

Convenio Modificatorio al Convenio Específico número FB1701/KE008/13 para la ejecución del proyecto denominado **“Análisis de la estructura y diversidad genética de manglares representativos de México”**, suscrito con fecha 15 de octubre de 2013, que celebran la Universidad Nacional Autónoma de México **“UNAM”**, a través de su Coordinador de la Investigación Científica y del Director del Instituto de Ecología, y la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad **“CONABIO”**, a través de su Coordinador Nacional y su Directora General de Proyectos, al tenor de los siguientes:

ANTECEDENTES

Con fecha 13 de junio de 1994, el **“FONDO”**, la **“CONABIO”** y la **“UNAM”**, en adelante **“LAS PARTES”**, celebraron un Convenio General de Colaboración, en adelante el **“CONVENIO GENERAL”**, en el que se establecieron las bases para la asignación de recursos económicos del **“FONDO”** a favor de la **“UNAM”**, para el efecto de realizar proyectos y estudios relacionados con el conocimiento y la preservación de los recursos biológicos, tendientes a su conservación y generación de criterios para su manejo sustentable.

Derivado de dicho **“CONVENIO GENERAL”**, con fecha 15 de octubre de 2013, **“LAS PARTES”** celebraron el Convenio Específico **FB1701/KE008/13**, en adelante el **“CONVENIO ESPECÍFICO”**, para el óptimo desarrollo del Proyecto denominado **“Análisis de la estructura y diversidad genética de manglares representativos de México”**, en lo sucesivo el **“PROYECTO”**, fungiendo como responsable del mismo el Dr. Juan Núñez Farfán.

Para el desarrollo del **“PROYECTO”**, el **“FONDO”** se obligó a cubrir a la **“UNAM”** la cantidad de **\$2,322.131.40** (Dos millones trescientos veintidós mil ciento treinta y un pesos 40/100 M. N.).

La Subcoordinación de Especies Prioritarias de **“LA CONABIO”**, y el Responsable del **“PROYECTO”**, acordaron incluir resultados adicionales al **“PROYECTO”**, con el objeto de evaluar el efecto de la fragmentación sobre las poblaciones y determinar las zonas prioritarias para la conservación de los ecosistemas de manglar en México desde el punto de vista genético y adaptativo. Lo anterior, a través del análisis de la variabilidad y estructura genética entre organismos adultos y plántulas de una de las especies arbóreas más importantes de los manglares mexicanos, *Avicennia germinans* (Avicenniaceae), a lo largo de las costas de México en el océano Pacífico, Golfo de México y Mar Caribe. Asimismo acordaron no llevar a cabo el análisis de la diferenciación entre poblaciones en fragmentos polimórficos de longitud (AFLPs). Para ello, determinaron incorporar Modificaciones a los Anexos 1, 2 y 3 del **“CONVENIO ESPECÍFICO”**, y que el **“FONDO”** otorgara un complemento a los recursos aprobados para continuar con el desarrollo del **“PROYECTO”**.

DECLARACIONES:

I. Con fundamento en la cláusula Décima Sexta del **“CONVENIO GENERAL”**, **“LAS PARTES”** expresan su conformidad en celebrar el presente instrumento para otorgar una ampliación presupuestal a la **“UNAM”** y modificar los Anexos 1, 2 y 3 del **“CONVENIO ESPECÍFICO”**, con la finalidad de continuar con el desarrollo del **“PROYECTO”** en los términos requeridos por la **“CONABIO”** y aceptados por **“LA UNAM”**.

II. **“LAS PARTES”** declaran que se reconocen mutuamente la personalidad con la que se ostentan, ratificando todas y cada una de las declaraciones formuladas en **“EL CONVENIO GENERAL”**, y están

de acuerdo en la suscripción del presente instrumento en la forma y términos que se establecen en las siguientes:

CLÁUSULAS

PRIMERA.- “EL FONDO” acuerda otorgar a la “UNAM” una ampliación por la cantidad de \$500,000.00 (Quinientos mil pesos 00/100 M.N.), adicionales al presupuesto otorgado en el “CONVENIO ESPECÍFICO”, con la finalidad de continuar con el desarrollo del “PROYECTO” en los términos requeridos por la “CONABIO” y conforme a las modificaciones de los Anexos 1, 2 y 3 del “CONVENIO ESPECÍFICO” acordadas por “LAS PARTES”.

SEGUNDA.- “LAS PARTES” convienen en incorporar las modificaciones a los Anexos 1, 2 y 3 del “CONVENIO ESPECÍFICO” que se adjuntan al presente Convenio Modificatorio como parte integrante del mismo, y que deberán estar debidamente rubricados por los responsables técnicos tanto de la “UNAM” como de la “CONABIO”.

TERCERA.- “LAS PARTES” convienen en que la “UNAM” ejercerá los recursos complementarios descritos en la cláusula Primera de acuerdo con el presupuesto del Anexo 1 y con el calendario de actividades del Anexo 2 de este “CONVENIO MODIFICATORIO”.

CUARTA.- “LAS PARTES” ratifican todas y cada una de las cláusulas establecidas en el “CONVENIO ESPECÍFICO”, por lo que quedan vigentes en su totalidad en todo lo que no contravengan lo estipulado en el presente instrumento.

Enteradas “LAS PARTES” del contenido y alcance de todas y cada una de las cláusulas, se firma de conformidad el presente instrumento, por triplicado, en la Ciudad de México, el 29 de julio de 2016.

Por la “UNAM”

Por la “CONABIO”



Dr. William Henry Lee Alardín
Coordinador de la Investigación Científica

Dr. José Aristeo Sarukhán Kermez
Coordinador Nacional



Dr. Constantino Macías García
Director del Instituto de Ecología

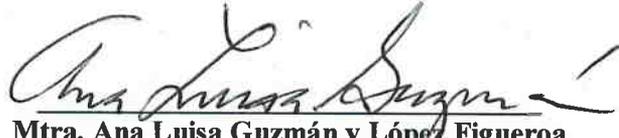


M. en C. María del Carmen Vázquez Rojas
Directora General de Proyectos

Vo. Bo.



