



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del mar

“OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA AFLP PARA DETERMINACIÓN
DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Ucides occidentalis* EN TRES
ZONAS DE MANGLAR DEL GOLFO DE GUAYAQUIL”

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGO

Presentada por:

María Fernanda Ratti Torres

GUAYAQUIL – ECUADOR

2010

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios Todopoderoso y a mi familia por ser el pilar de mi vida y mi inspiración en todas las actividades que realizo. A mamá y papá por apoyarme en todo momento y por heredarme la curiosidad.

Al PhD. Muñoz, MSc. Bedoya y MSc. Landivar, incomparables profesores, por la ayuda prestada en muchos aspectos durante el desarrollo de este estudio.

Al PhD. c Pérez quien se interesó en este trabajo y me brindó todo el apoyo tanto académico como con las instalaciones de su laboratorio.

Al Dr. Chedraui, director del Instituto de Biomedicina de la UCSG y al Blgo. Saúl Escobar quienes me acogieron para realizar parte de mi protocolo práctico.

A la Blga. M. Pozo, por su apoyo con los permisos del MAE, los cuales fueron de mucha importancia para la realización de esta tesis.

Al PhD. Cárdenas por su incondicional apoyo en las instalaciones del Laboratorio de Biomedicina de la FIMCM.

A los cangrejeros de las zonas de estudio quienes aportaron con la recolección de muestras.

A los profesores de la Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar por haberme guiado y permitirme amar la investigación. Especialmente gracias Marcelo.

A mis compañeros de clase en las diferentes materias y aquellos con los que no compartí aula pero que me ayudaron durante la realización de este estudio: R. Jiménez, M. Del Rosario, H. De La Torre, L. Culcay y A. García. Gracias Totales.

DEDICATORIA

A Dios, a mi familia actual: Virgilio, Martha, Andrea y Pablo; y a mi familia futura. Los amo muchísimo.

María Fernanda Ratti Torres

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

MSc. Jerry Landivar Zambrano

DECANO FIMCM

PRESIDENTE

PhD. Marcelo Muñoz Naranjo

DIRECTOR DE TESIS

MSc. Ecuador Marcillo Gallino

VOCAL

DECLARACIÓN EXPRESA

"La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral".

María Fernanda Ratti Torres

RESUMEN

El cangrejo rojo *Ucides occidentalis* es una especie representativa de la fauna de manglar de la costa ecuatoriana. Además este organismo tiene valor comercial y constituye el sustento para muchas familias de pescadores localizadas en el Golfo de Guayaquil. Sin embargo poco se conoce del estado de las poblaciones naturales y de la riqueza genética de esta especie. Por ello, en este estudio se estandarizó una técnica que permitió el uso de marcadores moleculares tipo AFLP para determinar la variabilidad genética de *U. occidentalis*.

Se seleccionaron tres zonas del Golfo de Guayaquil para propósitos de este estudio: Recinto 6 de Julio, Reserva Ecológica Manglares Churute (REMCH) y Reserva de Producción Faunística Manglares El Salado (RPFMS). En cada zona se colectaron 20 individuos. Los valores F_{st} calculados fueron menores a 0.05, con un promedio de 0.0163, indicando poca variabilidad genética entre las poblaciones descritas.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	VII
ÍNDICE GENERAL	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABLAS	XII
ÍNDICE DE ANEXOS	XIV
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1. Descripción de los sitios de estudio	4
1.1. Recinto 6 de Julio	5
1.2. Reserva de Producción Faunística Manglares El Salado	6
1.3. Reserva Ecológica Manglares Churute	6
2. Biología del cangrejo rojo <i>Ucides occidentalis</i>	8
2.1. Taxonomía	12
2.2. Distribución	12

2.3. Información pesquera	13
3. Marcadores Moleculares	15
3.1. Variación genética o polimorfismo	15
3.2. Marcadores moleculares dominantes y codominantes	17
3.3. AFLP	17

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material Biológico	23
2. Extracción de ADN	24
3. Protocolo optimizado AFLP	27
4. Análisis de datos	31

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

1. Amplitud cefalotorácica de las muestras	32
2. Extracción de ADN	34
3. Cuantificación de ADN	35
4. Optimización del sistema AFLP	36
5. Análisis de datos	41

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN	52
------------------	----

CONCLUSIONES	60
RECOMENDACIONES	61
BIBLIOGRAFÍA	62
ANEXOS	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Zonas de Estudio: RPFMS, REMCH y Recinto 6 de Julio	4
Figura 2: Cangrejo rojo <i>Ucides occidentalis</i>	8
Figura 3: Artefacto utilizado para la captura de <i>U. occidentalis</i>	14
Figura 4: Huella genética AFLP para ADN de tomate con distintos juegos de iniciadores	22
Figura 5: Gel de electroforesis en Agarosa al 1%	34
Figura 6: Gel de electroforesis en Agarosa 1000	36
Figura 7: Gel de electroforesis en Agarosa al 2.5%	38
Figura 8: Gel de electroforesis en Poliacrilamida al 6% para selección de iniciadores: Juego No. 30 (fragmento)	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I: Enzimas de Restricción comúnmente usadas para AFLP	19
Tabla II: Amplitud Cefalotorácica	33
Tabla III: Cuantificación de ADN	35
Tabla IV: Códigos de los juegos de iniciadores	39
Tabla V: Combinaciones de iniciadores seleccionadas	40
Tabla VI: Terminología AFLPsurv 1.0	43
Tabla VII: Análisis para el juego de iniciadores No. 18	44
Tabla VIII: Análisis para el juego de iniciadores No. 22	45
Tabla IX: Análisis para el juego de iniciadores No. 30	46
Tabla X: Análisis para el juego de iniciadores No. 32	47
Tabla XI: Análisis para el juego de iniciadores No. 36	48

Tabla XII: Análisis para el juego de iniciadores No. 56 49

Tabla XIII: Análisis para el juego de iniciadores No. 60 50

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: Gel de electroforesis en Poliacrilamida al 6% para selección de iniciadores	70
ANEXO B: Gel de electroforesis en Poliacrilamida al 6% para todas las muestras	71

INTRODUCCIÓN

Los manglares son ecosistemas de alta productividad que alojan gran cantidad de organismos acuáticos, anfibios y terrestres. Son hábitats de los estadios juveniles de cientos de especies de peces, moluscos y crustáceos; por ende desempeñan un papel fundamental en las pesquerías litorales y de la plataforma continental (1). El cangrejo rojo *Ucides occidentalis* es una de las especies ecológicamente más importantes de la fauna de los manglares. Éstos influyen en la estructura del bosque, su zonificación, dinámica de la hojarasca, productividad y ciclo de nutrientes (2).

En los manglares del Golfo de Guayaquil, existen numerosos asentamientos humanos que se dedican a la pesca y recolección de especies. Un recurso ampliamente explotado es el cangrejo *U. occidentalis*, el cual se comercializa durante todo el año, excepto en tiempo de vedas, las cuales fueron establecidas para proteger los individuos durante las etapas de reproducción y ecdisis (2).

Pese a que se han realizado estudios morfológicos, biológicos y pesqueros de *U. occidentalis* se desconoce la información genética de esta especie, no

se cuenta con su genoma ni con el transcriptoma, así como no existen estudios de su salud poblacional.

Con el fin de obtener datos preliminares sobre la genética de *U. occidentalis*, se decidió realizar este estudio usando una técnica molecular que fuera capaz de proveer información de utilidad para analizar poblaciones de importancia ecológica y comercial en el Golfo de Guayaquil.

Así, se escogió la técnica AFLP (Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados por sus siglas en inglés), la cual genera un gran número de marcadores moleculares (3, 4, 5) de tipo dominante; es de alta resolución y replicabilidad (6) y posee una característica imprescindible para estudios en *U. occidentalis*: no se necesita previo conocimiento de la secuencia genómica (7, 8, 3, 6, 4, 5, 9).

Esta técnica se basa en la digestión del ADN por medio de enzimas de restricción, las cuales van a reconocer sitios específicos en el genoma. Dichos sitios, debido a las variaciones o polimorfismos que poseen los distintos individuos variarán de ubicación (10), es así como se obtienen fragmentos de tamaño variable entre un individuo y otro. Estos fragmentos pueden ser visualizados en un gel de alta resolución y comparados con ayuda de herramientas bioinformáticas (4).

El presente estudio pretende optimizar el sistema AFLP y analizar la información obtenida por esta técnica en individuos muestreados de tres poblaciones del Golfo de Guayaquil, con el fin de determinar el nivel de

variabilidad genética en las mismas. Los resultados de esta tesis pueden constituir una herramienta útil que podría generar alternativas para el manejo del recurso *U. occidentalis* que actualmente se basan en datos morfológicos.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1. Descripción de los sitios de estudio

Las zonas de estudio forman parte del Golfo de Guayaquil, una concesión de manglares y dos áreas protegidas: Recinto 6 de Julio, Reserva Ecológica Manglares Churute (REMCH) y Reserva de Producción Faunística Manglares El Salado (RPFMS).



Figura 1: Zonas de Estudio: RPFMS, REMCH y Recinto 6 de Julio.

Fuente: Google Earth 2010.

1.1. Recinto 6 de Julio

El Recinto 6 de Julio, es una concesión entregada a la Asociación de Cangrejeros 6 de Julio, como parte del acuerdo ministerial a favor de los Grupos de Usuarios Ancestrales. Tiene una extensión de 1763 hectáreas de bosque de manglar localizadas en el cantón Naranjal, provincia del Guayas, a pocos kilómetros de la Reserva Manglares Churute. Limita al norte con el estero Bola de Oro, al sur con el río Balao Chico, al este con camaroneras de varios dueños y al oeste con el canal de Jambelí (11, 12).

Esta zona fue concedida en julio del año 2000 a la Asociación de Cangrejeros 6 de julio para su uso sustentable y custodia por un período de diez años (2, 12, 13). Posteriormente, se solicitó al Ministerio del Ambiente una nueva concesión de 560 hectáreas, la cual fue otorgada en diciembre de 2007.

La Asociación 6 de Julio, es un grupo de cerca de 145 usuarios (14), jefes de familia, que por muchos años han vivido de la captura del cangrejo rojo *Ucides occidentalis* en el manglar de la zona (13). Gracias al buen manejo de la zona por parte de los usuarios, se pretende solicitar al Ministerio de Ambiente la renovación del Acuerdo de Uso Sustentable de la primera concesión que está vigente hasta el año en curso.

1.2. Reserva de Producción Faunística Manglares El Salado

Forma parte del Patrimonio Nacional de Áreas Naturales protegidas por el estado ecuatoriano. Fue declarada Reserva mediante Acuerdo Ministerial No. 142 del 22 de Enero del 2003 y se encuentra también protegida por una ordenanza del Municipio de Guayaquil como Suelo “no urbanizable” protegido desde el año 2000 (1).

