

Universidad de San Carlos de Guatemala  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia  
Programa experiencias docentes con la comunidad  
Subprograma de EDC-Biología

INFORME FINAL DE INVESTIGACIÓN

Evaluación de la diversidad genética de *Thalassia testudinum* Banks ex König, en  
poblaciones marino-costeras del Atlántico guatemalteco.

Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología -LENAP-

Periodo de realización

Enero 2012- Enero 2013

José Esteban Paiz Mazariegos

Profesor supervisor de EDC: Lic. Gabriela Armas

Asesora de Investigación: Br. María de los Ángeles Ariza

Vo. Bo. Asesora de Investigación:

## INDICE

Resumen	1
Introducción	2
Planteamiento del problema	3
Justificación	3
Referente teórico	4
Objetivos	8
Hipótesis	8
Metodología	8
Resultados	11
Discusión de resultados	12
Conclusiones	15
Recomendaciones	15
Referencias Bibliográficas	16
Anexos	17

## RESUMEN

Hoy en día existe un gran número de amenazas a las cuáles están expuestos los humedales de nuestro país, dentro de estas amenazas encontramos la contaminación del agua debido a la explotación y expansión agrícola, ganadería, los procesos de erosión del suelo y al crecimiento urbano (Sigüenza y Ruíz, 2000). Por lo anterior se ha incrementado la cantidad de nutrientes (principalmente fósforo y nitrógeno) que llegan a los ríos y desembocan en la costa Atlántica desencadenando un desequilibrio ecológico que afecta a la biodiversidad, la economía y la salud de las personas. Entre las especies afectadas por la contaminación en esta zona encontramos a *Thalassia testudinum*, especie elemental ya que proporciona refugio y alimento a organismos como tortugas marinas, macro invertebrados, manatíes (Björk & otros, 2008, p. 16) y fauna de importancia comercial, además de atenuar la velocidad del oleaje, protegiendo las costas de la erosión (Björk, 2008, p.135).

Debido a lo anterior se hace de vital importancia conocer la diversidad genética de *T. testudinum*, en áreas marino-costeras prístinas y áreas altamente contaminadas mediante la utilización de marcadores moleculares para conocer si existe diferencia en cuanto a la diversidad genética de ambas poblaciones. *T. testudinum* es una especie de pasto marino que posee la capacidad de reproducirse de forma sexual, esto ocurre cuando las condiciones ambientales son favorables y asexual (clonal) cuando se ve fuertemente presionada por el ambiente (Eguiarte, Souza, Aguirre, 2007, p.223) producto de las perturbaciones provocadas por el ser humano. Esto provoca que la especie sea más susceptible a cambios bruscos en el ambiente ya que redujo su diversidad genética.

Para realizar la colecta de *T. testudinum* se ubicaron 4 puntos geográficos en la zona marino costera del Atlántico de Guatemala, de los cuales dos representan áreas sometidas a altas presiones por actividades antropogénicas y otras dos donde las presiones por actividades antropogénicas son poco significativas. En cada uno de los sitios se colocó un transecto lineal de forma paralela a la línea de la costa, de un largo de 102 metros lineales. En la primera sección se tomarán 6 muestras a una distancia de 2 metros, entre una y otra, las siguientes tres muestras estarán separadas por 25 metros una de otra, y por último una nueva sección de 6 muestras separadas por dos metros, para obtener un total de 15 muestras por sitio (modificado de van Dijk & otros 2010). En cada transecto con la ayuda de un equipo autónomo de buceo (SCUBA) se tomará muestras de tejido vegetal correspondiente a las láminas foliares de cada ramet de la especie. Los resultados obtenidos se anotarán en una boleta para sistematizar la información. Los tejidos colectados de *T. testudinum*, se guardarán en sobres de papel, identificados por número y lugar de colecta.

Para extraer el ADN del tejido de hojas secas se utilizara el protocolo empleado por van Dijk & otros (2009 p. 69) con el mini kit DNAeasy Plant (QUIAGEN). Se observará la calidad de ADN obtenido por medio de electroforesis en geles de agarosa, posteriormente se almacenarán en refrigeración a una temperatura de -20°C previo a realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Utilizando los cebadores propuestos por van Dijk & otros en (2007 p. 69) se amplificará los fragmentos correspondientes a los loci de los microsatélite para ser luego realizar una electroforesis en geles de poliacrilamida. Los genotipos obtenidos se leerán en el programa Arlequín propuesto por Arnaud-Hound & otros (2007 p16).

## INTRODUCCIÓN

Actualmente la diversidad biológica atraviesa una crisis, ya que, muchas especies se encuentran amenazadas o en peligro, otras muchas ya se han extinto, todo ello debido principalmente a las actividades humanas. La biología de la conservación dio origen a la genética de la conservación, al hacerse evidentes varios problemas genéticos asociados con las especies en peligro de extinción. Algunos de estos problemas son la pérdida de la diversidad genética que a su vez es producto de la reducción de los tamaños poblacionales, otro de estos son los cambios que se producen en la estructura poblacional producto de la fragmentación de los hábitats. La diversidad genética es muy importante en las poblaciones ya que les permite sobrellevar los cambios ambientales por medio de adaptaciones y por lo tanto evolucionar; por otro lado la pérdida de la diversidad genética está asociada con la endogamia y con una capacidad reproductiva reducida. Debido a esto, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN por sus siglas en inglés) reconoce la necesidad de conservar la diversidad genética como una de las tres prioridades globales en la conservación (Eguiarte y Piñero, 1990).

Por lo mencionado anteriormente, esta investigación tiene como objetivo principal establecer si existe diferencia en la diversidad genética de poblaciones de *Thalassia testudinum* en áreas marino-costeras prístinas y áreas altamente contaminadas del Atlántico guatemalteco, mediante la utilización de marcadores moleculares polimórficos para analizar además la estructura poblacional en estos sitios. *Thalassia testudinum* es una especie de pasto marino que forma praderas submarinas, en gran parte de la zona del litoral del Océano Atlántico, desde Norteamérica hasta el sur de Colombia. Es la especie dominante en el litoral Atlántico de Guatemala, y tiene un importante papel en el ecosistema, ya que, sirve de alimento a especies importantes como tortugas marinas y manatíes, especies altamente amenazadas en el país. También sirven de refugio a gran variedad de peces y macroinvertebrados, algunos con alto valor comercial para la población local.

Al encontrarse en condiciones ambientales desfavorables *Thalassia testudinum* opta por la reproducción asexual (clonación) reduciendo su diversidad genética y por lo tanto reduciendo su adecuabilidad como especie. Ésta reducción en la diversidad genética de la especie impacta también en otras especies de peces y moluscos (Van Dijk, 2007) de importancia comercial lo cual desfavorecería la pesca artesanal y comercial del área. Es de vital importancia conocer la diversidad genética para que en conjunto se conserve la diversidad biológica del área. La reducción de la diversidad genética puede conducir a procesos de endogamia, cuellos de botella haciendo que las poblaciones aisladas reduzcan su número poblacional y finalmente se extingan. Los estudios con pastos marinos realizados en el Atlántico de Guatemala se han llevado a cabo principalmente en la Bahía de la Graciosa, dentro del área protegida del Refugio de Vida Silvestre Punta de Manabique. Las especies que se reportan como más abundantes son *Thalassia testudinum* y *Syringodium filiforme* (Arrivillaga y Baltz, 1999, p.13). Arrivillaga y Baltz en 1999 compararon la diversidad de peces y macroinvertebrados en pastos marinos y sustratos sin vegetación. Más tarde en el 2006, Galán realiza un estudio comparativo de la diversidad y morfometría de *T. testudinum* en dos sitios de la bahía la Graciosa. En Guatemala hasta la fecha no se ha realizado ningún estudio que involucre biología molecular relacionado con *T. testudinum*. En el Atlántico mexicano, enfocados a encontrar patrones de diversidad clonal en ésta Región. Van Dijk y otros en los años 2007, 2009 y 2010 vienen realizando estudios con microsatélites en la región del atlántico de Florida y Puerto Morelos en México. En el 2010 Van

Dijk y van. Tussenbroek realizaron un estudio para medir la diversidad clonal y la estructura de las poblaciones de *T. testudinum* en 16 puntos de las costas del atlántico mexicano relacionando factores ambientales y la reacción de la especie respecto a su diversidad genética.