Dr. Juan Núñez Farfán
Responsable del proyecto



Mtra. Ana Luisa Guzmán y López Figueroa
Secretaria Técnica del
Fidecomiso Fondo para la Biodiversidad

Fecha de autorización de los recursos financieros para el presente instrumento por parte del "FONDO", dentro del rubro Sistema Nacional de Información para la Biodiversidad; 28 de octubre de 2014.

La presente hoja de firmas forma parte del Convenio Modificatorio al Convenio Específico **FB1701/KE008/13**, que celebran la **Universidad Nacional Autónoma de México**, a través de su Coordinador de la Investigación Científica y del Director del Instituto de Ecología, y la **Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad**, con fecha veintinueve de julio de dos mil dieciséis.

the
fw.
new


**MODIFICACIONES AL ANEXO 1
del Convenio Específico Núm. FB1701/KE008/13**

(Se incluyen solamente las secciones o subtítulos de sección que contienen cambios. Lo tachado indica eliminación.)

A. CARÁTULA

TÍTULO DEL PROYECTO: *Análisis de la estructura y diversidad genética de manglares representativos de México*

REPRESENTANTES LEGALES:

Dr. Constantino Macías García

Director, Instituto de Ecología, UNAM

Tel: 5622-8996; fax: 5616-1976; correo electrónico: direccion@ecologia.unam.mx

Dr. William Lee

Coordinador de la Investigación Científica, UNAM

LISTA DE RESULTADOS:

....

IX. Borrador de artículos científicos.

X. Base de datos (formato Excel) de los genotipos para loci microsatélites de plántulas de *A. germinans*.

XI. Bases de datos (formato Excel) de la tabla síntesis de diversidad genética para las plántulas de *Avicennia germinans*.

XII. Mapas de conectividad genética de las poblaciones de adultos y plántulas de *A. germinans*

XIII. Desarrollo de una Tesis de Licenciatura

MONTO TOTAL SOLICITADO (IVA INCLUIDO: \$2,822,131.40 M.N.)

DURACIÓN DEL PROYECTO: cuarenta meses

fw
www

B. RESUMEN: El estudio genético se realizará empleando marcadores moleculares biparentales (DNA microsatélites, AFLPs) y de herencia materna Este estudio también determinará el efecto de la fragmentación del hábitat en la estructura genética de una especie de manglar. La destrucción del hábitat tiene como consecuencia la pérdida de variabilidad genética en poblaciones que viven en ambientes perturbados (Giri *et al.* 2011). Altos niveles de variación confieren a las poblaciones la habilidad de responder a presiones de selección (Amos y Harwood 1998), ya que la variabilidad genética es esencial para el cambio evolutivo (Charlesworth y Charlesworth 2010). Es importante poner mayor énfasis al estudio y caracterización de la variabilidad genética de las especies si se quiere tomar medidas que aseguren su conservación y permitan la evolución contemporánea y adaptación a las condiciones ambientales cambiantes (Stockwell *et al.* 2003), muchas de ellas producto de las actividades humanas. La última parte de la investigación analizará la variabilidad y estructura genética de una de las especies arbóreas más importantes de los manglares mexicanos, *Avicennia germinans* (Avicenniaceae) a lo largo de las costas de México en el océano Pacífico, Golfo de México y Mar Caribe, así como la comparación entre organismos adultos y plántulas de la especie, con la finalidad de evaluar el efecto de la fragmentación sobre las poblaciones. México se destaca a nivel mundial por poseer una superficie de manglar prácticamente en todas sus costas. No obstante, las acciones antropogénicas incrementan las amenazas y riesgos naturales sobre los manglares (Aung *et al.* 2013). Este ecosistema ha sido impactado negativamente por eventos de deforestación o industrias pesqueras y camaroneras, así como construcciones urbanas, turismo y derrames de sustancias químicas (Lewis 2005). Por ello, es relevante enfocar nuestros objetivos a su conocimiento y conservación. El estudio genético se realizará empleando marcadores moleculares biparentales (DNA microsatélites) que permitirán obtener diagnósticos robustos de la diversidad genética. Se han seleccionado ocho puntos de muestreo, de entre los 81 sitios identificados por la CONABIO de relevancia biológica y de rehabilitación ecológica, que incluye sitios muy degradados, con otros con un estado de conservación adecuado. A través de la información obtenida se podrán determinar las zonas prioritarias para la conservación de los ecosistemas de manglar en México desde el punto de vista genético y adaptativo

PALABRAS CLAVE: AFLPs, *Avicennia germinans*, demografía histórica, diferenciación adaptativa, diversidad genética, filogeografía, flujo génico, microsatélites, cpDNA, mtDNA, *Rhizophora mangle*, fragmentación, variabilidad genética.

C. OBJETIVOS DEL PROYECTO

PARTICULARES

...
~~Analizar la diferenciación entre poblaciones en fragmentos polimórficos de longitud (AFLPs) que permitan identificar loci putativamente asociados a la adaptación local en contraste de la diferenciación en loci neutrales (i.e., microsatélites).~~

Determinar el efecto de la fragmentación de los ecosistemas de manglar en la diversidad y estructura genética de poblaciones del mangle negro (*Avicennia germinans*) en México.

uau
fw

Caracterizar genéticamente las plántulas de poblaciones de *Avicennia germinans* de localidades fragmentadas y conservadas en México empleando marcadores moleculares biparentales (microsatélites nucleares).

Obtener los parámetros de diversidad genética para las plántulas de *Avicennia germinans*, a nivel local, regional y entre costas (Mar Caribe, Golfo de México y Océano Pacífico), y los estimadores pareados de diferenciación poblacional (F_{st}).

Obtener los mapas de conectividad genética entre plántulas y adultos de *Avicennia germinans*.

D. ANTECEDENTES

.....

GENÉTICA DE MANGLARES

.....

Por ello, es necesario estudiar el mayor número de ecosistemas de manglar y obtener las unidades significativas de evolución empleando criterios de singularidad genética, diversidad genética en loci neutrales y ~~putativamente adaptativos y neutral~~, así como zonas de origen (filogenia). Por esta razón, el presente estudio analiza numerosas poblaciones, aún no analizadas, emplea un mayor número de loci microsatélites (necesario para una estimación apropiada de la diversidad genética) y emplea otros marcadores moleculares (DNA) de herencia uni- y biparental con distintas tasas de evolución, y ~~potencialmente asociados con el proceso de adaptación local (AFLPs)~~.

....