La RPFMS está localizada al noroeste del estuario del Golfo de Guayaquil y al suroeste de la ciudad de Guayaquil entre el kilómetro 7 y 16 de la vía a la costa. Cuenta con una extensión de 5309 hectáreas de bosques de manglar (1). Es contigua a los bosques Cerro Blanco y Prosperina que conforman la parte terminal de la cordillera Chongón-Colonche (15). Se integra principalmente por áreas de salitrales, remanentes de bosque seco tropical, bosques de manglar y tres esteros: Mongón, Plano Seco y Salado (1).

1.3. Reserva Ecológica Manglares Churute

La Reserva Ecológica Manglares Churute, que fue creada el 26 de Julio de 1979. Forma parte del Patrimonio Nacional de Áreas Naturales protegidas por el estado ecuatoriano (1). Fue declarada sitio RAMSAR el 7 de septiembre de 1990, siendo el humedal No. 502 registrado por dicha entidad (16).

Se localiza a 46 kilómetros de la ciudad de Guayaquil, se distribuye en los cantones Naranjal y Guayaquil de la provincia del Guayas (17) y su extensión es de 55212 hectáreas.

La reserva limita al norte con el término inferior del flanco norte del cerro Cimalón, los esteros Churute y La Zanja; al oeste los cerros Masvale y Pancho Diablo, la isla de Los Ingleses y el estero Churutillo; al este los cerros Pecho de Niña, Perequeté Grande, Perequeté Chico, Cimalón, Mirador y Mate; y al sur con los ríos Cañar y Ruidoso (1).

Los manglares Churute son parte del estuario interior del Golfo de Guayaquil y la cuenca baja del río Guayas (1). Su territorio comprende los cerros de Churute, la laguna El Canclón y el Cerro Masvale y principalmente está cubierto por zonas de manglar (18).

La variedad de formaciones de Bosque de Manglar se explica por las características edáficas y climáticas, y la influencia marina que se encuentra en la Reserva (17). El bosque de manglar se encuentra en las áreas donde confluyen el agua marina y los aportes de los ríos (17). La confluencia de las aguas oceánicas junto con los aportes fluviales de los ríos Taura, Churute, Cañar y Naranjal, han contribuido a la formación de numerosos canales e islas (18).

2. Biología del cangrejo rojo *Ucides occidentalis*

El cangrejo rojo *U. occidentalis* es un crustáceo decápodo perteneciente a la familia Ocypodidae. *U. occidentalis* se caracteriza por la presencia de cámaras branquiales bien delimitadas las cuales albergan 5 branquias en cada una (2, 13), resultado de la adaptación a medios terrestres y periodos intermareales (19).

Sus características morfológicas comprenden un caparazón ovalado; las regiones branquiales hinchadas y fuertemente proyectadas a los lados; pedúnculo ocular robusto, casi vertical; quelípedos del macho extremadamente largos, algo asimétricos, con numerosos tubérculos y espinas; color del caparazón rojo grisáceo, con los márgenes laterales rojo-anaranjados; pereiópodos y gran parte de las pinzas de color rojo oscuro; región ventral café o blanca (20).

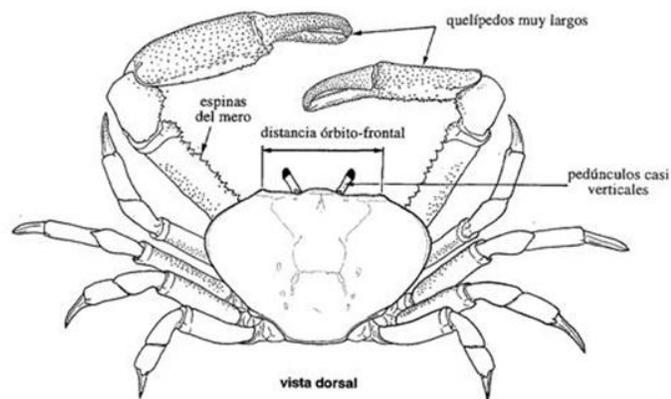


Figura 2: Cangrejo rojo *Ucides occidentalis*.

Fuente: FAO, 1995

Estos animales se alimentan de las hojas de mangle que caen al suelo del bosque. Las hojas son acumuladas en las madrigueras de los cangrejos durante todo el año. Aunque no se conoce el valor nutricional que las hojas tienen para los cangrejos, el destino de la hojarasca del manglar está altamente influenciado por estos animales (13, 2).

El cangrejo rojo *U. occidentalis* es un componente vital en los procesos del fondo del manglar, es capaz de remover cantidades importantes de hojas frescas, caídas del mangle (2).

El cangrejo rojo también contribuye a la oxigenación de los suelos durante la construcción de sus madrigueras, realizan una acción de remoción y aireación del fango, permitiendo así el intercambio de gases en el sustrato. Dicha actividad potencia la descomposición de la materia orgánica por bacterias aeróbicas, equilibrando la dinámica ecológica del sistema (2).

El exoesqueleto de *U. occidentalis* sufre un proceso de ecdisis cada año. Durante este período, que dura aproximadamente 60 días, el cangrejo se encierra en su madriguera hasta completar la muda de su caparazón (19). Los cangrejos acumulan alimento para esta etapa y cubren la entrada de sus madrigueras para evitar el ataque de depredadores o la inundación de las mismas. Este comportamiento se encuentra también relacionado con la presencia de eventos naturales como inundaciones y marejadas (13). La ecdisis ocurre generalmente a fines del mes de junio o inicios de julio

cuando se define la temporada seca y disminuye notablemente la temperatura del agua (19).

Los hábitos de enterrarse de *U. occidentalis* no han sido estudiados, únicamente se han observado las madrigueras ya construidas en el ecosistema del manglar. Sus madrigueras, no tienen ribetes como ocurre con las cuevas construidas por otras especies de cangrejos terrestres (13).

Estos animales presentan dimorfismo sexual externo: los machos presentan un solo par de pleópodos bien desarrollados, de consistencia dura, y adaptados para la fecundación. Las hembras poseen cuatro pares de pleópodos de tamaño similar, que están cubiertos de finas y numerosas setas, las mismas que contendrán la masa ovífera (2).

Previo a la reproducción, los individuos atraviesan una etapa de precortejo, en la cual se observan movimientos frecuentes de entrada y salida de sus madrigueras que no responden a la búsqueda de alimento. Este proceso ocurre aproximadamente cuatro semanas antes del cortejo nupcial. Posteriormente, durante el cortejo nupcial, tanto machos como hembras salen de sus madrigueras para realizar el acto copulativo (19). Durante esta etapa, la coloración del exoesqueleto en los machos cambia de verde violácea a un amarillo intenso fuertemente lustrado (2).

La fecundación sexual es interna; durante la cópula, el cangrejo macho transfiere los espermatozoides a la hembra mediante sus órganos copuladores. Para la cópula, las hembras sexualmente maduras son cortejadas por el macho, quien primero rodea a la hembra; luego de éste estímulo sexual, ambos se colocan de frente y se abrazan cruzando sus quelas sobre el cefalotórax. Después la hembra abre su abdomen y el macho procede a introducir sus pleópodos copulatorios en los orificios genitales de ella (2).

La época reproductiva se presenta durante los meses de enero y febrero de cada año (13), lo cual nos indica que dicha actividad es estacional con un solo pico reproductivo que coincide con las etapas lluviosas del litoral ecuatoriano (2).

Mucho se ha estudiado acerca de los aspectos biológicos y morfológicos de esta especie, sin embargo no se ha realizado investigaciones a nivel molecular, se desconoce el genoma y tampoco existe información del transcriptoma. Estos hechos indican un total desconocimiento de genética de población de *U. occidentalis*.

2.1. Taxonomía

Esta especie fue descrita por primera vez por Ortmann en 1897 (FAO, 1995). Su clasificación taxonómica es la siguiente:

Phylum: Artropoda

Clase: Malacostraca

Orden: Decapoda

Familia: Ocypodidae

Género: *Ucides*

Especie: *occidentalis*

N.C.: *Ucides occidentalis* (Ortmann, 1897)

N.V.: Cangrejo rojo

(2)

2.2. Distribución

El cangrejo rojo *Ucides occidentalis* se distribuye a lo largo de la costa del Pacífico, desde el Golfo de California hasta el norte de Perú (2, 21).

Se encuentra en sustratos lodosos de manglares, lagunas y otros ambientes salobres cerca de las desembocaduras de ríos, también en áreas no inundadas, pero próximas a cuerpos de agua (20).

2.3. Información pesquera

El cangrejo rojo *U. occidentalis* constituye un recurso de importancia para muchas familias del litoral ecuatoriano. Se comercializa durante todo el año excepto en los tiempos de veda, instauradas para proteger a los individuos cuando atraviesan las etapas de reproducción y ecdisis (2). La legislación ecuatoriana establece que en los lapsos del 15 de enero al 15 de febrero y del 15 de agosto al 15 de septiembre de cada año se prohíbe la captura, transporte, posesión, procesamiento y la comercialización interna y externa del recurso cangrejo *Ucides Occidentales* (22). Además, obedeciendo a tres ordenanzas municipales, se prohíbe la captura de cangrejos hembras, la captura de machos cuya amplitud cefalotorácica sea menor a 60mm y la exportación de individuos de esta especie (2).

Un estudio realizado en el 2003 reveló que en el litoral ecuatoriano, cerca de 22 comunidades se dedican a la extracción del cangrejo rojo, casi todas asentadas en las provincias de Guayas, Santa Elena y El Oro. En el Golfo de Guayaquil las localidades donde se realiza pesca extractiva de este recurso son: Balao, 6 de Julio, Puerto Roma, El Salvador, Puerto El Morro, El Porvenir, El Guasmo, Puerto Hondo, entre otras (13).

Las actividades de pesca se realizan tradicionalmente por recolección, sin ningún tipo de artefacto, sujetándolo con la mano y evitando lesionar al

animal durante la extracción. Sin embargo, actualmente, los cangrejeros utilizan una varilla de hierro de aproximadamente un metro de longitud, con un mango en un extremo y una curvatura en forma de U en el otro; el mismo que emplean para tratar de izar los cangrejos lo más próximo del alcance del brazo. Se ha reportado también el uso de pequeños cortes de malla sostenidos por palos de mangle que se colocan al pie de las madrigueras. Este tipo de arte de pesca, denominado “trampa”, se encuentra prohibido mediante Acuerdo Ministerial publicado en el Registro Oficial No. 84 del 15 de mayo de 2007 (2).