### **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Hoy en día existe un gran número de amenazas a las cuáles están expuestos los humedales de nuestro país, dentro de estas amenazas encontramos la contaminación del agua debido a la explotación y expansión agrícola, ganadería, los procesos de erosión del suelo y al crecimiento urbano (Sigüenza y Ruíz, 2000). Por lo anterior se ha incrementado la cantidad de nutrientes (principalmente fósforo y nitrógeno) que llegan a los ríos y desembocan en la costa Atlántica desencadenando un desequilibrio ecológico que afecta a la biodiversidad, la economía y la salud de las personas. Entre las especies afectadas por la contaminación en esta zona encontramos a *Thalassia testudinum*, especie elemental ya que proporciona refugio y alimento a organismos como tortugas marinas, macro invertebrados, manatíes (Björk & otros, 2008, p. 16) y fauna de importancia comercial, además de atenuar la velocidad del oleaje, protegiendo las costas de la erosión (Björk, 2008, p.135).

Debido a lo anterior se hace de vital importancia conocer la diversidad genética de *T. testudinum*, en áreas marino-costeras prístinas y áreas altamente contaminadas mediante la utilización de marcadores moleculares para conocer si existe diferencia en cuanto a la diversidad genética de ambas poblaciones. *T. testudinum* es una especie de pasto marino que posee la capacidad de reproducirse de forma sexual, esto ocurre cuando las condiciones ambientales son favorables y asexual (clonal) cuando se ve fuertemente presionada por el ambiente (Eguiarte, Souza, Aguirre, 2007, p.223) producto de las perturbaciones provocadas por el ser humano. Esto provoca que la especie sea más susceptible a cambios bruscos en el ambiente ya que redujo su diversidad genética.

### **JUSTIFICACIÓN**

Hoy en día existe un gran número de amenazas a las cuáles están expuestos los humedales de nuestro país, dentro de estas amenazas encontramos la contaminación del agua debido a la explotación y expansión agrícola, ganadería, los procesos de erosión del suelo y al crecimiento urbano (Sigüenza y Ruíz, 2000). Por lo anterior se ha incrementado la cantidad de nutrientes (principalmente fósforo y nitrógeno) que llegan a los ríos y desembocan en la costa Atlántica desencadenando un desequilibrio ecológico que afecta a la biodiversidad, la economía y la salud de las personas. Este problema se evidencia en la costa Atlántica de Guatemala, debido a la presión generada por poblaciones humanas como Puerto Barrios y Livingston así como por las desembocaduras de los ríos Sarstún y Río Dulce, los cuales en el recorrido de su cauce colectan gran cantidad de nutrientes y residuos antes mencionados, los que finalmente son depositados en esta área.

*Thalassia testudinum* es una especie de pasto marino que forma praderas submarinas, en gran parte de la zona del litoral del Océano Atlántico, desde Norteamérica hasta el sur de Colombia. Es la especie dominante en el litoral Atlántico de Guatemala, y tiene un importante papel en el ecosistema, ya que, sirve de alimento a especies importantes como tortugas marinas y manatíes, especies altamente amenazadas en el país. También sirven de refugio a gran variedad de peces y macroinvertebrados, algunos con alto valor comercial para la población local. En condiciones

ambientales desfavorables *Thalassia testudinum* opta por la reproducción asexual (clonación) reduciendo su diversidad genética y haciendo que disminuya su adecuabilidad como especie. Ésta reducción en la diversidad genética de la especie trae consigo también la reducción de la diversidad de especies de peces y moluscos (Van Dijk, 2007) de importancia comercial lo cual desfavorecería la pesca artesanal y comercial del área. Es muy importante conocer la diversidad genética para que en conjunto se conserve la diversidad biológica del área. La reducción de la diversidad genética puede conducir a procesos de endogamia, cuellos de botella haciendo que las poblaciones aisladas reduzcan su número poblacional y finalmente la extinción. Es necesario analizar y conservar la diversidad genética de *Thalassia testudinum* tomando en cuenta el valor que tiene el mantener el equilibrio ecológico, el factor económico y la seguridad alimentaria que representa para las comunidades que se encuentran asentadas a sus alrededores. En la actualidad se han aplicado nuevas disciplinas para una eficiente medición de este tipo de fenómenos (Endogamia, reducción de la diversidad genética en las poblaciones), una de ellas es la ecología molecular mediante la utilización de marcadores moleculares, como los AFLPS, RAPDS y Microsatélites. Es por ello que la importancia y pertinencia de este estudio radica en la implementación de nuevas técnicas y metodologías para estudiar la diversidad genética de *Thalassia testudinum* y poder de esta manera tomarla en cuenta al momento de la toma de decisiones para reducir el impacto en los ecosistemas que afectan a la diversidad biológica y a las poblaciones humanas que utilizan las áreas y dependen de ellas. La aplicación en estudios de genética de la conservación que involucran estas técnicas, nos permiten evaluar los cambios en la diversidad genética, y cómo esta afecta la estructura poblacional de tan importante especie.

## REFERENTE TEÓRICO

### **Definición y clasificación taxonómica de los pastos marinos**

Los pastos marinos son angiospermas que se han adaptado a la vida acuática en la mayoría de los continentes del mundo.

Estos descendientes de las plantas terrestres que volvieron al océano alrededor de 100 a 65 millones de años atrás (Björk, 2008, p.12) conforman un gremio, no un solo grupo filogenético, y varias familias de pastos marinos no están cercanamente relacionadas. (Kuo y den Hartog, 2001, p.25). Hay alrededor de 60 especies en el mundo, y estas están agrupadas en 12 géneros y 4 familias.

### **Biología de *Thalassia testudinum* Banks ex König**

*Thalassia testudinum* Banks ex König, es una especie de pasto marino que pertenece al filo Magnoliophyta, clase Liliopsida, orden Hydrocharitales familia hydrocharitaceae (Cook, 1996, p 6; den Hartog y Kuo, 2006, p.16).

Las *hydrocharitáceas* son plantas acuáticas monoicas o dioicas, anuales o perennes, teniendo en cualquier caso un rizoma rastrero monopódico, con raíces en los nudos, las hojas dísticas o raramente trísticas, o con un eje principal erecto, altamente contráctil, con raíces en la base, y hojas espiraladas o verticilado. Hojas sumergidas a veces flotando o parcialmente emergentes, lineares, lanceoladas, elípticas, ovadas u orbiculares, en cualquier caso sésiles, envainando a veces desde la base, o diferenciándose en una hoja y peciolo siempre con una lígula; nerviación más o menos paralela recta o curvada, conectadas por venas ascendentes perpendiculares.

Estípulas a veces presentes. La familia contiene 17 géneros de los cuales *Thalassia*, *Halophila* y *Enhalus* son completamente marinos (den Hartog y Kuo, 2006 p. 24; Cook, 1996, p. 5).

### **Morfología de *Thalassia testudinum* Banks ex König**

La morfología de *Thalassia testudinum* consiste principalmente en raíces o rizomas para el anclaje al sustrato, y para mantener la comunicación entre los brotes como en las otras monocotiledóneas, los tallos brindan el soporte mecánico (Hogarth, 2007, p.27). Y las partes superiores consistiendo en retoños de varias hojas. Por lo general las hojas están protegidas por una vaina basal, la cual se encarga de dar protección a los meristemos apicales y las hojas jóvenes (Kuo y den Hartog, 2006, p. 2).

Su reproducción es tanto vegetativa (clonal) como sexual, aunque no es frecuente encontrar flores y se ha estimado que para la mayoría de las especies no más del 10% de los vástagos desarrolla flores en un año (Hemminga y Duarte, 2000, 15). Las flores pueden ser solitarias o en inflorescencia, y los frutos suelen ser generalmente indehiscentes y portan una sola semilla.

### **Importancia Ecológica de *Thalassia testudinum* Banks ex König**

Dentro de las funciones que cumple *T. testudinum*, está la de proveer de alimentos a ciertas especies como las tortugas marinas, los macroinvertebrados, los peces herbívoros que se han especializado para digerir a estas plantas con flor. También se encargan de proveer de sustrato y refugio para crías de peces y macroinvertebrados, brindándoles resguardo de los depredadores (Björk, 2008, p.13). Los pastos marinos tropicales como *T. testudinum* son muy importantes en sus interacciones con los manglares y los arrecifes de coral, ya que ejercen un sistema de estabilización en el ambiente, siendo indispensables como soporte físico y biológico para otras comunidades (Björk, 2008).