Esto hace claro que se requieren diversos marcadores que resuelvan las preguntas a escala local y global. ~~Los AFLP son marcadores idóneos para el problema.~~

....

EFFECTO DE LA FRAGMENTACIÓN EN LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE POBLACIONES DE MANGLE NEGRO (*AVICENNIA GERMINANS*) EN LAS COSTAS DE MÉXICO

El cambio en el uso del suelo es uno de las principales causas que afectan la diversidad genética (Sala *et al.* 2000). Una de las consecuencias de este proceso antropogénico es la fragmentación de los ecosistemas, de implicaciones relevantes para la conservación de la biodiversidad (Ellis *et al.* 2012; Wright 2010). En los hábitats fragmentados se esperan cambios ecológicos y genéticos, producto de la reducción del tamaño de las poblaciones y de un incremento en el aislamiento entre ellas (Cordeiro and Howe, 2003; Quesada *et al.*, 2004). Entre los efectos ecológicos relevantes están no sólo en cambio en el tamaño de la población sino también en las interacciones entre plantas y animales mutualistas y enemigos naturales, como patógenos y herbívoros (Chávez-Pesqueira *et al.* 2015). Entre los cambios genéticos, se espera una reducción en el flujo génico entre poblaciones en fragmentos, una reducción de la diversidad genética, un incremento en la diferenciación entre poblaciones y un incremento en la endogamia (Young *et al.* 1996, Hamilton, 1999; Ghazoul and McLeish, 2001; Dick *et al.*, 2008; Frankham *et al.* 2002, Aguilar *et al.* 2008, DiBattista 2008, Allendorf *et al.* 2012). La endogamia, a su vez, puede reducir la probabilidad de persistencia de las poblaciones (Frankham *et al.* 2002). Los tamaños poblacionales pequeños determinan la persistencia a largo plazo de las poblaciones, a menos que la dispersión hacia los fragmentos aislados sea restablecida o fomentada

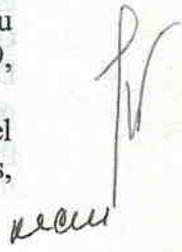


(Trakhtenbrot *et al.*, 2005). La reducción del tamaño poblacional en poblaciones de plantas tiene implicaciones en las interacciones bióticas con sus mutualistas ya que, por ejemplo, en las plantas de fertilización cruzada y polinizadas por animales, se reduce el número de parejas potenciales, afectando el éxito reproductivo individual (Aguilar *et al.* 2006; Ghazoul and McLeish, 2001) y, en consecuencia, el flujo génico. También, junto con una reducción en la dispersión de semillas, se incrementa la probabilidad de endogamia biparental y homocigosis (Hamilton, 1999; Ghazoul and McLeish, 2001). En estas circunstancias, la reducción de la diversidad genética de poblaciones en fragmentos aislados amenaza su persistencia a largo plazo, a menos que el contacto genético sea restaurado (Trakhtenbrot *et al.*, 2005). Tales poblaciones no tienen destino ecológico y evolutivo, ya que la depresión por endogamia es más pronunciada en ambientes estresantes (Fox and Reed 2011) y compromete la capacidad de las poblaciones para responder al cambio ambiental (Bijlsma and Loeschcke 2012). La causa más importante de la fragmentación del hábitat es antropogénica, pocas veces tomando en cuenta la pérdida de conectividad entre los fragmentos remanentes para maximizar la conservación de la biodiversidad. Las consecuencias evolutivas de la fragmentación hacen necesario que toda política de manejo las tome en cuenta (Santamaría and Mendez 2012). Las prácticas de manejo proactivas, tales como la restauración genética a partir de otras poblaciones, requiere de una evaluación cuidadosa de la diversidad genética, de sus impactos y consecuencias.

Los estudios sobre la estructura genética de *Avicennia germinans* son relativamente escasos. Dodd *et al.* (2002), analizaron la diversidad genética existente entre poblaciones de *A. germinans* localizadas en el Océano Atlántico y el Istmo Centroamericano (CAI). La diversidad genética resultó mayor al este del océano Atlántico, presentando una diferenciación entre las poblaciones del Atlántico y del Pacífico, lo que sugiere que el CAI tuvo una gran influencia en la distribución de las poblaciones y sigue influyendo en cuanto su dispersión. Cerón-Souza *et al.* (2005) concluyeron que las poblaciones de *A. germinans* en la costa Pacífica Colombiana, tiene una diversidad genética mayor a la encontrada en otras poblaciones de la especie de la especie. En México, Sandoval-Castro *et al.* (2014) han analizado poblaciones de *A. germinans* en ambas costas de México, y reportan alta diversidad genética dentro de las poblaciones y diferencias significativas entre costas. Sin embargo, la destrucción generalizada de los ecosistemas de manglar en México amenaza empobrecer la diversidad genética de las poblaciones.

Poblaciones de *A. germinans* que residen en hábitats fragmentados pueden presentar escaso flujo génico entre poblaciones y un aumento en la endogamia y la deriva génica. Las poblaciones de esta especie poseen una importancia económica al ofrecer productos forestales, de combustión, de construcción y fuente de alimento para asentamientos humanos cercanos (Dodd *et al.* 2000; Cerón-Souza *et al.* 2012). Conforme los asentamientos humanos han aumentado, los ecosistemas de manglar han sido transformadas en áreas ganaderas y de agricultura, además de zonas de crianza de peces y camarones (Holguín *et al.* 2001). A pesar de su importancia biológica y sus beneficios ecológicos, hoy en día, las poblaciones de *A. germinans* son relativamente pequeñas y/o fragmentadas (Dodd *et al.* 2000), por lo cual algunos estudios genéticos de la especie sugieren que su diversidad genética pudo haber disminuido (Maguire *et al.* 2000, Salas-Leiva *et al.* 2009, Nettel-Hernanz *et al.* 2013, Sandoval-Castro *et al.* 2014).

La península de Yucatán (Campeche, Yucatán y Quintana Roo) alberga más del 50% de área de manglar de todo México; sin embargo, también son zonas amenazadas,



principalmente por las actividades turísticas y socioeconómicas ya que se pierden bosques de manglar a un ritmo de 2.5% al año desde los 1980 (Carillo-Bastos *et al.* 2008; Hiraless-Cota *et al.* 2010). Las poblaciones de mangle negro en el Golfo de México y el Caribe mexicano, donde hay un desarrollo turístico acelerado, han sufrido modificaciones ambientales (Hiraless-Cota *et al.* 2010). Esta especie, en la costa del Pacífico, es utilizada para postes usados en cercas de potreros y deslindes de parcelas agropecuarias, así como para construcción de casas (Romero-Berny *et al.* 2015).