Figura 3: Artefacto utilizado para la captura de *U. occidentalis*

Fuente: Solano, 2007.

3. Marcadores Moleculares

Los marcadores moleculares son biomoléculas que se pueden relacionar con un rasgo genético. Estas biomoléculas pueden ser proteínas (antígenos, isoenzimas o aloenzimas) o ADN (23), el cual puede ser nuclear, mitocondrial, de cloroplasto o ribosomal (3). Estas piezas de material genético pueden ser usadas para distinguir células, individuos, poblaciones o especies (6).

Actualmente se los utiliza como una herramienta para diferentes campos de la Biología: Bio-medicina, Ecología, Evolución, Conservación entre otros. Son capaces de detectar polimorfismos en loci únicos o múltiples y son de tipo dominantes o co-dominantes (3).

3.1. Variación genética o polimorfismo

Todos los organismos están sujetos a mutaciones como resultado de las funciones normales de las células o por interacciones con el medio; como consecuencia van surgiendo diferencias genéticas en los individuos, lo que a nivel molecular repercute en una variación génica o polimorfismo. Estos cambios pueden ser medidos con múltiples marcadores moleculares, un buen marcador, es capaz de mostrar variación entre organismos de la misma especie (4).

Los avances de la tecnología de ADN recombinante han permitido el desarrollo de los marcadores moleculares basados en el ADN, consiguiendo estabilidad en la identificación de especies y variedades (23).

Para entender mejor el rol de los marcadores moleculares basados en ADN es necesario comprender el término “huella genética” (DNA fingerprinting): lo cual consiste en la generación de un set de fragmentos de ADN obtenidos de una sola muestra de ADN. Dichos fragmentos son luego usados como fuente de información genotípica. Todos los métodos de huella genética estudian patrones asociados con marcadores moleculares (7).

Es importante recalcar el papel que toma la Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction o PCR) en estos procesos: La PCR es una de las técnicas más usadas para la preparación de huellas genéticas. La reacción básica de la PCR comienza con la desnaturalización del ADN molde para separar las cadenas, continúa con la hibridación de un par de oligonucleótidos con su ADN molde, y termina con la polimerización para sintetizar un nuevo ADN entre los dos oligonucleótidos. Estos pasos se repiten cíclicamente para lograr una masiva amplificación del ADN molde (7).

Las técnicas para generar marcadores moleculares basadas en PCR, son de gran utilidad para determinar las variaciones genéticas o polimorfismos inclusive a nivel intraespecífico. Así, estas herramientas se aplican en estudios de genética de población.

3.2. Marcadores moleculares dominantes y codominantes

Los marcadores dominantes son aquellos que no pueden discernir entre los homocigotos de los heterocigotos para un segmento determinado (3). Es decir, sólo distinguen la presencia o ausencia de un alelo dado (7). Por otro lado, los marcadores co-dominantes son capaces de reportar diversidad entre ambos alelos para un determinado gen o locus (6).

Escoger el marcador molecular apropiado dependerá de las necesidades del investigador (6, 4, 5), actualmente existen varias técnicas, las cuales difieren en reproductibilidad, resolución, naturaleza del marcador, costo, número posible de loci detectables, tiempo y facilidad del protocolo, entre otros factores (6).

3.3. AFLP

El Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados (Amplified Fragment Length Polymorphism o AFLP) es una técnica descrita en 1995 por Pieter Vos y sus colegas. Se basa en la detección de fragmentos de

restricción amplificados selectivamente por PCR que se originan de un genoma total de ADN digerido (9).

Fue desarrollada originalmente con finalidad de construir mapas de unión de alta densidad para clonaje posicional de genes y crianza animal (8, 10).

Debido a su aplicabilidad en mapeo y huella genética de cualquier ADN genómico, su uso fue extendido para análisis diversos: relaciones genéticas, valoración de diversidad, estudios de poblaciones naturales y de crianza (8), análisis de filogenia (10), identificación de genes que codifican para una característica deseable o rasgo cuantitativo (QTL – qualitative trait locus), mapa de genes ligados al sexo (24), entre otros.

El análisis de AFLP parte de una muestra de ADN genómico, la cual puede ser extraída de los individuos mediante diversos métodos. Una vez obtenido, el ADN se digiere con un par de enzimas de restricción, usualmente *MseI* y *EcoRI*, las cuales son de corte frecuente y de corte poco frecuente respectivamente (8). El corte frecuente genera pequeños fragmentos de ADN, los cuales tendrán una buena amplificación y son del tamaño óptimo para ser observados en geles desnaturalizantes (geles de secuenciación). El corte poco frecuente tiene como finalidad reducir el número de fragmentos amplificados (9).

La secuencia de reconocimiento para *MseI* es 5'-TTAA-3' y corta luego de la primera 5'-T. En el caso de la *EcoRI* la secuencia es 5'-GAATTC-3' y la digestión se realiza después de la 5'-G. Estas enzimas se incuban con el ADN por un período de tiempo suficientemente largo como para digerir completamente el ADN genómico (7).

Tabla I: Enzimas de Restricción comúnmente usadas para AFLP

Enzima	Secuencia de reconocimiento	Sitio de corte	Cola
<i>MseI</i>	5'-TTAA-3'	T/TAA AAT/T	5' - TA
<i>EcoRI</i>	5'-GAATTC-3'	G/AATTC CTTAA/G	5' - AATT

Fuente: Investigación realizada

Para poder amplificar los fragmentos generados por las enzimas de restricción, se requiere del uso de adaptadores *MseI* y *EcoRI* que permita obtener una huella genética de ADN única para cada individuo (9, 7). Estos adaptadores consisten en una molécula de ADN doble cadena con una cola 5' que es complementaria a la que se consiguió luego de los cortes con *MseI* (5'-TA-3') y con *EcoRI* (5'- AATT-3'). Cada adaptador, contiene una secuencia específica de ADN de entre 19 y 22 pares de bases (pb) de longitud, localizados antes de los respectivos extremos 5'. Además, poseen nucleótidos extra, los mismos que una vez ligados los adaptadores, destruyen el sitio de reconocimiento de las enzimas de restricción. La ligación de los adaptadores comprende la

incubación de los fragmentos digeridos con los dos adaptadores y con ADN ligasa, una enzima que une covalentemente los adaptadores con los extremos 5' complementarios de los fragmentos digeridos (7).

Estructura del adaptador *MseI*:

5'- GACGATGAGTCCTGAG -3'
3'- TACTCAGGACTCAT -5'

Estructura del adaptador *EcoRI*:

5'- CTCGTAGACTGCGTACC -3'
3'- CATCTGACGCATGGTTAA -5'

(9)

El resultado de esta ligación comprende los fragmentos de ADN genómico empareados entre los adaptadores *EcoRI* y *MseI* y sus secuencias únicas de ADN. Esta condición es ideal para que los iniciadores puedan hibridarse en la sección común para los fragmentos resultantes: la región correspondiente a los adaptadores.

Debido a la necesidad de analizar los patrones de bandas para cada individuo, y siendo AFLP una técnica que genera muchas bandas, se optimizó la amplificación de manera que sea más selectiva. Se añadió a los iniciadores tres nucleótidos en los extremos 3', lo cual permite que el ADN objetivo para la PCR sea una sección de los fragmentos de ADN genómico. Mientras más complejo sea el genoma que está siendo

investigado, más nucleótidos selectivos deben ser añadidos a los iniciadores (7, 9).

Las reacciones de PCR-AFLP se llevan a cabo en condiciones de alta selectividad (4), permitiendo sólo que se amplifiquen aquellos fragmentos que son perfectamente complementarios con las terminaciones 3' de los iniciadores (7).

Iniciadores AFLP:

	Cuerpo	Enzima	Extensión
--	---------------	---------------	------------------

EcoRI	5'- GACTGCGTACC	AATTC	NNN -3'
--------------	-----------------	-------	---------

MseI	5'- GATGAGTCCTGAG	TAA	NNN -3'
-------------	-------------------	-----	---------

(9).

Bajo estas condiciones se amplifica a la vez un sinnúmero de fragmentos de distinto tamaño, los cuales, para ser vistos, son separados en geles de electroforesis de alta resolución (similares a los de secuenciación).

En este proceso, los fragmentos de ADN se someten a un campo eléctrico, en donde se separan acorde a su longitud; los fragmentos más largos migran más lento que los más cortos.

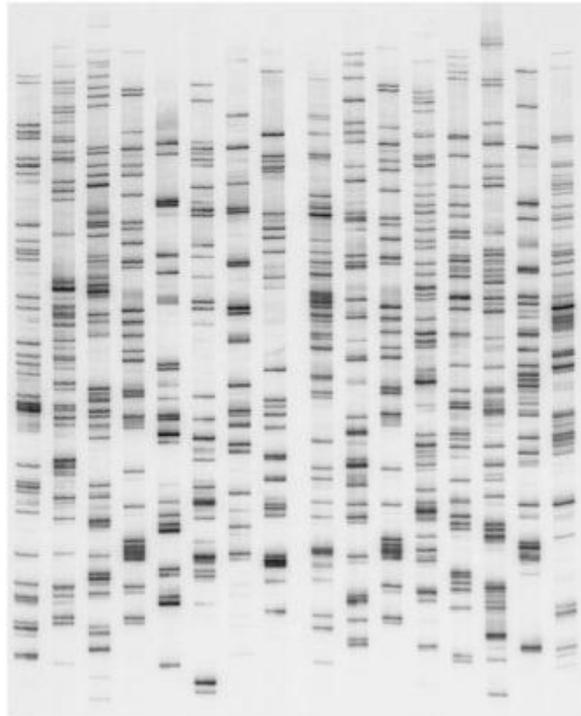


Figura 4: Huella genética AFLP para ADN de tomate con distintos juegos de iniciadores.

Fuente: INVITROGEN™, 2003.

Los marcadores tipo AFLP han sido de gran utilidad en análisis de variación genética, particularmente en investigaciones de estructura poblacional y diferenciación, incluyendo estimación de estadísticos F y variación genética dentro de poblaciones (5).

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material Biológico

Las muestras de cangrejo rojo *Ucides occidentalis* fueron obtenidas de las zonas de estudio descritas anteriormente, en las siguientes coordenadas UTM: Churute, Isla Matorrillos (17M 632149.39mE 9727199.69mS); 6 de Julio (17M 634539.66mE 9699328.47mS) y Salado (17M 615246.94mE 9754415.41mS).

Se colectaron 90 individuos (30 en cada zona) por medio de pesca extractiva, los miembros de las cooperativas y asociaciones de cangrejeros se encargaron de esta tarea. Para este motivo, se consiguieron los permisos necesarios para realizar este trabajo por parte del Ministerio de Ambiente de Ecuador.