### **Diversidad genética**

Por diversidad genética se entiende la variación de los genes dentro de cada especie. Esto abarca poblaciones determinadas de la misma especie o la variación genética de una población. La diversidad genética representa la variación heredable dentro y entre poblaciones de organismos. Las nuevas variaciones genéticas provienen de mutaciones del gen y en el caso de individuos en el cromosoma, además en organismos con el poder de reproducción sexual pueden esparcirse a la población por medio de la recombinación. La frecuencia de genes dentro de la población total es la resultante de la selección natural, y a su vez, es la determinante de la evolución de la población. La diversidad genética se puede medir utilizando la diversidad de genes, la heterocigosidad, o el número de alelos por locus. (Zamudio, T. 2005)

El estudio de la diversidad genética se incluye dentro de la genética de poblaciones, la cual es parte central de la teoría evolutiva moderna, y sus aportes a la biología de la conservación han ido creciendo conforme su teoría y práctica han ido integrándose en la disciplina que ahora se conoce como Genética de la Conservación (Eguiarte y Piñero, 1990).

Uno de los objetivos clave de la genética de la conservación es ayudar a minimizar las extinciones evitando los problemas relacionados con tamaños efectivos pequeños, como el efecto deletéreo de la endogamia, la pérdida de diversidad y la habilidad para evolucionar en respuesta a los cambios ambientales, así como los efectos deletéreos que ocurren por la cruce entre individuos

muy distintos. Los análisis genéticos también permiten estudiar el efecto de la fragmentación y la reducción del flujo génico en poblaciones estructuradas y el efecto de la acumulación y pérdida de mutaciones deletéreas.

### **La pérdida de la diversidad genética**

La diversidad genética tiene como función mantener un reservorio de condiciones de variación de respuesta al medio, que permita la adaptación y la supervivencia. Ante ello, la importancia de cualquier alteración en la diversidad genética es incierta. Las especies con poca diversidad genética tienen mayor riesgo frente a esos cambios. En general, cuando el tamaño de las poblaciones se reduce, aumenta la reproducción entre organismos emparentados (consanguinidad) y hay una reducción de la diversidad genética. La importancia de la variación genética se resume diciendo: permite los cambios evolutivos sobre la base de una reproducción selectiva. (Hedrick, 2001)

La diversidad genética es sin lugar a dudas la materia prima para la evolución, ya que de ella dependen tanto la adaptación como la especiación. Los niveles altos de diversidad pueden dar la habilidad para responder a enfermedades, parásitos, depredadores y cambios ambientales (Hedrick, 2001) En general se han encontrado patrones en los niveles de diversidad con los que se hacen inferencias en los estudios de conservación. Por otro lado, generalmente se asume que la reducción en la diversidad se correlaciona con una baja adecuación.

### **Estructura y variación genética**

En su concepto la genética de poblaciones en especies clonales no es distinta a la de los organismos unitarios, por lo que requerimos obtener estimadores de la diversidad genética como  $H_t$  (heterocigosidad, como medida de diversidad genética total en una especie),  $H_s$  (diversidad genética dentro de poblaciones),  $G_{st}$  (diversidad genética entre poblaciones) y  $P_s$  (% loci polimórficos). Hamrick y Godt (1989) mostraron que las especies clonales presentan niveles altos de heterocigosidad y que la diversidad genética no difiere entre especies que presentan reproducción sexual con respecto a las que presentan tanto sexual como clonal.

Los estudios que se han realizado muestran, por un lado, que en especies con polimorfismo es fácil caracterizar los ramets y que en aquellas en las que la clonalidad no es muy frecuente (o quizá la endogamia), se puede obtener la identidad de genotipos con muy pocos primers y a partir de ese punto, calcular los índices de diversidad genética.

Muchos de los procesos biológicos fundamentales, como es el caso de las características y modo de actuar de los factores hereditarios, han podido ser explicados gracias a la aplicación de técnicas de investigación físico-químicas dando lugar a la disciplina científica denominada Biología Molecular. La Biología Molecular ha tomado un auge en los últimos años, ya que ha revolucionado la comprensión de la genética de las poblaciones y el entendimiento de la expresión de los genes que determinan características fenotípicas, con lo que se ha relacionado últimamente procesos ecológicos que intervienen en la expresión génica. La paternidad es una de las preguntas centrales en la ecología, pero muchas líneas de investigación en este tema no pudieron ser abordadas hasta hace poco menos de 30 años, dando recientemente origen a una



gran industria en el humano con la ayuda de las técnicas de Biología Molecular (Avice, 1994, p.73). Desde el punto de vista ecológico, la información sobre paternidad es esencial para abordar temas como la identificación de cepas bacterianas en la epidemiología, el análisis de la diversidad clonal (Li & Ge, 2001, p.585), el impacto de la endogamia en una población, la verificación de líneas de parentesco, determinación del tamaño efectivo de la población y estimación de la adecuación poblacional por vía masculina y femenina (Ellstrand & Marshall, 1985, p.819).

La paternidad puede ser determinada a partir de alelos que se heredan a las crías y que, si no están presentes en los otros individuos, éstos pueden ser excluidos como padres putativos. En la identidad genética de los individuos intervienen dos factores: la herencia parental y la mutación novedosa. Estas mutaciones ocurren aproximadamente cada 300 bases a lo largo del genoma humano (Vicard & Dawid, 2004, p. 19), y son estables desde el punto de vista evolutivo, ya que se mantienen a lo largo del tiempo, lo cual permite utilizar los loci en los que se presentan para diferenciar individuos y poblaciones. Esta recombinación o mutación espontánea genera, al amplificar ciertas regiones del genoma con diversos marcadores moleculares, patrones de bandeo distintos. Así, la esencia de los análisis de paternidad radica en identificar las similitudes y diferencias en estos patrones de bandeo entre individuos de una población, y por lo tanto se basa en la variación genética que se encuentre a nivel de ADN. Para realizar los análisis de paternidad se deben considerar dos aspectos: el tipo de marcador molecular que se va a utilizar y la forma en que se va a analizar mediante un modelo o una técnica computacional (Ellstrand & Marshall, 1985, p.819).

Los marcadores más utilizados son los microsatélites, que son una serie de repeticiones de un solo motivo compuesto de 1 a 6 bases (Hancock, 1998, p. 36), debido a que son marcadores codominantes altamente polimórficos y densamente distribuidos en el genoma de los organismos eucariontes que generan mucha información y son lo suficientemente específicos para diferenciar individuos dentro de una población. Actualmente los análisis con microsatélites se encuentran en una fase de crecimiento y se han aplicado a un gran número de especies (algunos referenciados en GENBANK). Los métodos para analizar la variación en un marcador molecular comparten el principio de considerar que una gran proporción de la información genética es específica del individuo y difiere entre individuos, por lo que el análisis de esta fracción diferente es la que puede proporcionar una identidad específica a cada uno de ellos (Hancock, 1998, p. 36).

Las aplicaciones de los análisis de paternidad se encuentran íntimamente ligadas al sistema de apareamiento y la estructura clonal del organismo de estudio. Dada la común propagación vegetativa en plantas, los análisis de paternidad han ayudado a identificar y separar ramets de genets. Esta separación es de suma importancia desde el punto de vista demográfico (la contabilidad de individuos en campo no es necesariamente el número de genotipos en el ambiente) y genético (en cuanto a la definición de unidades de selección y cuantificación de la adecuación), ya que se pueden tener errores demográficos con diversas implicaciones (Vicard & Dawid, 2004, p. 20).

Desde el punto de vista ético, el uso de marcadores moleculares para la conservación de las especies permite detener la extinción de las mismas y adecuar su manejo con bases genéticas firmes que no supongan un fracaso en cualquier acción establecida (Eguiarte, 2007, p. 172).