Por ello, esperamos que la perturbación antropogénica de los manglares (fragmentación, subdivisión poblacional) produzca cambios en la estructura y diversidad genética de las poblaciones, cambios en el flujo génico y conectividad entre ecosistemas de manglar. Para esto, realizaremos el análisis genético de dos generaciones de *Avicennia germinans*, adultos y plántulas, que representan la estructura genética antes y después de la fragmentación, respectivamente, en ocho ecosistemas de manglar de México que difieren en su grado de perturbación antropogénica. El empleo de loci hiper-variables nucleares (loci microsatélites; Arbeláez-Cortés *et al.*, 2007) permite detectar flujo génico reciente y posible “cuellos de botella” poblacionales.

LAS UNIDADES SIGNIFICATIVAS DE EVOLUCIÓN Y LA CONSERVACIÓN

....

En este proyecto se emplean marcadores nucleares microsatélites, de cloroplasto (de herencia uniparental, materna), ~~marcadores dominantes a nivel de genoma (AFLPs)~~, lo que permite obtener tanto los linajes evolutivos y las variantes genéticas dentro de éstos.

HIPÓTESIS

.....

- Esperamos que si la fragmentación ha afectado la estructura y diversidad genética de las poblaciones, exista una reducción en los niveles de diversidad genética, alélica, entre plántulas y adultos; menor conectividad a nivel de plántulas y mayor homocigosis en las poblaciones más fragmentadas que en las conservadas. Estos efectos debieran ser evidentes aún cuando exista un nivel de diferenciación histórico entre las poblaciones.

.....

E. JUSTIFICACIÓN:

....

~~6. Debido a la gran cantidad de información que generan los AFLPs, las bases de datos generadas también serán usadas para obtener valores de diversidad neutral y adaptativa, definir estructura poblacional y construcción de filogenias que complementarán los datos de las secuencias de los marcadores maternos y nucleares, para determinar las unidades evolutivas significativas bajo un panorama más robusto.~~

~~7. Los datos de AFLPs obtenidos constituirán un punto de partida de posteriores estudios de genética adaptativa, delimitando regiones sobre las que se podrían explorar genes específicos bajo selección de determinados factores ambientales (análisis denominado método de análisis espacial, SAM; Joost *et al.* 2007). La posibilidad de hacer este último análisis con los resultados de nuestro estudio estaría sujeto únicamente a la posibilidad de encontrar los datos ambientales necesarios, ya que se emplearía la misma base de datos de AFLPs.~~

Pr.
revisar

8. La fragmentación de los hábitats naturales es la causa primordial de pérdida de la biodiversidad.

9. La fragmentación impacta la diversidad genética de las poblaciones, lo que podría reducir su nivel de adaptación, así como su potencial de respuesta a los cambios ambientales actuales y futuros.

10. Los resultados del capítulo I del proyecto (Estructura y diversidad genética del mangle negro, *Avicennia germinans* (Avicenniaceae), en las costas de México) encontró que las poblaciones mexicanas de *A. germinans* muestran niveles de diversidad genética de bajo a moderado. Además, por los muestreos en campo se detectó que la mayoría están sujetas a fuertes procesos de fragmentación. Para cumplir el objetivo general de proponer zonas prioritarias para la conservación desde el punto de vista genético y adaptativo, resulta impostergable considerar el efecto de la fragmentación en los ecosistemas de manglar que difieren en su grado de perturbación antropogénica. La última parte del proyecto permitirá evaluar el efecto de la fragmentación sobre las poblaciones y determinar las zonas prioritarias para la conservación de los ecosistemas de manglar en México desde el punto de vista genético y adaptativo, a través del análisis de la variabilidad y estructura genética entre organismos adultos y plántulas de una de las especies arbóreas más importantes de los manglares mexicanos, *Avicennia germinans* (Avicenniaceae), a lo largo de las costas de México en el océano Pacífico, Golfo de México y Mar Caribe.

H. TÉCNICAS Y MÉTODOS:

MUESTREO

....

En el caso de las plántulas, se realizan transectos paralelos a la ribera varios metros manglar adentro, ya que *Avicennia germinans* generalmente no crece en la orilla, sino en sitios inundables temporalmente. Cuando se encuentra un grupo de plántulas, sólo se colecta una, debido a que podrían ser parientes. Se colectarán 20 a 30 plántulas por manglar. Las muestras se almacenarán en nitrógeno líquido para su transporte al laboratorio. Se pretende obtener un muestreo que abarque poblaciones de *A. germinans* a lo largo de toda su distribución en México (Dinerstein *et al.*, 1995). En total muestrearán 8 sitios de manglar listados en la tabla 2.

EXTRACCIÓN DE DNA

La extracción de DNA se realizará usando los protocolos *DNeasy Plant Mini Kit* (www.qiagen.com/handbooks) de Qiagen (Cat. Nos. 69104 y 69106) y con el protocolo del método de bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB) (Doyle y Doyle 1987). Ambos métodos han sido ensayados en *A. germinans* con resultados positivos.

....

Tabla 2. Ecosistemas de manglar que serán sujetos de estudio en plántulas de *A. germinans*. Todos son sitios prioritarios de manglar (CONABIQ 2009).