No se utilizaron artes de pesca durante la recolección de individuos y los sitios muestreados se escogieron aleatoriamente dentro de cada zona.

Los cangrejos se colocaron en cartones previamente agujereados para su traslado vía terrestre hasta la ciudad de Guayaquil, al laboratorio de Biología de la Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar – ESPOL.

Previo a la extracción de ADN, se midió la amplitud cefalotorácica de cada animal como registro morfológico. Varias muestras fueron descartadas por no encontrarse en condiciones óptimas para el proceso de extracción de ADN (poca cantidad de hemocitos, mal estado del individuo, entre otros). Para establecer el número de animales descartados, revisar en la sección de Resultados, Tabla II.

2. Extracción de ADN

El protocolo utilizado corresponde casi en su totalidad de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial INVITROGEN™, salvo por la previa concentración de hemocitos mediante centrifugación. Este paso fue realizado para incrementar el número de hemocitos al momento de la extracción y eliminar los posibles agentes presentes en el suero de la hemolinfa. Dichos agentes pueden comprometer la calidad del ADN obtenido en la extracción así como también inhibir el proceso de PCR.

En primera instancia se recolectó la hemolinfa de cada individuo por medio de una punción con jeringuillas de 5ml en las articulaciones de los

quelípedos. Se retiró 1ml de hemolinfa, la cual fue combinada rápidamente con 1ml de Citrato de Sodio al 10%, pH 7.5 colocado previamente en la jeringa, su acción anticoagulante mantuvo la hemolinfa en estado líquido.

A continuación se centrifugó la mezcla durante 8 min a 1200 x g. Una vez descartado el sobrenadante se homogenizó el pellet obtenido en 200µl de Citrato de Sodio al 10%, pH 7.5.

La extracción de ADN se efectuó por medio del mini-kit de INVITROGEN™ PureLink™ Genomic DNA Kits for purification of genomic DNA, mediante columnas de Sílice. Este método se basa en la unión selectiva de las moléculas de ADN a membranas silícicas en presencia de sales caotrópicas (25). Bajo altas concentraciones de estas sales, el ADN se une iónicamente a la columna de sílice, permitiendo que se realicen lavados rigurosos que eliminen todas las impurezas. El ADN puede ser eluido en condiciones de baja fuerza iónica (26).

El protocolo de extracción de ADN se describe a continuación.

El lisado de hemocitos se realizó agregando a los 200µl de muestra (del paso de concentración de hemocitos) los siguientes compuestos: 20µl de Proteinasa K (20mg/ml en su respectivo buffer), 20µl de RNasa A (20mg/ml en Tris-HCl 50mM, pH 8.0 y EDTA 10mM) y 200µl de

PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer. La mezcla se incubó a 55°C por 10 minutos y se le añadió 200µl de etanol absoluto.

El lisado (~640µl) se trasladó a una columna de extracción con su respectivo tubo colector y se centrifugó a 10000 x g durante 1min a temperatura ambiente. El líquido que quedó en el tubo colector fue descartado.

Posteriormente, fueron realizados dos lavados al ADN retenido en las columnas usando PureLink™ Genomic Wash Buffer 1 y 2 (suplementado con Etanol absoluto, tal como lo sugiere la casa comercial). Se adicionó 500µl de PureLink™ Genomic Wash Buffer 1 y se centrifugó a 10000 x g durante 1min. Luego se agregó 500µl de PureLink™ Genomic Wash Buffer 2 para centrifugar a ~26300 x g durante 3 minutos. El líquido del tubo colector fue descartado.

Finalmente, la elución del ADN se llevó a cabo con el PureLink™ Genomic Elution Buffer, del cual se añadieron 70µl a la columna de extracción con el ADN previamente adherido y lavado. Se centrifugó a ~26300 x g durante 1.5min. El eluido de ADN fue recuperado en un tubo de 1.5ml el cual fue almacenado a -20°C hasta su posterior uso.

3. Protocolo optimizado AFLP

Anteriormente se ha descrito la base teórica de la metodología AFLP. Para cumplir con esta parte del proceso se utilizó el AFLP Analysis System I y AFLP Starter Primer Kit de INVITROGEN™. Para realizar el método descrito por el proveedor, es necesario cuantificar el ADN genómico extraído, para lo cual se utilizó el Thermo Scientific NanoDrop 2000.

El funcionamiento del NanoDrop está basado en espectrofotometría. Los ácidos nucleicos absorben la luz ultravioleta, con un pico de absorción de 260 nm de longitud de onda. En un aparato de espectrofotometría, las muestras se exponen a luz ultravioleta a 260 nm y un fotodetector mide la luz que pasa a través de la muestra (27). Esta medición se compara con un blanco y de esta manera se obtiene un valor de absorbancia, el cual multiplicado por un factor de 50 da como resultado la concentración de ADN en ng/μl. Además, midiendo el ratio de densidad óptica (OD) de 260/280 nm se puede obtener la pureza de la muestra: si este ratio está entre 1.8 - 2.0 la absorción se debe probablemente a la presencia de ADN. De lo contrario, la muestra puede estar contaminada con proteínas o con agentes químicos utilizados durante el proceso de extracción (28).

Una vez cuantificado el ADN se procedió con la digestión del ADN genómico por enzimas de restricción. Para ello en un tubo de 1.5ml se

colocó 5µl de 5X Reaction Buffer (Tris-HCl 50mM pH 7.5, acetato de Mg 50mM y acetato de K 250mM), 2µl de las enzimas *EcoRI* y *MseI* (1.25U/µl de cada una), 125ng de ADN (contenidos en no más de 9µl) y agua destilada si fuese necesario enrasar la cantidad de ADN en 9µl.

Esta mezcla se incubó durante 2h30 a 37°C. A continuación, las muestras fueron incubadas a 70°C durante 15min e inmediatamente se colocaron en hielo.

Posteriormente, se procedió a la ligación de los adaptadores. Así, se añadieron 12µl de Adapter Ligation Solution (que contiene los adaptadores *EcoRI/MseI*, ATP 0.4mM, Tris-HCl 10mM, acetato de Mg 10mM y acetato de K 10mM) más 0.5µl de T4 ADN Ligasa (1U/µl). Se dejó incubar por 2h00 a 20°C. Del volumen final de 25µl se realizaron diluciones de 1:10, tomando 2µl de la mezcla ligada y 18µl de TE Buffer.

El proceso de Preamplificación se efectuó utilizando: 10µl de Preamplification Primer Mix (reactivo que contiene los primers+1 y dNTPs), 1.25µl de 10XPCR Buffer plus Mg, 0.25µl de Platinum *Taq* Polymerase (5U/µl) y 1.25µl del ADN ligado y diluido del paso anterior en un volumen final de 12.75µl.

Esta reacción se llevó a cabo en un termociclador con el siguiente programa de amplificación:

Desnaturalización	94°C durante 30s	} → x20 ciclos
Hibridación	56°C durante 60s	
Elongación	72°C durante 60s	
Mantenimiento	4°C ∞	

El resultado de esta primera amplificación se diluyó en 1:50 antes de realizar la amplificación selectiva. Para este efecto, 7µl del preamplificado fueron mezclados con 343µl de TE Buffer, para un volumen final de 350 µl.

A continuación se ejecutó la Amplificación Selectiva AFLP con los primers +3. Dicha amplificación se realizó con dos soluciones de trabajo diferentes. La primera solución de trabajo comprende 0.5µl del iniciador *EcoRI* y 4.5µl del iniciador *MseI* suplementado con dNTPs. La segunda solución de trabajo estuvo compuesta de 7.9µl de agua destilada, 2µl de 10X PCR Buffer plus Mg y 0.5µl de Platinum *Taq* Polymerase (5U/µl).

Finalmente, se tomaron 5µl de la solución de trabajo 1, 10µl de la solución de trabajo 2 y 5µl del ADN ligado, preamplificado y diluido en tubos de 0.2ml. A continuación se describe el programa del Termociclador Applied Biosystem Veriti® 96-well usado en esta tesis:

- Desnaturalización 94°C por 30 s
 - Hibridación 65°C por 30 s
 - Elongación 72°C por 60 s
- } → 1 ciclo
- Disminuir la temperatura de Hibridación 0.7°C cada ciclo durante 12 ciclos, dando una fase de touch down de 13 ciclos.
- Desnaturalización 94°C por 30 s
 - Hibridación 56°C por 30 s
 - Elongación 72°C por 60 s
- } → x23 ciclos
- Mantenimiento 4°C ∞ (29)

Luego de terminada la segunda amplificación, los amplicones fueron sometidos a electroforesis para su separación. A fin de verificar la presencia de amplicones, luego de la reacción de PCR, se realizó una electroforesis en Agarosa al 2.5% de varias muestras seleccionadas al azar.

Una vez que se completó el proceso con todas las muestras, el ADN amplificado fue revelado en geles de poliacrilamida al 6%, mediante tinción a la plata. Este método de tinción emplea Nitrato de Plata, el cual en complejo con los ácidos nucleicos es reducido a plata metálica por formaldehído en un medio alcalino, produciendo bandas de color marrón oscuro (30). Los geles resultantes fueron debidamente fotodocumentados y las imágenes se utilizaron para el análisis de datos.

4. Análisis de datos

Las imágenes digitales se analizaron en el programa Gene Profiler 4.0.5 (31), software especializado en ubicar líneas y detectar picos en estas líneas, los cuales representan bandas en la imagen de un gel. Estas bandas son comparadas con los estándares (marcadores de tamaño con intervalos de 20pb) y ajustadas con respecto al estándar para determinar el tamaño de los amplicones. Así también, el programa es capaz de detectar bandas del mismo tamaño entre las distintas muestras analizadas bajo un rango de tolerancia dado. El rango de tolerancia utilizado en este trabajo fue de 0.4 basándose en los resultados obtenidos con distintas simulaciones efectuadas con diferentes rangos de tolerancia. Bajo estas condiciones, la presencia o ausencia de bandas de igual tamaño entre las distintas líneas fueron identificadas por el software. A partir de esta información, Gene Profiler 4.0.5 generó las bases de datos de Ausencia/Presencia (tablas en binario donde 0 significa ausencia y 1 es presencia de banda).

Las tablas de Ausencia/Presencia se usaron posteriormente para el análisis de variabilidad genética por medio del software AFLPsurv 1.0, los resultados se generaron en archivos .txt (32).

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

1. Amplitud Cefalotorácica de las muestras.

La amplitud cefalotorácica fue uno de los parámetros considerados durante este estudio. A continuación se muestra la tabla de dicha medida para cada muestra.