### **Microsatélites como marcadores moleculares**

Los microsatélites o secuencias simples repetidas (SSRs) son secuencias de ADN formadas de 1 a 4 pares de bases, por ejemplo mononucleótidos (TT)<sub>n</sub>, dinucleótidos (AT)<sub>n</sub>, o tetranucleótidos (AAGG)<sub>n</sub>. Estos loci se encuentran en regiones codificantes y no codificantes del ADN y es probable que se formen por eventos de rompimiento que generan polimorfismos con valores superiores al 90%. Los microsatélites de ADN nuclear han sido detectados en múltiples grupos de plantas y animales, y han sido utilizados fundamentalmente para estudios de variación genética intra e interespecífica, análisis de linajes y de sistemas reproductivos (Awadalla, Fuller, Powell & Ritland, 1997, p. 714).

Los microsatélites han tomado ventaja sobre otros marcadores genéticos como los AFLPs, RAPDs, RFLPs, debido a que: i) tienen el más alto grado de polimorfismo; ii) segregan de manera mendeliana y son codominantes; iii) la presencia de un solo locus genético por microsatélite hace que la lectura de las bandas sea clara y fácil de interpretar y iv) son selectivamente neutros (Golstein, Ruiíz & Pollock, 1994, p.463; Vendramin et al., 1996, p. 141).

### **OBJETIVOS**

#### **General**

- Establecer si existe diferencia en la diversidad genética de *Thalassia testudinum* en áreas marino-costeras prístinas y áreas altamente contaminadas.

#### **Específicos**

- Determinar descriptivos de diversidad genética (el número de alelos, heterocigosidad, diversidad haplotípica, proporción de loci polimórficos) de *Thalassia testudinum* en los sitios de muestreo.
- Establecer el grado de semejanza genética entre individuos (Estructuración poblacional) de *Thalassia testudinum* dentro de los sitios de muestreo.

### **HIPÓTESIS**

Hay mayor diversidad genética en áreas prístinas que en áreas altamente contaminadas.

### **METODOLOGÍA**

#### **DISEÑO**

**Población:** Praderas de *Thalassia testudinum* de la zona marino-costera del Atlántico de Guatemala.

**Muestra:** Ramets de *Thalassia testudinum* de la zona marino-costera del Atlántico de Guatemala ubicados en cuatro transectos lineales situados en los sitios de muestreo.

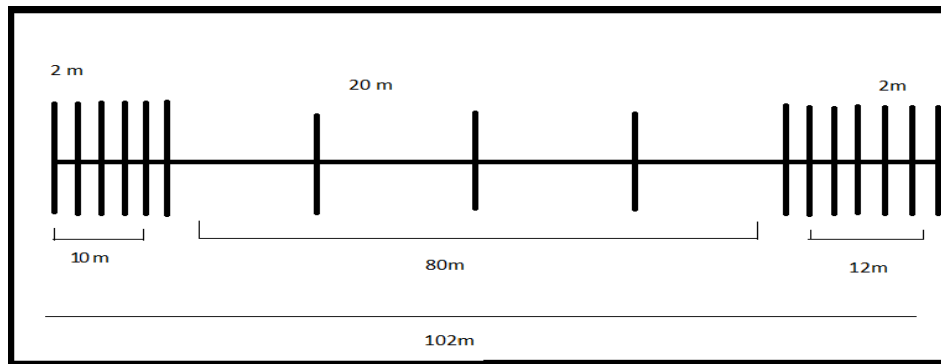
**Unidad muestral:** 15 muestras de tejido vegetal de *Thalassia testudinum* colectadas sistemáticamente a lo largo de un transecto lineal de 102 metros colocados de forma paralela a la línea de la costa de cada uno de los tratamientos.

### **RECOLECCIÓN DE DATOS**

Se ubicó 4 puntos geográficos en la zona marino costera del Atlántico de Guatemala, de los cuales dos representan áreas sometidas a altas presiones por actividades antropogénicas 1) Punta de

Palma, 2) Green Bay, , y otras dos áreas con baja perturbación, 3) Tomza 4) Chatarra (Ver anexo no. 2).

En cada punto se realizó la toma de muestras de pastos marinos por medio del método de muestreo modificado de van Dijk, 2010. El método consistió en colocar un transecto lineal de forma paralela a la línea de la costa, de un largo de 102 metros lineales, las muestras se colectaron de acuerdo a la figura 3. Con la ayuda de un equipo autónomo de buceo (SCUBA) se tomó cada muestra de tejido vegetal correspondiente a las láminas foliares de cada ramet de la especie. En la primera sección del transecto, se tomó 6 muestras a una distancia de 2 metros entre cada una, iniciando en el segundo metro respecto a la longitud total del transecto, las siguientes tres muestras estaban separadas por 20 metros una de otra, y por último una nueva sección de 6 muestras separadas por dos metros, para obtener un total de 15 muestras por sitio (modificado de van Dijk & otros 2010). Los resultados obtenidos se anotaron en una boleta para sistematizar la información. Los tejidos colectados de *T. testudinum*, se guardaron en bolsas herméticas con agua de mar para posteriormente limpiarlas debidamente de regreso al hotel.



**Figura 3.** Transecto empleado en el muestreo de *Thalassia testudinum*. 102m de derecha a izquierda.

### **Técnica de preservación de los tejidos vegetales de *T. testudinum***

Cada ramet de pasto marino colectado se limpió con agua dulce, posteriormente se secó por medio de hojas de papel. A cada hoja del ramet colectado se le extrajo pequeños moluscos adheridos a esta y por medio de una hoja de afeitar se le extrajo todas las algas epífitas que estuvieran adheridas a esta, ya que, de no extraerlas éstas pueden interferir con el proceso de purificación de ADN del pasto marino. Al quedar limpias, se procedió a cortar un pequeño pedazo de tejido (4 cm aprox.) cerca del entrenudo del ramet. Posteriormente las muestras se guardaron en pequeños sobres de papel kraft a los cuales se les anotó un código. Cada sobre se guardó debidamente en cajas plásticas herméticas con sílica gel que es de utilidad para extraer la humedad que está presente en las muestras de pastos marino y evitar así la aparición de hongos.

### **Extracción de ADN del tejido de *Thalassia testudinum* y análisis de genotipos.**

Con las muestras secas de cada uno de los 4 puntos de muestreo, se procedió a almacenarlas en tubos de 1.6 ml y se refrigeraron para facilitar su posterior maceración. Con la ayuda de un pistilo plástico, se maceró el tejido foliar hasta formar un polvo fino.

Se aplicó el protocolo de extracción de ADN del kit TAKARA a las muestras colectadas, el cual tiene como base una extracción a base de cloroformo para formar dos fases y una precipitación de ADN con etanol en frío. El ADN precipitado se restituyó en 50 ul de agua ultra pura, libre de ADNasas y ARNasas.

El ADN extraído se almacenó en una refrigeradora a una temperatura de -20 °C. Se corroboró la presencia de ADN no degradado, al realizar una electroforesis de ADN en geles de agarosa al 2%.

Las reacciones de PCR para la amplificación de los 3 microsatélites se realizó en un volumen total de 20 ul, utilizando 0.4 uM de cada cebador, 100 mM dNTP, 2 ul de 10x Buffer PCR, 2 U Taq, 2 ul de ADN, variando únicamente en la concentración de cloruro de magnesio y la temperatura de alineamiento como se indica en la siguiente tabla:

<b>Microsatélite</b>	<b>MgCl<sub>2</sub> mM</b>	<b>Tm.</b>
<b>TGA 39</b>	2	59
<b>TCT 58</b>	2	54
<b>TGA 8</b>	1.5	52

**Tabla 1.** Concentraciones y temperaturas empleadas en las reacciones de PCR para cada microsatélite. Tm= Temperatura de alineamiento, mM= miliMolar.

Con el objetivo de comprobar la presencia de amplicón para cada uno de los 3 microsatélites, se realizó electroforesis en geles de agarosa al 2%.

Posteriormente se realizó un análisis de bandas en geles de poliacrilamida con los siguientes 3 microsatelites (Ver anexo no. 10):

1. TGA 8
2. TGA 39
3. TCT 58

## **ANÁLISIS DE DATOS**

Se realizó un scan de los geles de poliacrilamida para cada microsatélite estudiado para digitalizar los datos en imágenes. Las imágenes de cada gel se analizaron en el programa PyElph 1.3 (Pavel & Vasile 2012), donde se determinaron los pesos de cada banda y a partir de esto se encontró el genotipo de cada una de las muestras colectadas. (Ver anexo no.8)

## RESULTADOS

### 1. Diversidad genética

GA08		GA39		TCT58	
Alelo	Frecuencia	Alelo	Frecuencia	Alelo	Frecuencia
246	0.030303	205	0.075	229	0.095238
253	0.80303	220	0.3	237	0.440476
260	0.060606	225	0.4875	242	0.095238
280	0.090909	230	0.0375	251	0.035714
299	0.015152	238	0.0875	258	0.309524
		245	0.0125	267	0.011905
				273	0.011905

**Tabla 2.** Diversidad haplotípica y frecuencia alélica de 3 loci polimórficos para *Thalassia testudinum* en las 4 poblaciones de estudio.

