

UNIVERSIDAD DEL MAR

Campus Puerto Ángel



**VARIACIÓN GENÉTICA DE ESPECIES DE LENGUADOS (ORDEN:
PLEURONECTIFORME) EN LAS CERCANÍAS DE LA ZONA DE EXCLUSIÓN
DE PEMEX EN LA SONDA DE CAMPECHE**

TESIS

Para obtener el Título Profesional de
LICENCIADA EN BIOLOGÍA MARINA

Presenta

Gloria Lorena Velásquez Mejía

Director

M. C. Jesús Alejandro Zamora Briseño

Codirector

Dr. Rolando Cardeña López

Ciudad Universitaria, Puerto Ángel, Oaxaca, México, 2018.

RESUMEN

La Zona de Exclusión de PEMEX en la Sonda de Campeche cuenta una alta diversidad de organismos marinos, dentro de los cuales se encuentran los lenguados, que forman parte del bentos y juegan un rol importante en las redes tróficas. Son altamente susceptibles a perturbaciones en el fondo oceánico debido al ingreso de contaminantes, como los hidrocarburos y sus derivados, presentes en esta área por las diversas actividades petroleras. Por lo que el objetivo principal del presente trabajo de investigación fue caracterizar la variación genética de los lenguados para evaluar su estructura génica. A partir de muestras de sangre se extrajo DNA y se realizó una PCR para amplificar la región Folmer del gen COI del mtDNA. Los amplicones fueron evaluados mediante electroforesis en geles de agarosa y secuenciados por el método de Sanger obteniendo 317 secuencias de 565 pb. Mediante el uso de la base de datos BOLD se identificaron siete especies y las tres más abundantes (*Syacium gunteri*, *S. papillosum* y *Cyclosetta chittendeni*) fueron usadas para los análisis subsecuentes. En *S. gunteri* la red de haplotipos evidenció 60 haplotipos con uno predominante (57%), sugiriendo la existencia de un flujo génico considerable. La red de *S. Papillosum* mostró 50 haplotipos con uno sobresaliente (36%); mostró múltiples vectores interconectados (ciclos) indicando que las secuencias fueron incapaces de resolver los caminos evolutivos. La red de *C. chittendeni* presentó 20 haplotipos con uno mayoritario (48%) dando origen a múltiples haplotipos únicos; en conjunto esto sugiere un cuello de botella reciente y considerable flujo génico. Las tres especies presentaron una elevada variabilidad, resultados similares se han reportado en otras especies de lenguados. El AMOVA mostró que ninguna de estas presentó estructura génica significativa, y los valores F_{ST} posteriores a la corrección de Bonferroni tampoco fueron significativos; el no haber detectado subpoblaciones pudo deberse a la baja variabilidad intraespecífica del locus analizado, sin embargo este fue muy útil para identificar especies. La detección de estructura genética podría requerir el análisis de loci más variables.

Palabras clave: AMOVA, Folmer, haplotipo, mtDNA, *Syacium*, variabilidad genética

ABSTRACT

The Exclusion Zone of PEMEX is an ecosystem with a high diversity of marine organisms, such as flounders, that are part of the benthos and play an important role in the trophic networks. Also, they are highly susceptible to disturbances in the ocean floor such as the presence of pollutants, for example hydrocarbons and their derivatives, which are common in this area as a consequence of petroleum extraction activities. Therefore, the objective of this thesis is the characterization of the genetic variation and the genetic structure of the flounders. Through DNA samples, gDNA was extracted and PCR was performed to amplify the Folmer region of the COI gene of the mtDNA. The amplicons were evaluated by electrophoresis in agarose gels and sequenced by the Sanger method obtaining 317 sequences of 565 bp. Through the BOLD database seven species were identified, and the three most abundant (*Syacium gunteri*, *S. papillosum* and *Cyclopsetta chittendeni*) were used for further analyzes. For *S. Gunteri* the haplotype network showed 65 haplotypes, one predominant (57%) suggesting a high gene flow. The network for *S. papillosum* showed 50 haplotypes, the most representative with 36%; also a multiple interconnected vectors (loops) were shown, indicating the sequences are described inefficiently for solving evolutionary patterns. *C. Chittendeni* network showed 20 haplotypes, one predominant (48%) originating unique multiple haplotypes, which suggest a recent bottleneck and considerable gene flow. The three species present a high variability, and similar results have been reported previously in other flounder species. The AMOVA analysis revealed an insignificant structure for the species. The F_{ST} pairwise comparisons after the Bonferroni corrections analysis were not significant, and the non-detection of subpopulations can be attributed to the low intraspecific variability of the analyzed locus; however, it was useful for the identification of species. The detection of genetic structure can be analysed by more variable loci.