Tabla II: Amplitud Cefalotorácica

CHURUTE		6 DE JULIO		SALADO	
ID individuo	Amplitud Cefalotórax (cm)	ID individuo	Amplitud Cefalotórax (cm)	ID individuo	Amplitud Cefalotórax (cm)
1	8	1	8,5	1	7,5
2	7	2	8,5	2	8,5
3	7,5	3	8	3	7,5
4	8	4	8	4	7,5
5	8	5	8,5	5	8
6	7,5	6	8	6	8
7	8,5	7	8,5	7	7,5
8	7,5	8	9,5	8	6,5
9	7,5	9	9	9	7
10	8,5	10	9,5	10	7,5
11	9,5	11	8,5	11	8
12	8	12	8,5	12	8
13	8,5	13	8,5	13	8,5
14	8,5	14	7,5	14	7,5
15	8,5	15	8,5	15	7,5
16	8	16	8	16	8
17	9	17	8,5	17	8,5
18	9	18	8	18	7
19	9,5	19	8,5	19	7,5
20	9,5	20	8,5	20	8
21	8,5	21	8	21	7
22	7,5	22	8,5	22	8
23	7,5	23	7,5	23	7,5
24	7,5	24	8	24	7,5
25	6,5	25	8,5	25	8,5
26	9	26	8	26	8
27	7,5	27	7,5	27	7
29	8	28	9	28	8
30	8,5	29	7,5	29	7,5
31	8	30	8,5	30	9
32	8,5	-	-	31	8
33	8	-	-	32	8
34	7,5	-	-	-	-
35	8	-	-	-	-

 Muestras descartadas

Fuente: María Fernanda Ratti

2. Extracción de ADN

Una prueba realizada para tres muestras de hemolinfa de *U. occidentalis* del Recinto 6 de Julio mostró la diferencia entre la extracción de ADN luego de una concentración de hemocitos por medio de centrifugación versus el protocolo de extracción de ADN recomendado por INVITROGEN™ (utilizando fluido sanguíneo).

El análisis realizado mediante electroforesis para las muestras descritas demostró mayor calidad del ADN resultante, cuando se realiza una concentración de hemocitos en lugar de utilizar hemolinfa sin previo tratamiento. Este hecho se aprecia en la figura No. 5.

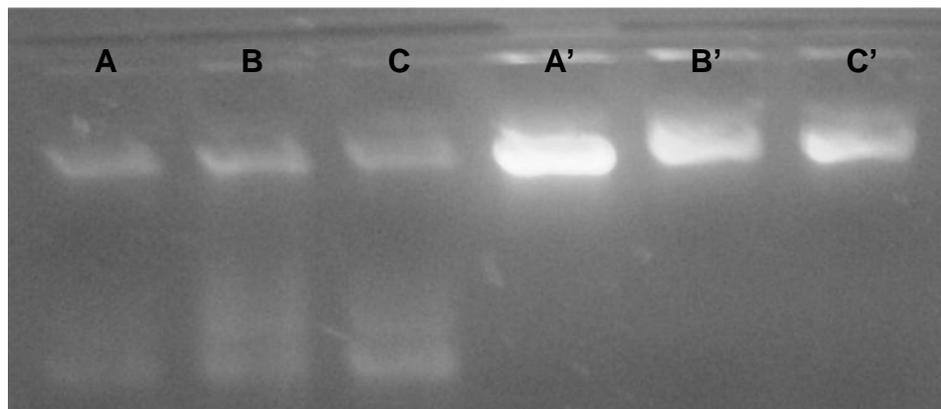


Figura 5: Gel de electroforesis en Agarosa al 1%. En las líneas A, B y C se muestra el ADN genómico obtenido de hemolinfa. En las líneas A', B' y C' se puede observar el ADN genómico extraído de hemocitos luego de centrifugación.

Fuente: María Fernanda Ratti

3. Cuantificación de ADN

Una vez determinado el proceso idóneo para la extracción de ADN genómico de los hemocitos de *U. occidentalis*, se realizó el aislamiento y purificación de ADN mediante este método optimizado para 60 de las muestras de hemolinfa de tres zonas distintas del Golfo de Guayaquil. A continuación el ADN fue cuantificado, las concentraciones de ADN obtenidas son descritas en la Tabla III.

Tabla III: Cuantificación de ADN

Churute		6 de Julio		Salado	
Muestra #	ng/μl	Muestra #	ng/μl	Muestra #	ng/μl
4	18,90	2	91,10	5	284,70
5	7,70	3	76,70	8	36,90
7	19,70	4	110,20	13	93,90
10	30,30	5	27,60	14	85,60
12	14,30	6	30,00	15	44,80
14	162,50	9	32,40	16	58,10
16	23,50	11	141,80	17	171,10
17	20,00	12	79,70	18	141,60
18	25,80	13	41,20	19	52,00
20	19,30	18	33,30	20	28,50
22	28,10	29	20,90	21	32,20
23	35,60	20	44,80	22	130,00
24	31,90	21	29,30	23	80,70
25	19,10	22	46,00	24	53,60
26	49,20	23	81,30	25	58,00
27	60,80	24	156,20	26	97,70
31	88,20	26	70,30	27	56,30
32	69,40	28	45,90	28	116,90
33	61,30	29	50,60	29	57,80
34	42,40	30	34,80	31	63,50

Fuente: María Fernanda Ratti

La casa comercial INVITROGEN™, recomienda en su protocolo de AFLP System I®, utilizar una concentración que varía entre 100-500 ng de ADN. Algunas pruebas fueron realizadas con diferentes concentraciones de ADN (figura No.6) los resultados obtenidos demuestran que la concentración idónea para realizar el protocolo de AFLP System I fue de 125 ng.

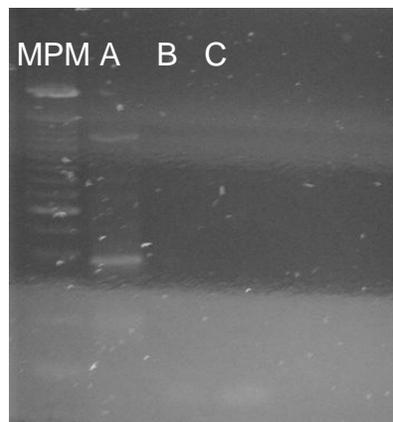


Figura 6: Gel de electroforesis en Agarosa 1000. MPM: Marcador de Peso Molecular; A: (control Tomate de concentración de ADN conocida); B y C: muestras 23 y 24 respectivamente de Churute (concentración de ADN desconocida).

Fuente: María Fernanda Ratti

4. Optimización del Sistema AFLP

Una de los factores optimizados para el proceso AFLP, fue la cantidad de reactivo a utilizarse: la mayor parte del protocolo funcionó eficientemente con la mitad del volumen recomendado por el fabricante.

Un ensayo preliminar fue realizado para verificar el proceso optimizado de la técnica AFLP con cuatro muestras pertenecientes a las distintas zonas. Preliminarmente, la amplificación se llevó a cabo usando sólo los iniciadores:

- E-AAC / M-CAA
- E-AAC / M-CAC

(29).

Una vez amplificado, el ADN resultante fue separado mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5%. En la figura No. 7 se muestran los resultados de este proceso. Nótese que la resolución de los amplicones en agarosa no es apropiada para analizar perfiles genéticos, sin embargo, es suficiente para mostrar que el ADN fue amplificado.

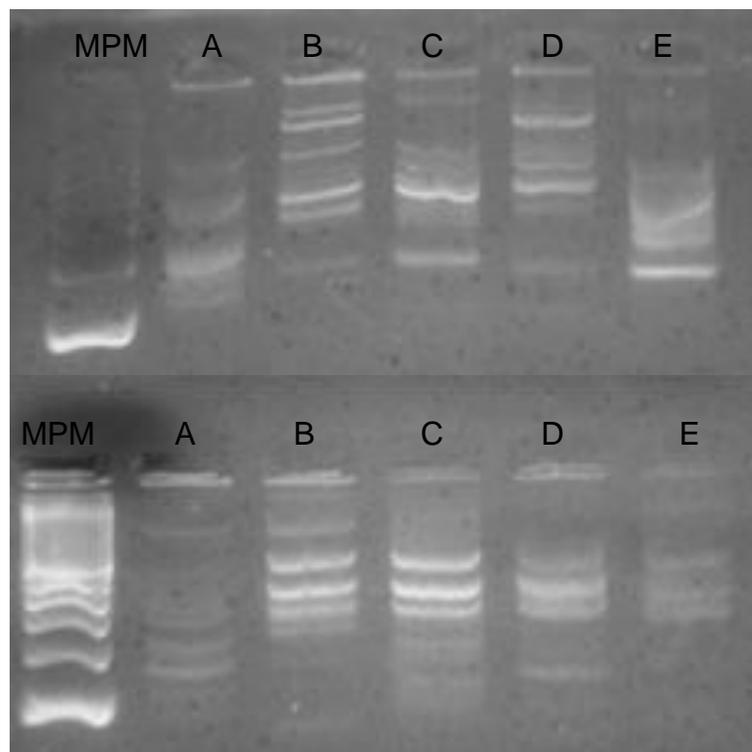


Figura 7: Gel de electroforesis en Agarosa al 2.5% muestra amplicones obtenidos por AFLP. Línea superior: A, control tomate; B, muestra 17 de Salado; C, muestra 27 de Churute; D, muestra 12 de 6 de Julio y E, muestra 22 de 6 de Julio con el juego de iniciadores E-AAC / M-CAA. Línea inferior: las mismas muestras con el par de iniciadores E-ACC / M-CAC.

Fuente: María Fernanda Ratti

Una vez establecida la rutina de trabajo de la técnica AFLP utilizada en este estudio. Luego, se procedió a la selección de los pares de cebadores que generasen los marcadores moleculares (bandas) más informativos para análisis de variabilidad genética. Los criterios de selección se basaron en definir fragmentos de similar tamaño entre las muestras de estudio. Con esta finalidad, se dio paso a las amplificaciones

selectivas AFLP con todas las combinaciones de iniciadores (Tabla IV). Las muestras utilizadas fueron las mismas del ensayo anterior (individuos 17 de Salado, 27 de Churute, 12 y 22 de 6 de Julio y control tomate).

Tabla IV: Códigos de los juegos de iniciadores, al interior de las celdas se encuentran enumeradas las 64 combinaciones de pares de iniciadores.