Manglar:	Rango Latit. (N)	Rango Longit. (W)	Especies presentes
I. Pacífico Norte (Baja California Sur, Sonora, Sinaloa, Nayarit)			
¹ El Caimanero	25.618381- 25.275685	108.951846- 108.458474	A,C,L,R
II. Pacífico Centro (Jalisco, Colima y Michoacán)			

ucuu

2	Barra de Navidad	19.247447- 19.101787	104.724031- 104.469562	A,C,L,R
III. Pacífico Sur (Guerrero, Oaxaca y Chiapas)				
3	Reserva de la Biósfera La Encrucijada	14.773673-15.650617	92.460843-93.342546	A,C,L,R
IV. Golfo de México (Tamaulipas, Veracruz, Tabasco)				
4	Tuxpan	21.171224- 20.847738	92.298963- 97.262108	A,C,L,R
V. Península de Yucatán (Campeche, Yucatán y Quintana Roo)				
5	Yumbalam	21.603899- 21.329444	87.533299- 87.014159	A,C,L,R
6	Ría Lagartos	21.506536-21.624211	88.10508-88.235921	A,C,L,R
7	Sian Ka'an	18.60026-20.223083	87.409837-88.076704	A,C,L,R
8	Cozumel	20.27159-20.591830	86.723734-20.591830	A,C,L,R

A: *Avicenia germinans*; C: *Conocarpus erectus*; L: *Laguncularia racemosa*; R: *Rhizophora mangle*.

.....

MARCADORES MOLECULARES

Se emplearán diversos marcadores moleculares, de núcleo, cloroplasto y mitocondria (Tabla 3).

TABLA 3. Marcadores moleculares que emplearán en el estudio genético de *Rhizophora mangle* (A) y *Avicenia germinans* (B).

(A)		
GEN	ORGANELO / ORIGEN	REFERENCIA
AFLPs	Genoma total	Mukherjee <i>et al.</i> 2004; Albrecht <i>et al.</i> 2013.
(B)		
GEN/LOC	ORGANELO / ORIGEN	REFERENCIA
AFLPs	Genoma total	Mukherjee <i>et al.</i> 2006; Cerón-Souza <i>et al.</i> 2005; Nettel <i>et al.</i> 2007

.....

En el caso de las plántulas de *Avicennia germinans* se emplearán 18 marcadores moleculares STR's (Tabla 4). Los marcadores serán enviados a genotipar a la University of Illinois en Urbana, mientras que la secuenciación se hará en University of Washington, Department of Genome Sciences, High Throughput Genomics Unit, en Seattle.

Con el fin de estudiar la diversidad adaptativa se utilizarán fragmentos polimórficos de longitud variable (AFLPs; *Amplified fragment length polymorphisms*; Vos *et al.* 1995). Este tipo de marcadores se distribuyen en todo el genoma, lo que permite tener un panorama de la variación en todo el genoma.

La combinación de enzimas de restricción, adaptadores y *primers* empleados para

for
now

generar los AFLPs será determinada a través de simulaciones por computadora *AFLP in Silico* (Rombatus, *et al.* 2003).

Los AFLP's se generan por la digestión de DNA genómico con endonucleasas de restricción (combinación de *EcoR1/Mse*; AFLP kit, INVITROGEN, Life Technologies, USA), seguido por la amplificación selectiva por PCR. Posterior a la digestión del DNA genómico, se utilizan adaptadores de DNA que se acoplan a los sitios de restricción generados y que sirven para acoplar los *primers* previamente diseñados para realizar las amplificaciones; se realiza una amplificación preselectiva, donde un subgrupo de fragmentos es amplificado usando *primers* que ligan con los adaptadores, con un nucleótido adicional en el extremo 3'. Esta preamplificación sintetiza únicamente los fragmentos con bases flanqueando los sitios de restricción que sean complementarios a los nucleótidos añadidos a cada *primer*, lo que permite reducir el número de fragmentos a aproximadamente 1/16 de los producidos originalmente. Debido a que en este punto la cantidad de fragmentos es demasiado grande para permitir la visualización y análisis, se hace una segunda amplificación selectiva con *primers* similares a los de la primera amplificación, a los que se les añaden dos bases nucleotídicas. Este segundo juego de *primers* se marca con un fluoróforo para analizar posteriormente las muestras en un secuenciador. Se pueden amplificar subgrupos de loci usando combinaciones de *primers* con diferentes bases selectivas para leer simultáneamente más de una serie de fragmentos. Los fragmentos amplificados son leídos en el secuenciador como picos de señales, y estos datos son registrados para ser procesados como una matriz de presencia/ausencia (Meudt y Clarke, 2007). Para *Avicennia germinans* se seguirá el protocolo para AFLPs ya establecido por Cerón Souza *et al.* (2005) y Nettel *et al.* (2007), mientras que para *R. mangle*, se empleará el protocolo de Pérez (2001) y Albretch *et al.* (2013).

Tabla 4. Microsatélites que se usaran para evaluar la variación y estructura genética de poblaciones de *Avicennia germinans*.

Nombre del locus	No. de acceso GeneBank	T _a °C	Secuencia repetida	Tamaño reportado de alelos (pb)	Referencia
Agerm_CT_003	DQ240231	55	[CT] ₁₄	412-516	Cerón-Souza <i>et al.</i> 2006
Agerm_CAT_004	HQ172890	55	[CAT] ₈	466-496	Cerón-Souza <i>et al.</i> 2006
Agerm_CT_004	HQ172891	55	[CT] ₁₇	331-413	Cerón-Souza <i>et al.</i> 2006
Agerm_GA_003	HQ172892	55	[GA] ₁₆	334-406	Cerón-Souza <i>et al.</i> 2006
Agerm_GT_006	HQ172893	55	[GT] ₁₆	308-388	Cerón-Souza <i>et al.</i> 2006
Agerm_CA_001	DQ240220	60	[CA] ₁₈	335-391	Cerón-Souza <i>et al.</i> 2006
Agerm_CTT_001	DQ240228	55	[CTT] ₈	114-141	Cerón-Souza <i>et al.</i> 2006
Agerm_CA_002	DQ240230	55	[CA] ₁₂	310-346	Cerón-Souza <i>et al.</i> 2006
Agerm_GT_003	DQ240227	55	[GT] ₁₇	462-512	Cerón-Souza <i>et al.</i> 2006
Agerm_24	HM470026	59.6	[AC] ₇	227	Mori <i>et al.</i> 2010

Handwritten signature and initials:

 uccl

Agerm_8	HM470010	65	[TG] ₉	183	Mori <i>et al.</i> 2010
AgD37	AY741806	50	[GA] ₂₁	163-197	Nettel <i>et al.</i> 2005
AgT8	AY741802	50	[TGTA] ₆	104-112	Nettel <i>et al.</i> 2005
AgT1	AY741801	60	[GTAT] ₈	118-151	Nettel <i>et al.</i> 2005
AgD6	AY741807	50	[ATT] ₄ N ₇ [GT] ₁₅	207-260	Nettel <i>et al.</i> 2005
AgT9	AY741804	50	[CA] ₈ [GA] ₂ [CAGA] ₅	218-238	Nettel <i>et al.</i> 2005
AgT4	AY741803	50	[CATA] ₅ [CATG[CATA] ₉	79-107	Nettel <i>et al.</i> 2005
AgT31	AY741800	60	[CA] ₁₂ [TA] ₂ GA[CATA] ₉	198-205	Nettel <i>et al.</i> 2005

ANÁLISIS DE LOS DATOS

....