	GA08	GA39	TCT58
Punta de Palma	121.5	36.9	31.6875
Green Bay	0	17.733333	61.7
Tomza	148.916667	56.25	0
Chatarra	45.5625	37.5	53.363636

**Tabla 3.** Variabilidad alélica por población de estudio

GA08	GA39	TCT58
4	5	5

**Tabla 4.** Riqueza alélica de cada loci evaluado (Polimorfismo).

### 2. Heterocigosidad

	GA08	GA39	TCT58
Punta de Palma	0.333333	0.3	0.375
Green Bay	0	0.266667	0.2
Tomza	0.25	0.5	0
Chatarra	0.125	0.333333	0.272727

**Tabla 5.** Heterocigosidad observada de *Thalassia testudinum* por población de estudio.

### 3. Estructuración poblacional

Fst	Fis	Fit
0.05058	0.269585	0.267341

**Tabla 6.** Diferenciación genética para todas las poblaciones de estudio y todos los loci.

	GA08	GA39	TCT58
Gst	0.793141	0.729209	0.858903
Gst'	0.855136	0.894669	0.950772

**Tabla 7.** Índice de fijación en los loci estudiados

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 1. Diversidad genética

La diversidad genética es uno de los atributos más importantes de cualquier población. Los ambientes cambian constantemente y la diversidad genética es necesaria si las poblaciones están continuamente evolucionando y adaptándose a nuevas situaciones. Desde una perspectiva ecológica, la diversidad genética afectará indirectamente los ecosistemas al influenciar la supervivencia de especies y poblaciones particulares.

Los estimados de la diversidad genética están basados en las frecuencias, ya sea de alelos o genotipos (Ver Tabla no. 2). En este estudio, se utilizó la diversidad alélica para describir la diversidad encontrada en cada sitio de muestreo. Como se observa en la tabla no. 3 existe una mayor variabilidad alélica en los puntos de muestreo Chatarra y Tomza para los 3 loci estudiados, que corresponden a lugares con menores presiones antropogénicas y menor perturbación. Al encontrar una mayor variabilidad de alelos en estos sitios, podemos inferir que la planta se está reproduciendo sexualmente. La recombinación es una de las fuerzas que aumenta la diversidad genética por su naturaleza azarosa. Por el contrario, en sitios donde existen mayores presiones antropogénicas, Punta de Palma y Río San Carlos, se encontró una menor variabilidad alélica, lo que quiere decir que en estas poblaciones, hay una mayor cantidad de individuos que se están reproduciendo asexualmente, es decir que hay una mayoría de individuos que son genéticamente iguales (clones) o al menos se comparten muchos de los genotipos (Ver anexo no. 2).

En general, se encontraron alrededor de 5 alelos diferentes para cada loci de microsatélite evaluado (Ver Tabla no. 3). Van Dijk et al (2007) reportan al menos 8 diferentes alelos para cada loci estudiado en la zona marino-costera de Yucatán. Esto indica que en las poblaciones guatemaltecas estudiadas, se encuentra una menor diversidad genética en comparación a las costas mexicanas. Cabe mencionar que la variación en el polimorfismo (ver tabla no. 3) depende del tamaño de muestra, por lo que esto podría estar afectando el bajo polimorfismo para las poblaciones guatemaltecas. Para tener mayor evidencia de esto, se deben evaluar más loci polimórficos y ampliar el tamaño muestral para evaluar si este patrón se repite.

Un tercer parámetro de la diversidad genética que también está influenciado por el número de individuos que se muestrean, es la Heterocigosidad, la cual se obtuvo al dividir el número de heterocigotos en cada uno de los locus en el total de individuos muestreados (genotipificados). Como se observa en la tabla no. 5, en general hay un mayor número de heterocigotos en los sitios no perturbados (Chatarra y Tomza). Aunque para el loci TCT58, se encontró que todos los individuos son homocigotos. Es por esto que es necesario evaluar más loci polimórficos, para

tener una mejor estimación de la diversidad genética. El patrón de heterocigosidad encontrado para los sitios perturbados y no perturbados corresponde al patrón de la diversidad genética, ya que ambos se basan en las frecuencias alélicas. Al encontrar más heterocigotos, quiere decir que los individuos tienen alelos diferentes en su genotipo, por lo que la diversidad alélica es mayor.

Por último, es importante mencionar que la falta de amplificación de los diferentes loci en algunos de los individuos muestreados incorpora la posibilidad de que existan alelos nulos. Este término se aplica principalmente a los microsatélites, y la causa común es que existe una mutación en una o dos secuencias de los cebadores. (Freeland, Kirk, Petersen, 2011)

## **2. Estructuración Poblacional**

Exceptuando especies raras o en peligro, que tienen distribuciones limitadas, cada una de las especies en las que se ha investigado revela algún nivel de diferenciación genética entre poblaciones. La falta de diferenciación poblacional significa que todas las poblaciones tienen la misma frecuencia alélica. Esto solo sería posible si la especie constituyera un único grupo con reproducción al azar, lo cual es poco probable en especies que contienen múltiples poblaciones.

El método más común y empleado en esta investigación para determinar la diferenciación genética, es decir si existe una estructuración poblacional, es el índice de fijación ( $F_{st}$ ) y sus derivados. (Ver Tabla no. 6) El primer estadístico  $F$ ,  $F_{is}$ , mide el grado de endogamia entre los individuos en comparación al resto de la subpoblación a la que pertenecen. Como se puede observar en la tabla no.6 el  $F_{is}$  para todas las poblaciones y todos los loci estudiados, es de 0.2 lo que indica que los individuos tienen una semejanza entre ellos.

El segundo estadístico  $F$ ,  $F_{st}$ , que se conoce como índice de fijación, mide la diferenciación genética entre subpoblaciones. Para las poblaciones de *Thalassia testudinum* evaluados en todos los loci, se encontró un valor de 0.05, lo cual indica una diferenciación genética moderada entre las poblaciones. Esta diferenciación genética podría deberse a que las poblaciones están sujetas a diferentes tipos de presiones antropogénicas (ambientes perturbados y no perturbados), lo cual podría ser un indicio que se seleccionan diferentes genotipos según el ambiente.

El tercer y último estadístico es el  $F_{it}$ , este provee un coeficiente de endogamia general para los individuos, midiendo la heterocigosidad de un individuo en comparación a la heterocigosidad total de las poblaciones.

Existen análogos a los Estadísticos  $F_{st}$ , que se han desarrollado según los marcadores moleculares empleados. Uno de ellos es el  $G_{st}$ , desarrollado por Nei (1973), que es análogo al  $F_{st}$ , con la variación que acepta múltiples alelos.  $G_{st}$  es equivalente al peso promedio de  $F_{st}$  para todos los alelos. (Ver tabla no. 7). Los cálculos de  $G_{st}$  para las poblaciones de *Thalassia testudinum* en el área marino-costera del Atlántico, muestran altos valores de diferenciación genética para todos los loci estudiados, lo que concuerda con lo mencionado anteriormente, donde las poblaciones se diferencian según las presiones ambientales a las que se ven sometidas. (Freeland, Kirk, Petersen, 2011)

## **3. Implicaciones**

La angiosperma marina *T. testudinum* es una planta clonal por excelencia que crece por medio de la extensión de rizomas horizontales y puede alcanzar tamaños y edades elevados (Eguiarte, Souza, Aguirre, 2007). Por lo tanto, para el estudio de la genética poblacional de esta especie conviene utilizar marcadores de alta definición como los microsatélites. Los microsatélites utilizados en este estudio son marcadores altamente específicos para *Thalassia testudinum*, pero los pocos datos arrojados por el análisis de bandas en geles de poliacrilamida sugieren que se debería probar con otros loci polimórficos para tener más información acerca de los genotipos y así inferir acerca de la diversidad genética con más certeza.