	M-CAA	M-CAC	M-CAG	M-CAT	M-CTA	M-CTC	M-CTG	M-CTT
E-AAC	1	2	3	4	5	6	7	8
E-AAG	9	10	11	12	13	14	15	16
E-ACA	17	18	19	20	21	22	23	24
E-ACT	25	26	27	28	29	30	31	32
E-ACC	33	34	35	36	37	38	39	40
E-ACG	41	42	43	44	45	46	47	48
E-AGC	49	50	51	52	53	54	55	56
E-AGG	57	58	59	60	61	62	63	64

Fuente: María Fernanda Ratti

Analizando visualmente los geles, se escogió los pares de iniciadores bajo el criterio de que generasen marcadores moleculares similares entre las muestras de estudio. Esta es la base para analizar variabilidad genética, ya que es necesario comparar a partir de amplicones en común. Los juegos de iniciadores que presentaron amplicones hipervariables fueron inmediatamente descartados, conservando sólo aquellos que produjeron amplicones comunes. En esta forma se seleccionaron los pares de iniciadores capaces de generar mayor información y claridad en

el revelado (Ver Anexo A). Así, las combinaciones de iniciadores escogidas para este estudio son descritas en la Tabla V.

Tabla V: Combinaciones de iniciadores seleccionadas para estudio de variabilidad genética de *U. occidentalis*

Combinación	Par de Iniciadores
18	E-ACA / M-CAC
22	E-ACA / M-CTC
30	E-ACT / M-CTC
32	E-ACT / M-CTT
36	E-ACC / M-CAT
56	E-AGC / M-CTT
60	E-AGG / M-CAT

Fuente: María Fernanda Ratti

Utilizando las siete diferentes combinaciones de iniciadores escogidas, se procedió a realizar el estudio de variabilidad genética con todas las muestras consideradas en el mismo. De este modo, los fragmentos obtenidos por la técnica AFLP fueron separados en geles de poliacrilamida al 6%, cada uno para sendos pares de iniciadores. (Ver Anexo B).

5. Análisis de datos.

Una vez obtenidas las imágenes digitales de los geles de electroforesis para todas las muestras con los juegos de iniciadores seleccionados, se procedió a analizarlas en el software Gene Profiler 4.0.5. Partiendo de las bandas identificadas por este programa fueron generadas las tablas de ausencia/presencia (Abs/Pres), las cuales son la base para el análisis en AFLPsurv 1.0.

El software AFLPsurv 1.0 genera un archivo .txt que consta de diferentes tipos de tablas de datos. Para propósitos de esta tesis, se consideraron cuatro de éstas, las cuales describen datos generales de la población, diversidad genética, estructura genética y permutación para diferenciación genética entre poblaciones. La última de las tablas mencionadas corresponde a un test de significancia de la diferenciación total realizada entre poblaciones. Para este efecto se considera como Hipótesis Nula la proposición “No hay diferenciación genética entre poblaciones”. El programa proporciona además los siguientes parámetros:

Límite inferior 95% Si el F_{st} observado es MENOR que este valor, se puede concluir que las poblaciones actuales son más similares que los arreglos aleatorios de los individuos.

Límite superior 95% Si el F_{st} observado es MAYOR que este valor, se puede concluir que las poblaciones actuales son más

genéticamente diferenciadas que los arreglos aleatorios de los individuos.

Valor P (bajo) Probabilidad de error tipo I - probabilidad de rechazar una hipótesis nula verdadera, como una prueba de una cola con el valor de F_{st} MENOR que los valores bajo la hipótesis nula.

Valor P (alto) Probabilidad de error tipo I - probabilidad de rechazar una hipótesis nula verdadera, con el valor de F_{st} MAYOR que los valores bajo la hipótesis nula.

Para las demás tablas, se lista a continuación la terminología utilizada.

Tabla VI: Terminología AFLPsurv 1.0

Símbolo	Significado
n:	Número promedio de individuos registrados
#loc:	Número de loci registrados
#loc_P:	Número de loci polimórficos a nivel del 5% - confrecuencias alélicas dentro del rango de 0.05 y 0.95
PLP:	Proporción de loci polimórficos a nivel del 5% expresada en porcentaje
Hj:	Heterocigocidad esperada
S.E.:	Error estándar
Var:	Varianza
Hw:	Heterocigocidad esperada media dentro de las poblaciones
Ht:	Diversidad genética total
Fst:	Índice de fijación de Wright. Indica la proporción total de diversidad genética que ocurre entre poblaciones

Fuente: Investigación realizada

La heterocigocidad esperada es un valor calculado a partir de las frecuencias alélicas obtenidas en cada locus. Debido a que los fragmentos generados por AFLP son marcadores dominantes, no es posible obtener la heterocigocidad observada. El índice Fst calcula la reducción de heterocigocidad esperada en poblaciones de apareamiento aleatorio entre un nivel de jerarquía relativo a otro nivel más inclusivo (33). Los valores de Fst son claves para determinar nivel de variabilidad genética entre poblaciones.

Los análisis realizados entre las poblaciones descritas por medio del software AFLPsurv 1.0 son presentados a continuación para cada uno de los juegos de iniciadores utilizados en este estudio.

Tabla VII: Análisis para el juego de iniciadores No. 18

Datos Poblacionales	Población	n	#loc.	#loc_P	PLP	Hj	S.E.(Hj)	Var(Hj)
	CHURUTE	20	69	32	46.4	0.09093	0.00717	0.000051
	6 DE JULIO	16	69	32	46.4	0.111641	0.00964	0.000093
	SALADO	20	69	41	59.4	0.15489	0.01363	0.000186
Diversidad Genética dentro de las poblaciones	n	Hw	S.E.(Hw)	Var(Hw)				
	3	0.1207	0.01859	0.000346				
Estructura genética poblacional	n	Ht	Hw	Fst				
	3	0.1215	0.1207	0.0061				
	S.E.		0.018590	0.000000				
	Var		0.000346	-0.014782				
Prueba de permutación para diferenciación genética entre poblaciones	Estadístico	Fst						
	observado	0.0061						
	Límite inferior 95%	-0.0092						
	Límite superior 95%	0.0053						
	Valor P (bajo)	0.9810						
	Valor P (alto)	0.0192						

Fuente: Investigación realizada

Para este par de iniciadores se calculó una heterocigocidad media intrapoblacional de 0.1207, mientras que el valor de diversidad genética total (heterocigocidad entre poblaciones) fue de 0.1215. Relacionando estos dos parámetros se obtuvo el Fst, el cual resultó 0.0061. La prueba de permutación para diferenciación genética, realizada con 5000 permutaciones muestra significancia ($p \leq 0.05$) para el Fst observado.

Tabla VIII: Análisis para el juego de iniciadores No 22

Datos Poblacionales	Población	n	#loc.	#loc_P	PLP	Hj	S.E.(Hj)	Var(Hj)
	CHURUTE	13	56	19	33.9	0.10516	0.01196	0.000143
	6 DE JULIO	16	56	19	33.9	0.10348	0.01423	0.000202
	SALADO	19	56	28	50.0	0.12372	0.01612	0.000260
Diversidad Genética dentro de las poblaciones	n	Hw	S.E.(Hw)	Var(Hw)				
	3	0.1108	0.00648	0.000042				
Estructura genética poblacional	n	Ht	Hw	Fst				
	3	0.1114	0.1108	0.0054				
	S.E.		0.006484	0.000000				
	Var		0.000042	-0.056334				
Prueba de permutación para diferenciación genética entre poblaciones	Estadístico	Fst						
	observado	0.0054						
	Límite inferior 95%	-0.0113						
	Límite superior 95%	0.0084						
	Valor P (bajo)	0.9402						
	Valor P (alto)	0.0600						

Fuente: Investigación realizada

Para este par de iniciadores se calculó una heterocigocidad media intrapoblacional de 0.1108, mientras que el valor de diversidad genética total (heterocigocidad entre poblaciones) fue de 0.1114. Relacionando estos dos parámetros se obtuvo el Fst, el cual resultó 0.0054. La prueba de

permutación para diferenciación genética, realizada con 5000 permutaciones no muestra significancia ($p \leq 0.05$) para el F_{st} observado.

Tabla IX: Análisis para el juego de iniciadores No 30

Datos Poblacionales	Población	n	#loc.	#loc_P	PLP	Hj	S.E.(Hj)	Var(Hj)
	CHURUTE	10	70	15	21.4	0.07214	0.00815	0.000066
	6 DE JULIO	14	70	24	34.3	0.08656	0.00707	0.000050
	SALADO	20	70	40	57.1	0.13840	0.01472	0.000217
Diversidad Genética dentro de las poblaciones	n	Hw	S.E.(Hw)	Var(Hw)				
	3	0.0990	0.02012	0.000405				
Estructura genética poblacional	n	Ht	Hw	Fst				
	3	0.1042	0.0990	0.0490				
	S.E.	0.020121		0.000000				
	Var	0.000405		-0.023183				
Prueba de permutación para diferenciación genética entre poblaciones	Estadístico	Fst						
	observado	0.0490						
	Límite inferior 95%	-0.0123						
	Límite superior 95%	0.0071						
	Valor P (bajo)	1.0000						
	Valor P (alto)	0.0000						

Fuente: Investigación realizada

Para este par de iniciadores se calculó una heterocigocidad media intrapoblacional de 0.0990, mientras que el valor de diversidad genética total (heterocigocidad entre poblaciones) fue de 0.1042. Relacionando estos dos parámetros se obtuvo el F_{st} , el cual resultó 0.0490. La prueba de permutación para diferenciación genética, realizada con 5000 permutaciones muestra significancia ($p \leq 0.05$) para el F_{st} observado.

Tabla X: Análisis para el juego de iniciadores No 32

Datos Poblacionales	Población	n	#loc.	#loc_P	PLP	Hj	S.E.(Hj)	Var(Hj)
	CHURUTE	12	60	14	23.3	0.09547	0.01138	0.000130
	6 DE JULIO	17	60	33	55.0	0.13481	0.01353	0.000183
	SALADO	19	60	31	51.7	0.13052	0.01552	0.000241
Diversidad Genética dentro de las poblaciones	n	Hw	S.E.(Hw)	Var(Hw)				
	3	0.1203	0.01246	0.000155				
Estructura genética poblacional	n	Ht	Hw	Fst				
	3	0.1207	0.1203	0.0035				
	S.E.		0.012459	0.141179				
	Var		0.000155	0.019931				
Prueba de permutación para diferenciación genética entre poblaciones	Estadístico	Fst						
	observado	0.0035						
	Límite inferior 95%	-0.0116						
	Límite superior 95%	0.0089						
	Valor P (bajo)	0.9058						
	Valor P (alto)	0.0944						

Fuente: Investigación realizada

Para este par de iniciadores se calculó una heterocigocidad media intrapoblacional de 0.1203, mientras que el valor de diversidad genética total fue de 0.1207. Relacionando estos dos parámetros se obtuvo el F_{st} , el cual resultó 0.0035. La prueba de permutación para diferenciación genética, realizada con 5000 permutaciones no muestra significancia ($p \leq 0.05$) para el F_{st} observado.