Keywords: AMOVA, Folmer, haplotype, mtDNA, *Syacium*, genetic variability.

DEDICATORIA

A mi madre, mi hermana y abuelito que son mis compañeros de vida y mi motivo de seguir adelante.

Con mucho amor...

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto Implementación de redes de observaciones oceanográficas (físicas, geoquímicas, ecológicas) para la generación de escenarios ante posibles contingencias relacionadas a la exploración y producción de hidrocarburos en México.

A la Dra. Rossana Rodríguez Canul por permitirme trabajar en el Laboratorio de Inmunología y Biología Celular en el Cinvestav Mérida.

A mi director el M. C. Jesús Alejandro por la invitación y confianza depositada en mí para la realización de esta tesis, además de su valiosa dirección y apoyo brindados durante su elaboración.

Al Dr. Rolando Cardeña y por ser parte fundamental durante mi formación académica y por las revisiones brindadas.

A la Dra. Mónica Améndola por toda la atención brindada durante el análisis de los datos, así como en todas las revisiones.

A mis revisores el M. C. Francisco Villegas Zurita y la M.C. Samantha Gabriela Karam Martínez por las observaciones brindadas en el presente trabajo.

A la Dra. Ariadne Hernández Pérez por la elaboración del mapa y por toda la atención brindada durante mi estancia en Mérida.

A todo el equipo del Laboratorio de Inmunología y Biología Celular del Cinvestav en especial a la M. C. Ioreni, Irma, Mariana, Erika y Monserrat.

A mis amigos de la universidad en especial a Liliana, Sandra, Dulce, Alondra, Gaby, Abraham (Bob).

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE CUADROS.....	x
ANEXOS.....	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1 BIOLOGÍA DE LOS LENGUADOS	2
2.1.1 Taxonomía y morfología de lenguados	2
2.1.2 Hábitat y alimentación.....	3
2.1.3 Reproducción.....	3
2.1.4 Importancia de los principales géneros de lenguados	4
2.2 Perturbaciones ambientales del hábitat de los lenguados en el Golfo de México	5
2.3 Uso de lenguados como bioindicadores.....	7
2.4 Marcadores moleculares.....	8
2.4.1 DNA mitocondrial	9
2.4.2 Secuenciación por el método de Sanger	11
2.4.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa	11
2.4.3 Citocromo oxidasa I (COI).....	12
2.5 Genética de poblaciones.....	13
1.5.1 Estructura genética	14
2.5.2 Diversidad genética	15
2.6 Estructura geográfica	16
2.6.1 Filogeografía.....	17
2.6.2 Redes de haplotipos	17
2.7 Pruebas estadísticas usadas en la genética de poblaciones.....	18
2.7.1 Estimación de la diversidad haplotípica y nucleotídica.....	18
2.7.2 El Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA)	18
2.7.3 Estadístico F	20