En estudios pasados, se ha intentado evaluar la estructura genética de *T. testudinum* utilizando una variedad de técnicas genéticas moleculares. Los resultados en diversos estudios genéticos empleando esta especie demuestran que es frecuente encontrar individuos genéticamente diferentes a distancias espaciales relativamente cortas y que a distancias mayores se observa una diferenciación genética baja, indicando una cierta homogeneidad entre poblaciones (Stuefer, Erschbamer, Huber, 2001).

Para el caso del presente estudio, en la zona marino-costera del Atlántico de Guatemala, al contrario, se muestra que a largas distancias hay una diferenciación genética entre poblaciones, ya que en el caso del punto de muestreo Chatarra no se obtuvieron amplificaciones para los loci GA8 y GA39. El hecho de no tener dichos loci indica que la población se ha diferenciado genéticamente de otras poblaciones, aunque se podría tener más evidencia de esto si se probara con más microsatélites para comprobar que el mismo patrón se repite. La diferenciación entre poblaciones es un campo de estudio de la genética de poblaciones dentro de la ecología molecular, por lo que a partir de esta disciplina se puede modelar que parámetros, ya sean físico-químicos o diferentes presiones ambientales, están influenciando la permanencia de ciertos tipos de genotipos y la pérdida de otros. Las presiones de selección en ambientes marinos son muy complejas de dilucidar, pero algunos autores sugieren que genotipos que aumentan la aptitud de organismos en ambientes marinos tienden a permanecer.

La población del punto de muestreo Chatarra, pertenece a un ambiente no perturbado, por lo que posiblemente esta población está diferenciada por ciertos genotipos que permanecen constantes debido al ambiente no perturbado en el que se encuentra. A diferencia de los genotipos del punto de Muestreo de Chatarra, los genotipos de Green Bay y Punta de Palma son similares entre sí, lo que sugiere que estas poblaciones no están diferenciadas. Esta semejanza podría indicar que las poblaciones están sujetas a las mismas presiones de selección, por lo que se favorecen los mismos genotipos que aumentan la aptitud para sobrevivir en el ambiente en donde se encuentran.

La forma de crecimiento es el complejo de caracteres vegetativos y reproductivos genéticamente constantes, que varían sólo dentro de un rango específico de plasticidad fenotípica. Las formas de crecimiento van unidos al análisis de las interacciones con el hábitat. En definitiva, refleja la adaptación local y temporal de la planta a factores abióticos (Meusel 1952, 1970). Para *Thalassia testudinum*, el crecimiento clonal afecta la aptitud del genet mediante la persistencia del genet mismo y la producción de semillas. Así mismo, también afecta la aptitud del ramet mediante la producción de un nuevo ramet, ya que las semillas y los clones son considerados parte de la



descendencia. La producción diferencial de los clones contribuye a las diferencias en aptitud entre los individuos lo que resulta en cambios en las frecuencias alélicas de la población (Price, J. 2002 p620). Esto entonces se podría considerar como un evento de micro evolución. La selección genotípica en diferentes ambientes (en nuestro caso perturbados-no perturbados) ocurre cuando rasgos con bases genéticas están asociados con diferencias en la tasa de la producción del ramet. Esto puede conducir a un cambio evolutivo en cuanto a rasgos cuantitativos como la producción de semillas. Desde el punto de vista del genet, conduce indirectamente a un cambio evolutivo entre las poblaciones cuando una porción significativa del efecto genético sobre cualquier rasgo es heredado a través de las semillas. Bajo la mayoría de las condiciones, el crecimiento clonal juega un rol en la micro evolución de las plantas. (Jan, Jean. 2002 p 583)

Se encontró una relación entre el grado previsto de perturbación y el número de genotipos repetidos. Los dos lugares con perturbación predicha son Green Bay y Punta de Palma. Dicha perturbación presentó una relación con el grado de perturbación del agua según los parámetros físico-químicos del agua (nitritos y ortofosfatos), los cuales están asociados a actividades humanas como turismo, actividades agrícolas y actividades pecuarias. Esa asociación puede explicarse porque al enfrentarse a un ambiente hostil, las plantas sufren selección y sólo los genotipos que soportan las condiciones extremas sobreviven y pueden multiplicarse clonalmente. Si la reproducción clonal es predominante en una población una de las consecuencias genéticas es la pérdida de diversidad y el riesgo de extinción. En el caso de que ocurriera la pérdida de esta especie de pasto marino, existirían consecuencias sobre las especies de peces y macroinvertebrados marinos que dependen de ella, por lo que es importante tomar medidas para mitigar los efectos de la contaminación en el ambiente marino.

## CONCLUSIONES

- Existe diferencia en la diversidad genética de *Thalassia testudinum* en áreas marino-costeras prístinas y áreas altamente contaminadas.
- Se encontró mayor diversidad genética (número de alelos, variabilidad alélica) en áreas marino-costeras prístinas (Chatarra y Tomza) que en áreas altamente contaminadas (Punta de palma y Green Bay).
- La heterocigosidad (diferentes alelos para un genotipo) es mayor en áreas prístinas que en áreas contaminadas.
- Existe una diferenciación genética moderada entre las poblaciones estudiadas.

## RECOMENDACIONES

- Utilizar al menos 10 microsatélites polimórficos para obtener una mejor estimación de la diversidad genética y estructuración poblacional.
- Realizar un muestreo al azar, en el cual se tenga una mejor representación de la diversidad genética de *Thalassia testudinum*.
- Obtener parámetros fisicoquímicos del agua en cada uno de los sitios de muestreo para poder inferir sobre el grado de perturbación ambiental y su relación con la diversidad genética de *Thalassia testudinum*.

- Obtener un mayor número de muestras de *Thalassia testudinum* en cada uno de los sitios de muestreo, para tener una mayor representatividad de la diversidad poblacional de *Thalassia testudinum*.
- Socializar los datos de esta investigación con la municipalidad de Puerto Barrios para que pueda tomar decisiones de manejo acerca del impacto que tienen los desechos y contaminantes sobre las poblaciones de *Thalassia testudinum* en el área.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