Tabla XI: Análisis para el juego de iniciadores No 36

Datos Poblacionales	Población	n	#loc.	#loc_P	PLP	Hj	S.E.(Hj)	Var(Hj)
	CHURUTE	20	64	30	46.9	0.10241	0.01230	0.000151
	6 DE JULIO	16	64	25	39.1	0.10797	0.01255	0.000158
	SALADO	20	64	33	51.6	0.14436	0.01738	0.000302
Diversidad Genética dentro de las poblaciones	n	Hw	S.E.(Hw)	Var(Hw)				
	3	0.1182	0.01316	0.000173				
Estructura genética poblacional	n	Ht	Hw	Fst				
	3	0.1209	0.1182	0.0221				
	S.E.		0.013155	0.000000				
	Var		0.000173	-0.032434				
Prueba de permutación para diferenciación genética entre poblaciones	Estadístico	Fst						
	observado	0.0221						
	Límite inferior 95%	-0.0098						
	Límite superior 95%	0.0056						
	Valor P (bajo)	1.0000						
	Valor P (alto)	0.0000						

Fuente: Investigación realizada

Para este par de iniciadores se calculó una heterocigocidad media intrapoblacional de 0.1182, mientras que el valor de diversidad genética total fue de 0.1209. Relacionando estos dos parámetros se obtuvo el F_{st} , el cual resultó 0.0221. La prueba de permutación para diferenciación genética, realizada con 5000 permutaciones muestra significancia ($p \leq 0.05$) para el F_{st} observado.

Tabla XII: Análisis para el juego de iniciadores No 56

Datos Poblacionales	Población	n	#loc.	#loc_P	PLP	Hj	S.E.(Hj)	Var(Hj)
	CHURUTE	20	59	29	49.2	0.10785	0.00944	0.000089
	6 DE JULIO	17	59	26	44.1	0.11064	0.00982	0.000096
	SALADO	20	59	35	59.3	0.15214	0.01680	0.000282
Diversidad Genética dentro de las poblaciones	n	Hw	S.E.(Hw)	Var(Hw)				
	3	0.1235	0.01432	0.000205				
Estructura genética poblacional	n	Ht	Hw	Fst				
	3	0.1251	0.1235	0.0123				
	S.E.	0.014319		0.000000				
	Var	0.000205		-0.049709				
Prueba de permutación para diferenciación genética entre poblaciones	Estadístico	Fst						
	observado	0.0123						
	Límite inferior 95%	-0.0091						
	Límite superior 95%	0.0045						
	Valor P (bajo)	0.9996						
Valor P (alto)	0.0006							

Fuente: Investigación realizada

Para este par de iniciadores se calculó una heterocigocidad media intrapoblacional de 0.1235, mientras que el valor de diversidad genética total fue de 0.1251. Relacionando estos dos parámetros se obtuvo el F_{st} , el cual resultó 0.0123. La prueba de permutación para diferenciación genética, realizada con 5000 permutaciones muestra significancia ($p \leq 0.05$) para el F_{st} observado.

Tabla XIII: Análisis para el juego de iniciadores No 60

Datos Poblacionales	Población	n	#loc.	#loc_P	PLP	Hj	S.E.(Hj)	Var(Hj)
	CHURUTE	19	62	27	43.5	0.08638	0.00743	0.000055
	6 DE JULIO	17	62	25	40.3	0.09501	0.00723	0.000052
	SALADO	20	62	36	58.1	0.13583	0.01382	0.000191
Diversidad Genética dentro de las poblaciones	n	Hw	S.E.(Hw)	Var(Hw)				
	3	0.1057	0.01525	0.000233				
Estructura genética poblacional	n	Ht	Hw	Fst				
	3	0.1075	0.1057	0.0163				
	S.E.	0.015249		0.000000				
	Var	0.000233		-0.037689				
Prueba de permutación para diferenciación genética entre poblaciones	Estadístico	Fst						
	observado	0.0163						
	Límite inferior 95%	-0.0088						
	Límite superior 95%	0.0026						
	Valor P (bajo)	1.000						
	Valor P (alto)	0.0000						

Fuente: Investigación realizada

Para este par de iniciadores se calculó una heterocigocidad media intrapoblacional de 0.1057, mientras que el valor de diversidad genética total fue de 0.1075. Relacionando estos dos parámetros se obtuvo el Fst, el cual resultó. La prueba de permutación para diferenciación genética, realizada con 5000 permutaciones muestra significancia ($p \leq 0.05$) para el Fst observado.

Para todos los juegos de iniciadores se registran valores de Fst menores a 0.05. En cinco de los siete pares este resultado es categorizado como significativo con la prueba de permutación para diferenciación genética.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

A fin de optimizar el proceso de extracción de ADN se realizó una prueba preliminar en donde se compara la extracción entre el protocolo sugerido por la casa comercial INVITROGEN™ y uno adaptado en el cual se concentró los hemocitos por centrifugación. Como resultado de esta prueba, se observó una mayor concentración y calidad del ADN extraído en el proceso adaptado con concentración de hemocitos y suspensión en citrato de sodio al 10% pH 7.5. Los fluidos animales tales como sangre y hemolinfa poseen factores inhibidores de la amplificación por PCR. Dichos factores actúan en varios niveles: interfieren con la interacción ADN-polimerasa, bloquean la actividad enzimática de la misma o reducen la concentración de iones magnesio disponibles para la polimerasa (34).

La concentración de hemocitos logra que muchos de estos agentes no estén presentes durante la extracción de ADN al retirar el sobrenadante y dejar solamente las células de interés. Además, basados en datos

experimentales se puede manifestar que la presencia de contaminantes en las muestras de ADN extraído, degrada severamente al mismo. El proceso descrito asegura que haya menos degradación durante la extracción, por consiguiente, el eluido final contiene mayor concentración y calidad de ADN.

La concentración de hemocitos por centrifugación junto con una eficiente extracción de ADN con el método de columnas de sílice permiten que las muestras utilizadas para el protocolo AFLP sean adecuadas. La concentración y pureza del ADN fue verificada en la cuantificación del mismo.

El protocolo AFLP para *U. occidentalis* fue realizado exitosamente, esto fue logrado gracias a que la extracción de ADN fue eficiente y al uso de las concentraciones adecuadas del mismo. Fue comprobado que el utilizar menos ADN molde del recomendado por la casa comercial es insuficiente para apreciar resultados. Por otra parte, el uso de concentraciones de ADN mayores a las sugeridas inhiben los procesos de amplificación. Ambos escenarios son indeseados y fueron superados durante el desarrollo de este estudio por medio de la cuantificación de ADN.

El método de revelado seleccionado en estudio para los geles de poliacrilamida al 6% fue de tinción a la plata debido a su relativo bajo costo y alta sensibilidad. Se probaron varias metodologías para revelar los

amplicones: bromuro de etidio, SYBR gold, SYBR safe y por último tinción a la plata. Se trata de agentes intercalantes usados para señalar a los ácidos nucleicos.

El bromuro de etidio ha sido comúnmente utilizado en geles de electroforesis debido a su fácil utilización y bajo costo, se puede apreciar su fluorescencia a través de la luz ultravioleta. Sin embargo, sus efectos mutagénicos pueden resultar peligrosos para el investigador si no se maneja con precaución. Las moléculas como SYBR gold y SYBR safe presentan un riesgo mucho menor para el investigador (35). Sin embargo, dichas alternativas no presentan la sensibilidad adecuada para este tipo de estudios.

Los geles de electroforesis utilizados para propósitos de esta tesis, son de alta resolución, comparable con los de secuenciación, debido a su capacidad de mostrar diferencias de hasta 1pb. Por consiguiente, fue necesario utilizar una técnica sensible pero sin los altos riesgos que presenta el bromuro de etidio y con una mayor sensibilidad.

Cada par de iniciadores usado durante el proceso AFLP fue probado con cuatro de las muestras, pertenecientes a las tres zonas de estudio. Al ser separados los fragmentos en un gel de electroforesis de poliacrilamida al 6%, se develó el perfil de estos individuos, y fue posible comparar entre los juegos de iniciadores para escoger los más apropiados.

Los criterios de selección se basaron en su utilidad para analizar variabilidad genética. Por tanto, fueron descartados los que presentaron amplicones hipervariables y aquellos que resultaron de difícil lectura (baja resolución, poca amplificación).

Los pares de iniciadores seleccionados, fueron el No. 18, 22, 30, 32, 36, 56 y 60 los que mostraron mayor resolución de las bandas, generaron mayor información y tuvieron fragmentos del mismo tamaño en las distintas muestras. Esta última característica es la más significativa, ya que se asume que estos amplicones pertenecen al mismo locus para las distintas muestras. De esta manera, se puede comparar los loci en todos los individuos y verificar si están presentes o no. La variabilidad puede ser investigada partiendo de un locus en común.



Figura 8: Gel de electroforesis en Poliacrilamida al 6% para selección de iniciadores: Juego No. 30 (fragmento). Muestra amplicones obtenidos por la técnica AFLP con las muestras A: 17 de Salado, B: 27 de Churute, C: 12 de 6 de Julio y D: 22 de 6 de Julio. Nótense los fragmentos de similar tamaño en las muestras analizadas.

Fuente: María Fernanda Ratti

Anteriormente se ha descrito la importancia del valor F_{st} en la diferenciación genética entre poblaciones, en este estudio se encontraron valores menores a 0.05. Los valores F de Wright están comprendidos teóricamente de un mínimo de 0 (indicando divergencia genética nula) y un máximo de 1 (indica fijación para alelos alternativos entre subpoblaciones). Wright propuso la siguiente guía para interpretación del valor F_{st} :

- El rango de 0 a 0.05 puede ser considerado como indicación de **poca** diferenciación genética.

- El rango de 0.05 a 0.15 indica diferenciación genética **moderada**.
- El rango de 0.15 a 0.25 supone una **gran** diferenciación genética.
- Valores sobre el 0.25 es indicio de una diferenciación genética **muy grande**. (33).

En los siete juegos de iniciadores utilizados, el F_{st} calculado indica poca diferenciación genética entre las poblaciones; por lo tanto se puede aseverar que la mayor parte de la variabilidad genética está dada dentro de las poblaciones. Así, el 5% de la variación genética está dada entre las poblaciones de estudio, mientras que el 95% está presente dentro de ellas.

Este resultado, es significativo en cinco de los siete juegos de iniciadores de acuerdo a la prueba de permutación para diferenciación genética. Dicha prueba se utiliza para dar soporte estadístico a los valores obtenidos de diferencia genética, se basa en técnicas de muestreos repetitivos.