Para los AFLPs, se construye la matriz de datos de presencia/ausencia. (Meudt y Clarke, 2007). A partir de esta base de datos se harán las pruebas de comparación de valores de F_{ST} . Estas pruebas se realizarán a través de programa DFDIST que está diseñado para procesar datos provenientes de marcadores dominantes (Caballero *et al.*, 2008) y BAYESCAN (Foll y Gaggiotti 2008; ver Manel *et al.* 2009 para su aplicación).

....

La probabilidad de alelos nulos se evaluará con *Microchecker* (van Oosterhout *et al.*, 2004), mientras que la probabilidad de loci bajo selección natural será evaluada mediante el análisis de outliers, en el módulo del programa *Arlequin* (Excoffier *et al.*, 2005); al mismo tiempo se estimará la riqueza alélica y heterocigosis con este programa. Mediante los programas *GenePop v 4.2* (Rousset, 2008) y *FSTAT v 2.9.3.2* (Goudet, 2001) se verificará si los loci están en equilibrio Hardy-Weinberg o si existe desequilibrio de ligamiento entre loci. Se analizará el número de alelos exclusivos por población (*PopGenReport*; Adamack y Gruber, 2014). El análisis de la diferenciación poblacional (R_{st} , estimador empleado para loci cuya evolución siguen el modelo de step-mutation) tanto para plántulas como árboles adultos de *A. germinans*, se realizará mediante AMOVA (Analysis of Molecular Variance), implementado en *Genalex* (Peakall y Smouse 2012). A partir de este análisis se realizarán también las comparaciones para establecer diferencias entre pares de poblaciones a partir de F_{ST} . De manera análoga, se emplearán métodos de asignación de poblaciones conjuntando múltiples loci en el análisis por medio del programa *STRUCTURE* (Pritchard *et al.* 2000; Evanno *et al.* 2005). La estructura espacial y la conectividad se analizará mediante *popgraph* (Dyer and Nason, 2004). El flujo génico reciente (migración) se estimará mediante *BayesAss* (Dyer y Nason, 2004). Aquí, se estima la migración considerando qué fracción de individuos de una población cualquiera derivan de otras (de un universo determinado por el muestreo; en este caso ocho poblaciones).

I. RESULTADOS Y PRODUCTOS:

- Secuencias de DNA de cloroplasto (fragmento *psbJ-petA*) y mitocondrial: 30 indivs. por pobl. × 28 pobl. para cada especie (tabla 5).

P.W.

www

- Genotipos de *loci* microsatélites: Adicionalmente para *A. germinans* se colectarán además 40 individuos adultos y 30 plántulas por población, genotipados para 18 loci por localidad, en un total de 8 localidades. 10,080 secuencias. Los resultados nuevos corresponde sólo a la comparación plántulas-adultos en 8 localidades (tabla 6).
- Tabla de diversidad genética por especie: Adicionalmente para *A. germinans* se realizarán las bases de datos para las plántulas.
- ~~AFLPs y sus frecuencias para cada localidad (ver Tabla y Mapa)~~
- Tabla con estadísticos de diversidad por localidad (tabla 7)
- Tabla de índices de AMOVA con porcentajes de diversidad jerarquizado, una por especie por marcador (tabla 8). Adicionalmente para *A. germinans* se realizarán las tablas de AMOVA para las plántulas.
- Tabla de *Fst* (Φ_{ST}) pareada mostrando índices de similitud para cada par de localidades, una por especie por marcador (tabla 9). Adicionalmente para *A. germinans* se realizarán las tablas de *Fst* para las plántulas.

NOTA: Las bases de datos de cada marcador y especie se elaborarán en formato de Excel. Los campos compartidos son (ejemplo):

Tabla 5. Tabla muestra de la forma en la que se entregarán las secuencias de DNA de cloroplasto.

ESPECIE	LOCALIDAD	INDIVIDUO (ÁRBOL)	SECUENCIA DE PSBJ-PETA
Rhizophora mangle	Los Petenes, Yuc.	1	AATTT..GGGGCC
Rhizophora mangle	Los Petenes, Yuc.	.	
Rhizophora mangle	Los Petenes, Yuc.	.	
Rhizophora mangle	Los Petenes, Yuc.	.	
Rhizophora mangle	Los Petenes, Yuc.	30	
Especie	Localidad	Individuo (árbol)	Secuencia de psbJ-petA
Rhizophora mangle	Bahía Magdalena	1	
Rhizophora mangle	Bahía Magdalena		
Rhizophora mangle	Bahía Magdalena		
Rhizophora mangle	Bahía Magdalena		
Rhizophora mangle	Bahía Magdalena	30	

Tabla 6. Tabla muestra de la forma en la que se entregarán las secuencias obtenidas de loci microsatélites para *A. germinans*.

Especie	Localidad	Individuo (árbol o plántula)	Agerm_CT_003	
<i>Avicennia germinans</i>	El Caimanero	1	412	516
<i>Avicennia germinans</i>	El Caimanero	.	.	.
<i>Avicennia germinans</i>	El Caimanero	.	.	.
<i>Avicennia germinans</i>	El Caimanero	40	.	.
<i>Avicennia germinans</i>	La Encrucijada	1	.	.
<i>Avicennia germinans</i>	La Encrucijada	.	.	.
<i>Avicennia germinans</i>	La Encrucijada	.	.	.
<i>Avicennia germinans</i>	La Encrucijada	40	.	.

UCCU

<i>Avicennia germinans</i>	Tuxpan	1		
<i>Avicennia germinans</i>	Tuxpan			
<i>Avicennia germinans</i>	Tuxpan			
<i>Avicennia germinans</i>	Tuxpan	40		

NOTA: Se realizarán bases de datos para individuos adultos y plántulas.