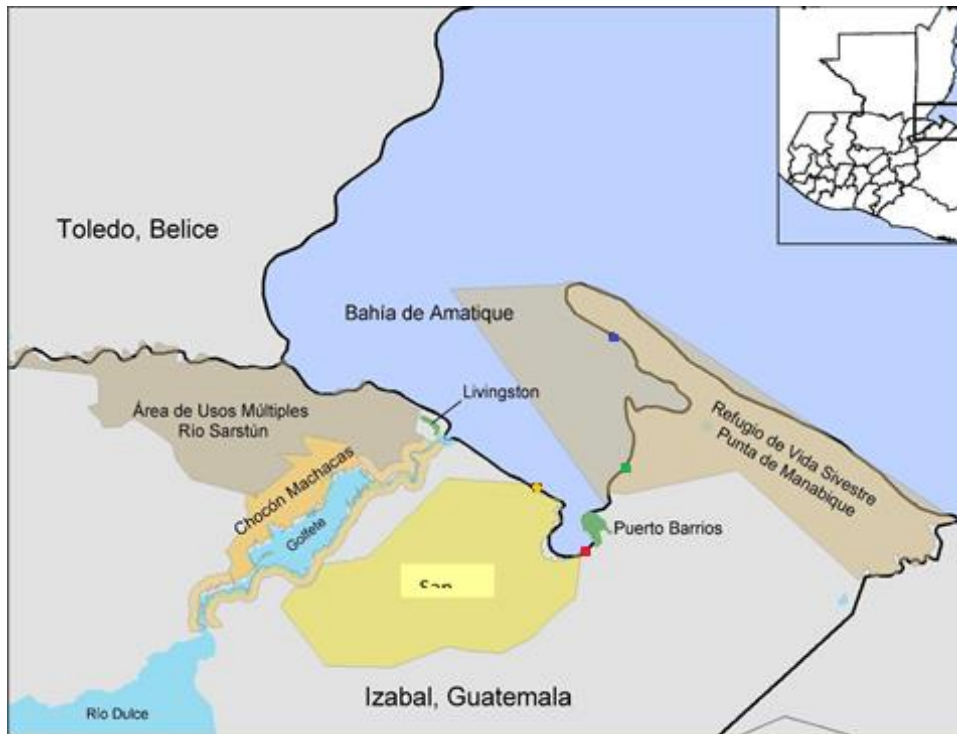
1. Amos W. y A. Balmford. (2001). *When does conservation genetics matter?* Heredity 87:257-265.
2. Arrivillaga, A & Baltz, D. (1999). Comparison of fishes and macroinvertebrates on seagrass and bare-sand sites on Guatemala's Atlantic coast. Bulletin of Marine Science (65), 301-309.
3. Avise, J.C. (1994). Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman & Hall, New York.
4. Bjork, M., Short, F., Mcleod, E. & Beer, S. (2008). Managing Seagrasses for Resilience to Climate Change. UICN. Gland. Suiza. 56 p.
5. Centro de Estudios Conservacionistas –CECON-, Centro de Datos para la Conservación –CDC-. (1992). Estudio Técnico de Punta de Manabique. Universidad de San Carlos de Guatemala. 79 p.
6. Chakraborty, R., D.N. Stivers, Z. Yixi. (1996). Estimation of mutation rates from parentage exclusion data: applications to STR and VNTR loci. Mutation Research (354), 41-48.
7. Cook, C. D. K. 1996 Aquatic Plant Book. SPB Academic Publishing. The Hague. Holanda. 228 p.
8. Eguiarte, L. E. y D. Piñero. (1990). *Génética de la conservación: leones vemos, genes no sabemos*. Ciencias. Número especial 4. Ecología y conservación en México: 34 –47 (reimpreso en Nuñez-Farfán J. y L. E. Eguiarte (editores). La evolución biológica. Facultad de Ciencias, Instituto de Ecología, UNAM, Conabio. Pp. 371-398).
9. Eguiarte, L. E., Souza, V. y Aguirre, X. (2007). Ecología Molecular. México: Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT.
10. Ellstrand, N.C. y D.L. Marshall. (1985). Interpopulation gene flow by pollen in wild radish. *Raphanus sativus*. American Naturalist (126), 606-616.
11. Ellstrand, N.C. y M. L. Roose. (1987). Patterns of genotypic diversity in clonal plant species. American Journal of Botany (74):123-131.
12. Freeland, J.R. et. al. [2ª Ed] (2011). Molecular Ecology. Wiley-Blackwell. Reino Unido. 449 p.
13. Galán, X. (2006). Pastos marinos: composición comunitaria, biomasa de pastos marinos y morfometría de *Thalassia testudinum*, en dos sitios de bahía la Graciosa, Izabal, Guatemala. Informe de tesis de graduación. Facultad de Ciencias y Humanidades, Universidad del Valle de Guatemala. 59 p.
14. Hancock, J.M. [Ed] (1998). Microsatellite and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. En: D.B. Goldstein y C. Schlötterer [eds.]. Microsatellite evolution and applications. New York: Oxford University Press.
15. Hedrick P.W. (2001). *Conservation genetics: where are we now?* Trends. Ecol. Evol. 16:629-636.

16. Van Dijk, J. K. & B. I. van Tussenbroek. (2010). Clonal diversity and structure related to hábitat of the marine angiosperm *Thalassia testudinum* along the Atlantic coast of Mexico. *Aquatic Botany* (92), 63-69.
17. Vicard, P. y A.P. Dawis. (2004). A statistical treatment of biases affecting the estimation of mutation rates. *Mutation Research* (547), 19-33.  
Zamudio, T. (2005). *Regulación Jurídica de las Biotecnologías: Diversidad Genética*. Derecho, Economía y Sociedad. Universidad de Argentina.
18. Stuefer, J.F. et. Al. [Ed] (2002). *Ecology and Evolutionary Biology of Clonal Plants*. Kluwer Academic Publishers. Vol 15, Nos 4-6. 600p.

## ANEXOS



**Anexo 1.** Medición del transecto de 102 metros lineales para el muestreo del pasto marino *Thalassia testudinum* en los cuatro puntos de muestreo



**Anexo 2.** Ubicación geográfica de los sitios de muestreo; Azul-Chatarra, Verde-Tomza, Rojo-Green Bay, Amarillo-Punta de palma.



**Anexo 3.** Medición del transecto de 102 metros lineales para el muestreo del pasto marino *Thalassia testudinum* en los cuatro puntos de muestreo

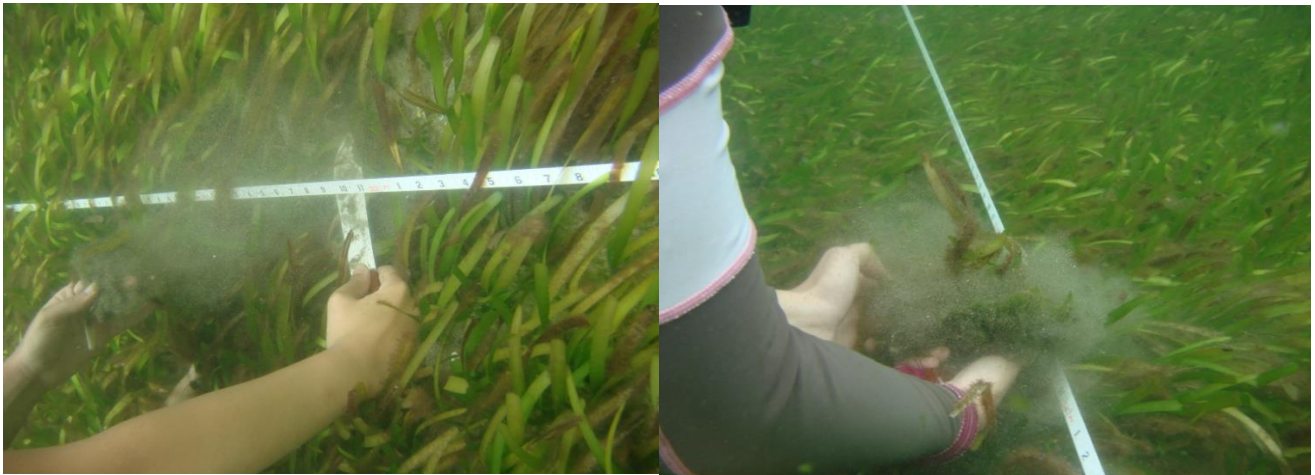


**Anexo 4.** Medición del transecto de 102 metros lineales para el muestreo del pasto marino *Thalassia testudinum* en los cuatro puntos de muestreo.





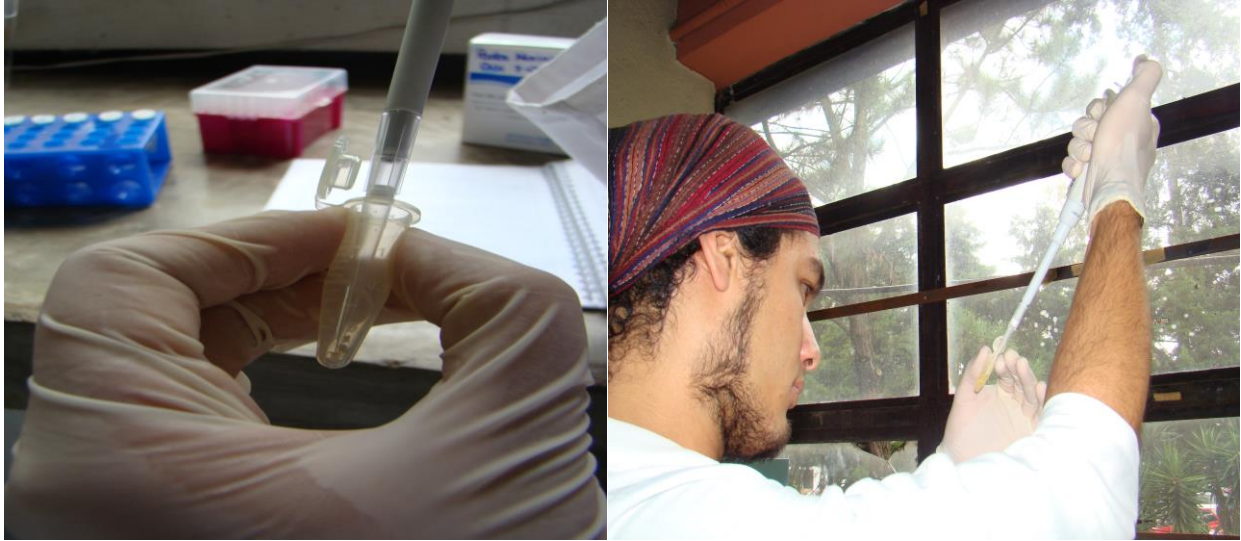
**Anexo 5.** Pasto marino *Thalassia testudinum*



