.4 Electroforesis	17
3. Antecedentes.....	19
3.1 Estudios de filogenia molecular en corales pétreos	19
3.2 Estudios basados en marcadores genéticos de la familia Agariciidae	20
3.2.1 Estudios basados en marcadores genéticos en el género <i>Pavona</i>	20
3.3 Estudios sobre microsatélites en especies emparentadas con la familia Agariciidae	21
3.3.1 Género <i>Acropora</i>	21
3.3.2 Género <i>Pocillopora</i>	23
4. Justificación	24
5. Hipótesis.....	25
6. Objetivos.....	26
6.1 General	26
6.2 Específicos.....	26
7. Materiales y método.....	27
7.1 Área de estudio	27
7.2 Obtención de muestras	30
7.3 Extracción de ADN	30
7.4 Análisis microsatelital	31
7.4.1 Amplificación por PCR.....	31
7.4.2 Electroforesis y visualización de ADN.....	33
8. Resultados y discusión	34
8.1 Extracción de ADN	34
8.2 Análisis de microsatélites	36
8.2.1 Optimización de la amplificación por PCR.....	36
8.2.1.1 Evaluación de temperaturas de alineamiento	36
8.2.1.2 Evaluación de concentraciones de MgCl ₂	37
8.2.2 Pruebas de resolución electroforética	37
8.3 Caracterización de la variación.....	39
9. Conclusiones	44
10. Referencias.....	45

Índice de figuras

Figura 1. Distribución de <i>Pavona gigantea</i> . Tomado de Veron (2000).	4
Figura 2. Localidades de muestreo. 1) Morro del cerro Colorado, 2) Zacatoso, 3) Caleta de Chon, 4) Palmitas, 5) Manzanillo, 6) Morro de Potosí, 7) Ripial, 8) El Faro, 9) Puerto Angelito, 10) La Mina, 11) Playa del Muerto, 12) La Tijera, 13) San Agustín, 14) Isla San Agustín, 15) Jicaral, 16) Dos Hermanas, 17) La India, 18) Maguey, 19) Violín, y 20) La Entrega.	29
Figura 3. Extractos de ADN con calidad variable, analizados mediante electroforesis en gel de agarosa. 0, no se detectó ADN; 1, fragmentación mínima a moderada; 2, fragmentación evidente pero con ADN cromosómico detectable; 3, fragmentación evidente con predominancia de fragmentos de bajo peso molecular; 4, ADN completamente fragmentado. Negativo de la fotografía original.	34
Figura 4. Efecto de la temperatura de hibridación sobre los patrones de amplificación de varios loci. M, estándares con tamaño expresado en pb.	36
Figura 5. Patrones de bandeo derivados de una prueba de titulación de MgCl ₂ . Se presentan amplicones de un individuo para el locus I. La concentración de MgCl ₂ se expresa en mM. M, estándares con tamaño expresado pb; Pd, individuo de <i>Pocillopora damicornis</i> usado como control positivo. La casilla señala al amplicón más intenso. Negativo de la fotografía original.	37
Figura 6. Resolución lograda para amplicones de los loci G y F. A) Locus G, electroforesis no desnaturalizante en geles al 6%, 6 h de separación a 150 V; B) Locus F, electroforesis no desnaturalizante en geles al 8%, 14.5 h de separación a 150 V; C) Locus F, electroforesis desnaturalizante en geles al 4.8%, 3.5 h de separación a 50-70 W. M estándares con tamaño expresado en pb; en verde se enmarca el área de interés para cada locus.	38
Figura 7. Patrones de bandeo observados en individuos de <i>P. gigantea</i> . Cada letra minúscula representa un individuo. A) Locus A (un solo individuo); B) locus F; C) locus G; D) locus I. M, estándares con tamaño expresado en pb. En verde, el área de interés; en rojo, un individuo de <i>Pocillopora damicornis</i> usado como control positivo.	40

Índice de tablas

Tabla I. Propiedades de polimerasas de ADN termoestables comerciales. Tomado de Surzycki (2000).	7
Tabla II. Área de estudio.	27
Tabla III. Iniciadores para loci microsatelitales nucleares del género <i>Pocillopora</i> . 31	
Tabla IV. Concentraciones de reactivos en mezcla de reacción para PCR.	32
Tabla V. Cantidad de muestras recolectadas, y de extractos de ADN potencialmente útiles para PCR, por localidad. En negritas se resaltan las localidades seleccionadas para los análisis genéticos.....	35
Tabla VI. Criterios de selección aplicados a los loci evaluados.....	43

Resumen

Pavona gigantea se distribuye únicamente en el Pacífico Oriental, es un coral pétreo que forma colonias masivas. Para elucidar cuestiones de genética poblacional de corales se han utilizado marcadores moleculares del tipo de los microsatélites nucleares empleando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Los iniciadores son los elementos que definen los límites y la especificidad de la amplificación deseada. Cuando estos se han desarrollado a partir del genoma de la especie que se va a estudiar, su especificidad es muy alta y se dice que son homólogos; o pueden usarse iniciadores heterólogos, que son aquellos desarrollados a partir del genoma de una especie diferente y por tanto su eficiencia en la amplificación será menor. El diseño de iniciadores es una tarea difícil, y hasta el momento no se ha diseñado ninguno para ADN microsatelital de la familia Agariciidae. Debido a esto se decidió evaluar la utilidad de loci microsatelitales diseñados para el género de coral *Pocillopora*, como herramientas en análisis de diversidad genética de *P. gigantea*. Se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 3 cm³ del coral *P. gigantea*, de 13 localidades de Oaxaca y siete de Guerrero. Las muestras fueron fijadas con etanol al 95% o con un fijador a base de dimetil-sulfóxido. El ADN se extrajo usando un protocolo a base de cloroformo-alcohol isoamílico. La calidad de los extractos se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa. Se evaluaron iniciadores para nueve loci microsatelitales nucleares, seis de *Pocillopora damicornis* y tres de *Pocillopora verrucosa*. Las amplificaciones y la visualización de los amplicones fueron optimizados modificando parámetros de la PCR (temperatura de hibridación, concentración de MgCl₂) y de la electroforesis (geles desnaturizantes y no desnaturizantes, concentración de poliacrilamida, tiempos de separación, voltaje). Se lograron mejoras en la amplificación de los nueve loci y en la resolución electroforética de los amplicones de interés. En este último aspecto, el efecto más notorio fue atribuible al uso de geles desnaturizantes. Se identificaron dos loci, Pd2-006 y PV2, como herramientas potencialmente útiles para estudios de variación genética en *P. gigantea*. En el caso del locus Pd2-006, se requieren estudios adicionales que determinen cuáles de sus múltiples amplicones son de tipo alélico. El aparente monomorfismo del locus PV2 sugiere de manera muy preliminar que la variación de *P. gigantea* en el área de estudio es baja.

Palabras Clave: *Pavona gigantea*, *Pocillopora*, iniciadores heterólogos, PCR, temperatura de hibridación, titulación de MgCl₂.