TABLA 7. Tabla tipo de diversidad π -diversidad nucleotídica Hd -diversidad haplotípica.

LOCALIDAD	NO. DE HAPLOTIPOS	π	Hd
Población 1	X	X	X
Población 2	X	X	X
Población 3	X	X	X
Población 4	X	X	X
Población 5	X	X	X
Población n	X	X	X

TABLA 8. Tabla tipo de resultados de análisis de AMOVA. F para marcadores diploides (microsatélites), Φ para marcadores haploides (DNA cloroplasto y mitocondrial).

FUENTE DE VARIACIÓN	ÍNDICE $\Phi (F)$	% DE VARIACIÓN
Entre Grupos.	$\Phi_{SC} (F_{SC})= X$	X
Entre poblaciones dentro de los grupos.	$\Phi_{CT} (F_{CT})= X$	X
Dentro de las poblaciones.	$\Phi_{ST} (F_{ST})= X$	X

TABLA 9. Tabla tipo de valores de F_{ST} (Φ_{ST}) pareada, en rojo y + valores significativos. Valor de significancia F_{ST} (Φ_{ST}). $P=0.05$.

	POBLACIÓN 1	POBLACIÓN 2	POBLACIÓN 3	POBLACIÓN 4	POBLACIÓN 5	POBLACIÓN 6
Población 1		-	+	+	+	+
Población 2	X		-	+	+	+
Población 3	X	X		+	+	+
Población 4	X	X	X		+	+
Población 5	X	X	X	X		-
Población 6	X	X	X	X	X	

J. INDICADORES DE AVANCE CUANTIFICADOS (ÉXITO):

SEMESTRE/ CUATRIMESTRE:	AVANCE:
Semestre 2	Al término del segundo semestre se espera: • Montaje de los AFLP's
Semestre 3	Al término del tercer semestre se espera: • 50% de los análisis AFLP para <i>R. mangle</i> .
Semestre 5	Al término del cuarto semestre se espera:

fw.
uauu

PRESUPUESTO DESGLOSADO DE LA AMPLIACIÓN PRESUPUESTAL

1. Honorarios:		
Beca posdoctoral, Dra. Sabina Velázquez Márquez. (3 meses; \$20,000.00 mes)		\$60,000.00
M. en C. Laura Lorena Cruz Rodríguez. Asistente de Campo y laboratorio. (\$8,000.00 mes x 3 meses)		\$24,000.00
Beca de Licenciatura, alumna Lourdes Martínez García (seis meses; \$4,000.00 mes)		\$24,000.00
SUMA		\$108,000.00

2. Equipo:		
Suma*		\$0.00

3. Viáticos y viajes (hospedaje, alimentación, transporte)		
SUMA		\$0.00

4. Otros (reactivos, servicios externos, consumibles)		
Servicios externos: secuenciación y genotipificación:		
Servicio de genotyping*	Costo unitario	\$80,000.00
Secuenciación DNA *		\$312,000.00
SUMA		\$ 392,000.00
GRAN TOTAL		
		\$500,000.00*

* no se aplicó IVA, ya que las unidades de Servicio en el extranjero no cobran IVA

man *for*

PRESUPUESTO GLOBAL DE LA AMPLIACIÓN

Rubro:	Monto total (M.N.)
1.- Honorarios (Becas)	\$108,000.00
2.- Equipo y mobiliario	
3.- Viáticos y viajes	
4.- Otros (servicios de secuenciación)*	\$ 392,000.00
Total (IVA incluido)	\$500,000.00

*Requeridos para concluir la secuenciación y genotipificación de microsatélites en *R. mangle* y *A. germinans* debido a la variación del tipo de cambio dólar/peso y para su implementación en las plántulas de *A. germinans*.

L. RECURSOS INSTITUCIONALES, MATERIALES Y HUMANOS:

1. RECURSOS HUMANOS:

- M.I.B.B. Rosalinda Tapia López, Técnica Académica en Biología Molecular, *Laboratorio de Genética Ecológica y Evolución*, Instituto de Ecología, UNAM. Obtención de marcadores moleculares, selección de marcadores, ~~construcción de mapas de restricción usando AFLPs~~, logística y administración de las compras y equipamiento.
- Dra. Sabina Velázquez Márquez, Posdoctorante, encargada de la amplificación, y análisis de las secuencias de cuatro marcadores para *R. mangle*.
- ~~M. en C. Jorge Alberto Cruz Bastida, realizará su tesis doctoral analizando la estructura genética de *Rhizophora mangle*, con marcadores de cloroplasto y AFLPs.~~
- Biól. Mariel Zavala Ochoa, realizará su tesis doctoral analizando la estructura genética de *Avicennia germinans*, con marcadores moleculares de cloroplasto y AFLPs.
- Pas. de Biología Lourdes Martínez García, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Realizará su tesis de Licenciatura analizando la variabilidad y estructura genética de poblaciones de *Avicennia germinans* de las poblaciones en estudio.

.....
L. DURACIÓN DEL PROYECTO: 40 MESES.

WCU


**MODIFICACIONES AL ANEXO 2
del Convenio Especifico Núm. FB1701/KE008/13**

CALENDARIO DE PAGOS Y DE ACTIVIDADES
Calendario de pagos

(Se modifica monto total a cubrir conforme a la Cláusula Primera, cambia fecha de pago de la cuarta partida y se añaden dos partidas adicionales)
El "FONDO" cubrirá a la "UNAM" para la realización del proyecto objeto del Convenio Especifico Núm. FB1701/KE008/13 y el Convenio Modificatorio al mismo, la cantidad de \$2,822,131.40 (dos millones ochocientos veintidós mil ciento treinta y un pesos 40/100 M.N.) que incluye todos los gastos que se requieran para el mismo. Dicha cantidad se pagará en seis partidas correspondientes a:

\$1,035,000.00 (un millón treinta y cinco mil pesos 00/100 M.N.) a la firma del Convenio Especifico,

\$805,000.00 (ochocientos cinco mil pesos 00/100 M.N.) el 15 de octubre de 2014,

\$322,131.40 (trescientos veintidós mil ciento treinta y un pesos 40/100 M.N.) el 15 de octubre de 2015,

\$160,000.00 (ciento sesenta mil pesos 00/100 M.N.) el 30 de junio de 2016,

\$340,000.00 (trescientos cuarenta mil pesos 00/100 M.N.) a la firma del Convenio Modificatorio, y

\$160,000.00 (ciento sesenta mil pesos 00/100 M.N.) a la entrega del informe y de los resultados finales a satisfacción de la "CONABIO".