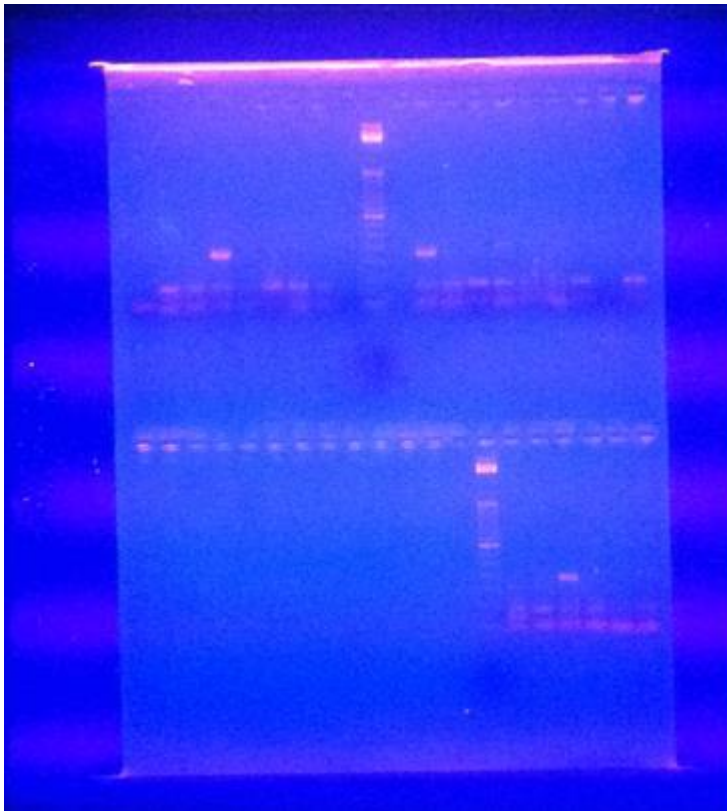
**Anexo 6.** Colecta de una muestra del pasto marino *T. testudinum*.



**Anexo 7.** Muestra de *T. testudinum* debidamente guardadas en sobres de papel Kraft las cuales se guardaron en cajas herméticas con sílica gel para favorecer el secado de las muestras. Limpieza de una muestra de *T. testudinum*, la cual fue almacenada en cajas herméticas.



**Anexo 8.** Proceso de extracción de ADN.



**Anexo 9.** Patrón de bandas; ADN de *Thalassia testudinum*.

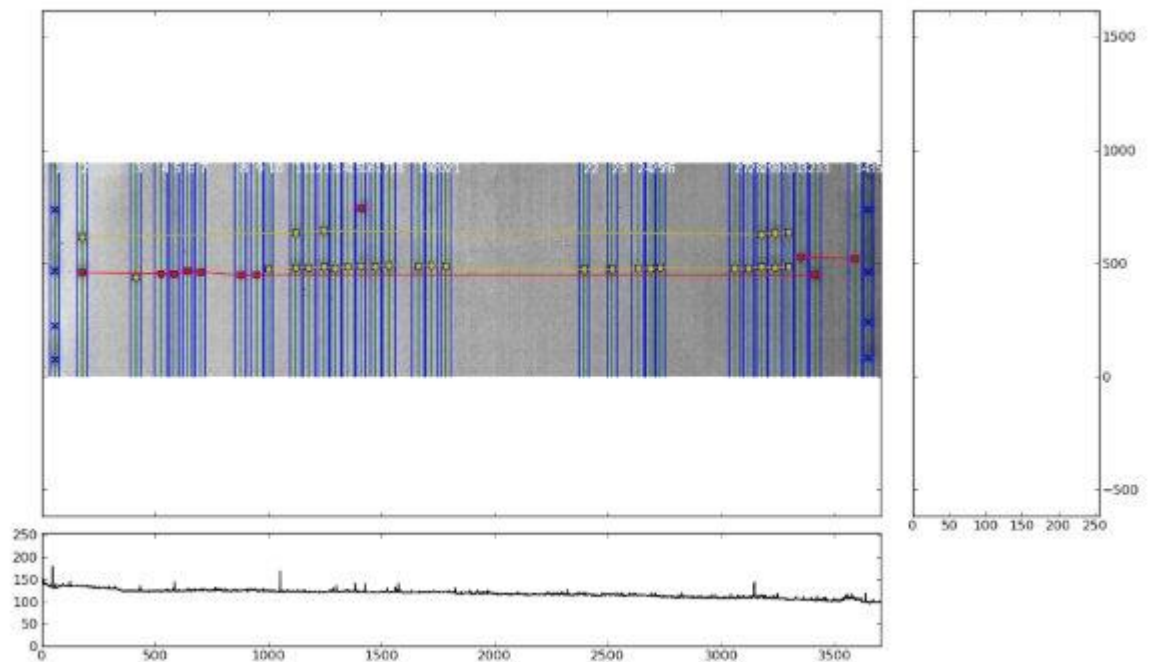


## Anexo 10.

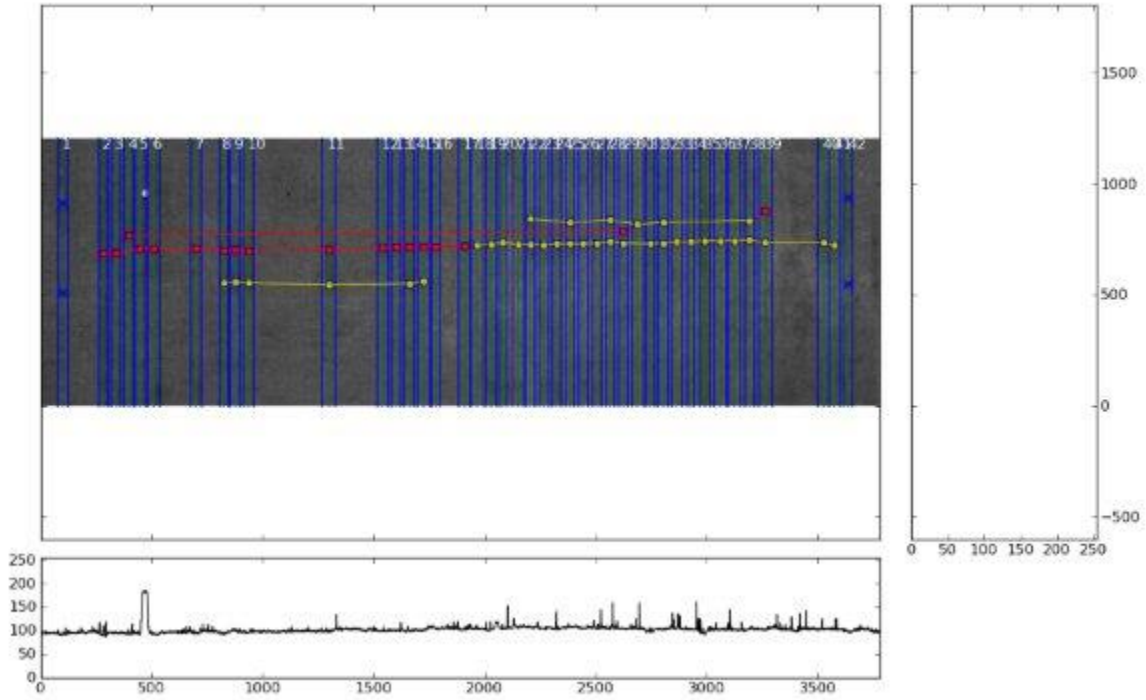
### ANALISIS DE GELES DE POLIACRILAMIDA

Se incluyen los resultados de los 3 geles de poliacrilamida y el análisis de las bandas. Se colocaron manualmente la localización de las bandas del programa PyElph 1.3, y se obtuvieron los genotipos basados en el peso de las bandas. Las líneas de colores unen a las bandas consideradas los mismos alelos.

GA8



GA39



TCT58