3. ANTECEDENTES.....	20
4. JUSTIFICACIÓN.....	23
5. HIPÓTESIS.....	24
6. OBJETIVOS.....	24
6.1 Objetivo general.....	24
6.2 Objetivos particulares.....	24
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
7.1 Descripción del área de estudio.....	25
7.2 Toma de muestras.....	27
7.3 Extracción de DNA.....	27
7.4 Amplificación y secuenciación de la región Folmer del gen COI.....	29
7.5 Análisis de datos.....	30
8. RESULTADOS.....	31
8.1 DNA y amplificación de la región Folmer.....	31
8.2 Secuencias obtenidas por el método de Sanger.....	32
8.2.1 Identificación de especies en BOLD.....	32
8.3 Aplotipos y Redes haplotípicas.....	33
8.3.1 Haplotipos identificados.....	33
8.3.2 Red de haplotipos.....	33
8.4 Diversidad genética.....	37
8.4.1 Diversidad haplotípica y diversidad nucleotídica.....	37
8.4.2 Análisis de varianza molecular.....	37
8.4.3 Comparaciones pareadas F_{ST}	38
9. DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS.....	38
9.1 Identificación de especies.....	38
9.2 Diversidad genética.....	39
9.2.1 Diversidad haplotípica y nucleotídica.....	39
9.2.2 Estructura genética.....	40
9.2.2.1 <i>S. gunteri</i>	40

9.2.2.2 <i>S. papillosum</i>	41
9.2.2.3 <i>C. chittendeni</i>	42
9.3 Influencia de los factores y perturbación ambientales	43
10. CONCLUSIONES.....	45
11. REFERENCIAS.....	46
12. ANEXOS.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Organización del mtDNA en vertebrados. Las bandas representan los 22 RNA de transferencia y CO indica las subunidades de las citocromo oxidasas (Freeland 2005).	10
Figura 2. Ubicación de la ZEPSC y de las provincias sedimentarias (Soto et al. 2004). 25	
Figura 3. Sitios donde se obtuvieron las muestras mediante una la red de arrastre en la ZEPSC, los cuadros muestran el acercamiento de los sitios de arrastre.	28
Figura 4. Calidad del DNA extraído y observado en geles de agarosa al 1%, MM indica el marcador molecular de 100 pb y los números indican las muestras.	31
Figura 5. Fragmentos de aproximadamente 750 pb resultado de la amplificación de región COI visualizados en geles de agarosa al 2%, MM indica el marcador molecular de 100 pb y los números indican las muestras.	32
Figura 6. Número de individuos y sus haplotipos de las muestras analizadas.	34
Figura 7. Abundancia de especies en los puntos de arrastre dentro de la ZEPS.	35
Figura 8. Red de haplotipos de un fragmento específico del gen COI. Se muestran a las especies: <i>S. gunteri</i> , <i>S. papillosum</i> y <i>C. chittendeni</i> . Los vectores medios están representados con el color amarillo, estos vectores pueden indicar pasos mutacionales, subespecies extintas o no muestreadas los cuales se encuentran indicados con un número, donde esta se encuentra ausente su valor es uno. Por otra parte cada color representa en punto de arrastre.	36

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro I. Fórmulas empleadas para determinar la estructura de la población mediante el AMOVA.	19
Cuadro II. Número de muestras obtenidas, por arrastre, coordenadas, profundidad.	28
Cuadro III. Secuencias de los primers utilizados para la amplificación de la región Folmer.	29
Cuadro IV. Lista de las especies identificadas en BOLD, en negritas se indica el número total.	33
Cuadro V. Análisis de la diversidad h y π para las especies más abundantes de la ZEPSC.....	37
Cuadro VI. AMOVA para <i>S. gunteri</i> de la ZEPSC.....	37
Cuadro VII. AMOVA para <i>S. papillosum</i> de la ZEPSC.....	37
Cuadro VIII. AMOVA para <i>C. chittendeni</i> de la ZEPSC.....	38

ANEXOS

Anexo 1. Comparaciones pareadas F_{ST} valuadas entre los puntos de los arrastres de <i>S. gunteri</i> en la ZEPSC.	61
Anexo 2. Comparaciones pareadas F_{ST} valuadas para los puntos de arrastre de <i>S. papillosum</i> en la ZEPSC.	61
Anexo 3. Comparaciones pareadas F_{ST} valuadas para los puntos donde se realizaron los arrastres de <i>C. chittendeni</i> en la ZEPSC.	62
Anexo 4. Patrón de distribución de <i>S. gunteri</i> en sus diferentes estadios de vida dentro de la Sonda de Campeche, imagen obtenida de Sánchez-Gil et al. 1994.	62