Calendario de actividades

(Se eliminan las actividades de AFLP's, se reprograma la elaboración y entrega del informe final, y se amplía el calendario a 40 meses)

Se eliminan las siguientes actividades:

ACTIVIDADES/MESES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
AFLP's montaje																															
AFLP's obtención de datos																															

Se reprograman para los meses 35-40 las siguientes actividades:

ACTIVIDADES/MESES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Elaboración de informe																														
Entrega Informe final																														X

Se añaden las actividades de los meses 31 a 40:

ACTIVIDADES/MESES	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Chiapas y Occidente de México										
Península de Yucatán										
Golfo de México										
Colecta de plántulas de <i>Avicennia germinans</i>										
Adquisición de reactivos, síntesis de primers	X	X								
Montaje de microsátélites en plántulas de <i>A. germinans</i>	X	X								
Obtención de genotipos y secuenciación de loci en <i>R. manglie</i> y <i>A. germinans</i>			X	X	X	X	X			
Bases y análisis de datos			X	X	X	X	X	X	X	
Elaboración de informe					X	X	X	X	X	
Entrega informe parcial					X					
Entrega informe final										X

[Handwritten signature]

**MODIFICACIONES AL ANEXO 3
del Convenio Específico Núm. FB1701/KE008/13**

TÉRMINOS DE REFERENCIA

(Quedan sin cambios los términos de referencia 1, 2, 3a), 3c), 3d)ii, 3i), 3j), 5 a 21; se eliminan los términos de referencia 3f) relativo a AFLPs y la Tabla 5; cambian los términos de referencia relativos a resultados 3b) donde se incluyó la Tabla 1, 3d) donde se incluyó la Tabla 3, 3d)i donde se disminuyó de 10 a 9 loci, 3e), 3g) y 3h) donde se añadieron unas Notas a las Tablas 4, 6 y 7; cambia término de referencia 4 donde se eliminan los campos no obligatorios de la Tabla 9, para quedar como se señala a continuación:)

- 3 b) Tabla en *MSEXcel* con el identificador único (IU) de cada individuo de *R. mangle* y *A. germinans* muestreado y su posición geográfica (Tabla 1): Se muestrearán:
- i. *Avicennia germinans*.- 30 indivs. por pobl. x 24 pobl.
 - ii. *Rhizophora mangle*.- 30 indivs. por pobl. x 28 pobl.

Tabla 1. Tabla con las coordenadas de los individuos en *R. mangle* y *A. germinans*

Estado	Sitio	Especie	No. Individuo	Día	Mes	Año	Latitud N	Longitud W
Veracruz	Coatzacoalcos	<i>A. germinans</i>	VERcoa1	23	01	2014	18 05.826	94 25.883
Veracruz	Coatzacoalcos	<i>A. germinans</i>	VERcoa2	23	01	2014	18 05.364	94 25.574
Tamaulipas	La pesca	<i>R mangle</i>	TAMpes6	13	09	2013	23 46.739	97 44.992
Tamaulipas	La pesca	<i>R mangle</i>	TAMpes7	13	09	2013	23 46.736	97 44.972

- 3 d) Tabla en *MSEXcel* de los genotipos de *loci* microsatélites (Tabla 3):

Tabla 3. Tabla muestra de la forma en la que se entregarán las secuencias obtenidas de loci microsatélites.

Especie	Localidad	Individuo (árbol o plántula)	Agerm_CT_003	
<i>Avicennia germinans</i>	El Caimanero	1	412	516
<i>Avicennia germinans</i>	El Caimanero	.	.	.
<i>Avicennia germinans</i>	El Caimanero	.	.	.
<i>Avicennia germinans</i>	El Caimanero	40	.	.
<i>Avicennia germinans</i>	La Encrucijada	1	.	.
<i>Avicennia germinans</i>	La Encrucijada	.	.	.
<i>Avicennia germinans</i>	La Encrucijada	.	.	.
<i>Avicennia germinans</i>	La Encrucijada	40	.	.
<i>Avicennia germinans</i>	Tuxpan	1	.	.
<i>Avicennia germinans</i>	Tuxpan	.	.	.
<i>Avicennia germinans</i>	Tuxpan	.	.	.
<i>Avicennia germinans</i>	Tuxpan	40	.	.

NOTA: Se realizará adicionalmente bases de datos para plántulas de *A. germinans*.

Handwritten signature and date:
1/3/1
mull

3 d) i. *Avicennia germinans*: 30 individuos por población genotipados para 9 loci por localidad, por un total de 24 localidades.

3 e) Nota a la Tabla 4 de estructura y diversidad genética:

NOTA: Se realizará adicionalmente la base de datos de loci microsatélites para plántulas de *A. germinans*.

3 g) Nota a la Tabla 6 de resultados de análisis de AMOVA

NOTA: Se realizará adicionalmente el AMOVA para loci microsatélites en plántulas de *A. germinans*.

3 h) Nota en Tabla de valores de F_{ST}

NOTA: Se realizará adicionalmente la tabla de F_{ST} para plántulas de *A. germinans*.

4. Se entregará un mapa de puntos en formato shapefile

La tabla 9 asociada a este shapefile deberá contener los siguientes campos:

Campo	Descripción
Estado	El nombre completo del estado donde se realice la colecta
Nombre del sitio	De acuerdo con la Tabla 1 del documento del proyecto
Número de individuo (ID único)	Utilizar como referencia la siguiente nomenclatura: SONist1, que significa estado de Sonora, en la Isla Tiburón y es el individuo 1.
Día (dd)	A dos posiciones numérica
Mes (mm)	A dos posiciones numéricas
Año (aaaa)	A cuatro posiciones numéricas
Especie	Ag = <i>Avicennia germinans</i> Rm = <i>Rhizophora mangle</i>
Latitud (grados decimales)	Indicar la latitud en grados decimales
Longitud (grados decimales)	Indicar la longitud en grados decimales
Precisión GPS (m)	Se obtiene del GPS
Datum	Utilizar WGS84

ucue
br