Una prueba de significancia por permutación nos dice si el efecto observado puede producirse “sólo por casualidad” seleccionando una muestra aleatoria; si no es así, tenemos evidencia de que el efecto observado en la muestra refleja un efecto presente en la población (36). Aun siendo inconsistente el resultado en dos de los pares de iniciadores, las observaciones para los otros cinco juegos de iniciadores son suficientemente significativos y concordantes entre ellos. Lo que indica

que estos cinco marcadores pueden ser utilizados para estudios de variabilidad genética en *U. occidentalis*.

Estos resultados preliminares de la variabilidad genética en *U. occidentalis* muestra que la principal causa de variación es la deriva genética. La migración como fuerza evolutiva parece no influir significativamente sobre esta especie. En resultados obtenidos con RFLP y RAPD para *U. cordatus*, una especie muy cercana que se encuentra en Brasil, se comprobó la capacidad de flujo genético entre individuos de diferentes estuarios (37). Sin embargo, no existe evidencia en *U. occidentalis* de hábitos migratorios que pudieran respaldar la extensión de su flujo genético como fuerza evolutiva en este caso de estudio.

Con el fin de establecer el nivel de variabilidad genética se ha utilizado los índices de fijación (F de Wright), los cuales son herramientas útiles de diferenciación genética al ser capaces de comparar los distintos niveles de una población jerárquica. Por ejemplo: el índice F_{sr} considera una subpoblación relativo a los agregados regionales y el F_{rt} la relación entre los agregados regionales y la población total (33). Se ha considerado el valor de F_{st} como referente de la variación existente entre poblaciones, y la sustracción de este valor de 1,0 como la variación dentro de la población. Por tanto, si las poblaciones tienen un F_{st} promedio de 0.0163, (1.63%), se puede aseverar que los restantes 0.9836 (98.36%)

corresponden a la variación dentro de las poblaciones. Este resultado intrapoblacional es indicador de condiciones genéticamente saludables. Por tanto, según los análisis realizados con AFLP, las actividades que podrían afectar a las frecuencias alélicas tales como la captura (factor que se presenta en la zona de 6 de Julio principalmente) no afectan significativamente a las frecuencias alélicas.

El nivel de variabilidad genética determinado en esta tesis corresponde al cálculo realizado con la técnica AFLP, cabe mencionar que los resultados podrían variar si se evalúa con otras técnicas como los microsatélites (SSR single sequence repeats). Dichas técnicas demandan de conocimiento de las secuencias genómicas de la especie, o en su defecto de otras herramientas de biología molecular que requieren mayor tiempo y recursos económicos para su implementación. Sin embargo, debido a su calidad de generar marcadores codominantes son más informativos. Por consiguiente, los análisis con marcadores codominantes pueden resultar en un nivel mayor de variabilidad genética.

CONCLUSIONES

1. La técnica AFLP es factible para establecer variabilidad genética en *U. occidentalis*, el sistema fue estandarizado y capaz de detectar polimorfismos en las muestras utilizadas.
2. Se determinó poca variabilidad genética en *U. occidentalis* acorde a los F_{st} calculados (<0.05) entre las poblaciones de estudio. La variación se encuentra primordialmente dentro de las poblaciones descritas, indicando que son genéticamente saludables. El esfuerzo de pesca al que está sometida esta especie principalmente en la zona de 6 de Julio no ha alterado significativamente las frecuencias alélicas de las poblaciones de *U. occidentalis*.
3. El nivel de variabilidad genética calculado corresponde a un proceso de deriva genética, no se logró comprobar que otras fuerzas evolutivas influyan sobre la salud genética de *U. occidentalis* en las zonas estudiadas.

RECOMENDACIONES

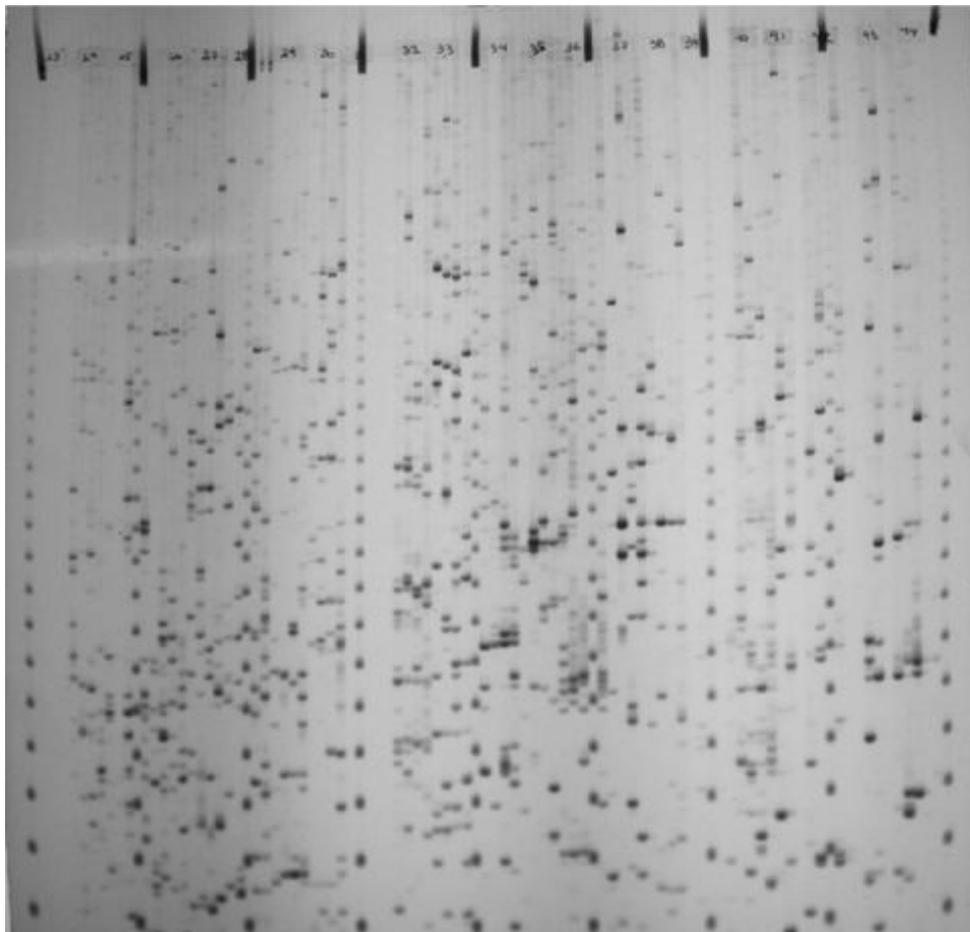
1. Utilizar otras técnicas moleculares como los SSR (Single Sequence Repeats), SNP (Single Nucleotide Polymorphism), entre otras para verificar el nivel de variabilidad genética encontrado en *U. occidentalis*.
2. Indagar en las secuencias nucleotídicas de *U. occidentalis* para que sea posible utilizar técnicas más precisas y sensibles de polimorfismos. Estas secuencias pueden ser utilizadas para estudios de conservación de esta especie tan importante para las zonas estuarinas del Golfo de Guayaquil.
3. El estudio de variabilidad genética debería ser aplicado a otras especies de interés comercial, ya que revelaría el estado de salud poblacional a nivel genético dentro y entre poblaciones.

ANEXOS

ANEXO A

Gel de electroforesis en Poliacrilamida al 6% para selección de iniciadores

A continuación se muestra la fotografía del gel número 2 utilizado para separar los fragmentos obtenidos por la técnica AFLP con todos los pares de iniciadores para las muestras 17 de Salado, 27 de Churute, 12 y 22 de 6 de Julio. Constan en esta figura los juegos de iniciadores desde el No. 23 al 44.

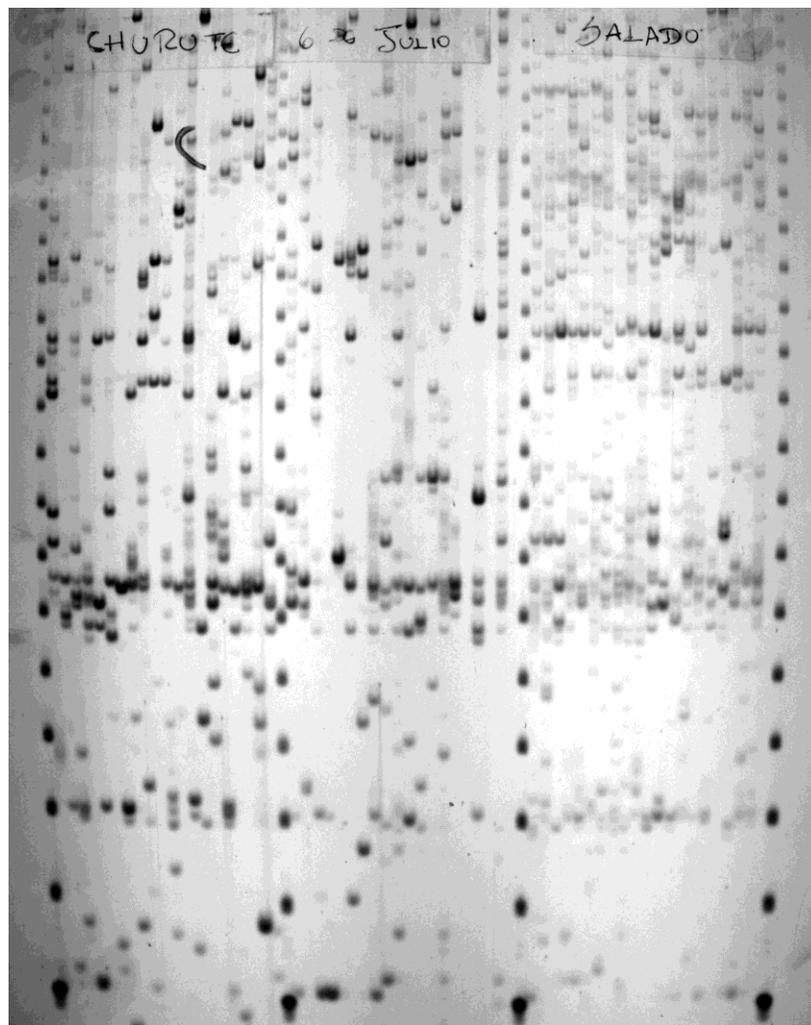


Fuente: María Fernanda Ratti

ANEXO B

Gel de electroforesis en Poliacrilamida al 6% para todas las muestras.

La siguiente imagen corresponde al gel de poliacrilamida en el cual se separaron los fragmentos obtenidos por la técnica AFLP con el juego de iniciadores No. 36 para todas las muestras de las tres zonas de estudio.



Fuente: María Fernanda Ratti