



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

Programa de Estudios de Posgrado

GENÉTICA POBLACIONAL DE LANGOSTAS ESPINOSAS  
*Panulirus* spp. DE IMPORTANCIA  
COMERCIAL DEL PACÍFICO MEXICANO

## **TESIS**

Que para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias**

Uso, manejo y preservación de los recursos naturales  
(Orientación en Biología marina)

P r e s e n t a

**Francisco Javier García Rodríguez**

La Paz, Baja California Sur, marzo del 2006

## Conformación de Comités

La presente tesis fue dirigida por el Dr. Ricardo Pérez Enríquez

### **Comité tutorial:**

Dr. Ricardo Pérez Enríquez	CIBNOR. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Dra. Ana María Ibarra Humphries	CIBNOR. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Dr. Sergio Guzmán del Proo	Escuela de Ciencias Biológicas- IPN. Instituto Politécnico Nacional
Dr. Nick Elliott	CSIRO. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization
Dr. Armando Trasviña Castro	CICESE Campus La Paz. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada

### **Comité revisor de tesis**

Dr. Ricardo Pérez Enríquez	CIBNOR. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Dra. Ana María Ibarra Humphries	CIBNOR. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Dr. Sergio Guzmán del Proo	Escuela de Ciencias Biológicas-IPN. Instituto Politécnico Nacional
Dr. Nick Elliott	CSIRO. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization
Dr. Pedro Cruz Hernández	CIBNOR. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Dr. Francisco J. García de León	CIBNOR. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

### **Jurado de examen de grado**

Dr. Ricardo Pérez Enríquez	CIBNOR. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Dra. Ana María Ibarra Humphries	CIBNOR. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Dr. Sergio Guzmán del Proo	Escuela de Ciencias Biológicas-IPN. Instituto Politécnico Nacional
Dr. Nick Elliott	CSIRO. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization
Dr. Pedro Cruz Hernández	CIBNOR. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Dr. Francisco J. García de León (Suplente)	CIBNOR. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

## Prefacio

En mi interés por involucrarme en los métodos moleculares para realizar estudios a nivel poblacional conocí el trabajo que venían haciendo los investigadores del CIBNOR y en especial el trabajo que estaba desarrollando el Dr. Ricardo Pérez. El presente estudio es el producto de las ideas que en su momento discutimos sobre la genética de poblaciones de especies presentes en el Pacífico mexicano.

En este trabajo se revisa la estructura genética poblacional de dos especies de langostas del género *Panulirus*. Ambas, son especies de importancia comercial. Una, la langosta roja, es un recurso compartido con nuestro vecino país del norte y la otra, la langosta azul, es un recurso endémico de México.

Todas las muestras fueron analizadas en el laboratorio de Genética acuícola del CIBNOR y el contenido del documento está basado en los siguientes escritos:

- García-Rodríguez, F.J. y R. Pérez-Enríquez. 2006. Genetic differentiation of the California spiny lobster *Panulirus interruptus* (Randall, 1840) along the west coast of the Baja California Peninsula, Mexico. *Marine Biology*, 148: 621-629.
- García-Rodríguez, F.J., J. de la Cruz-Agüero, R. Pérez-Enríquez y N. MacLeod. 2004. Morphometric analysis of population differentiation and sexual dimorphism in the blue spiny lobster *Panulirus inflatus* (Bouvier 1895) from NW Mexico. *In: Elewa A. M. T. (ed.): Morphometrics-Applications in Biology and Paleontology*. Springer-Verlag, pp 29-40.
- García-Rodríguez, F.J. y R. Pérez-Enríquez (sometido). Lack of population differentiation of blue spiny lobster *Panulirus inflatus* (Bouvier 1895) along the Mexican Pacific inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Ecology*.

Agradezco infinitamente a todas las personas que me brindaron sus observaciones, comentarios y sugerencias. Y a los revisores que hicieron de éste un mejor documento. Aún y con todo eso, ante los errores de omisión, interpretación y redacción que pudieran encontrarse asumo completamente la responsabilidad.

FJGR

*Dedicatoria:*

*A mi hijo Ricardo y a mi esposa Alida, por ser lo más valiosa que tengo*

*A mis padres por ser un ejemplo claro de amor y trabajo*

*A mis hermanos por su amor y cariño y confianza*

## Agradecimientos

El presente trabajo resulta gracias al apoyo de varias personas e instituciones.

Quiero agradecer en primer lugar al CONACYT por soportar mis estudios a través del otorgamiento de una beca (No. 166720) y al CIBNOR (Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste) por las facilidades brindadas durante mis estudios. Agradezco también al personal del departamento de Posgrado del CIBNOR, a la Dra. Thelma Castellanos por su apoyo parcial a un curso que tomé fuera de la ciudad y a la Lic. Leticia González por su siempre amable atención y por mostrarme en todo momento sus buenas intenciones por apoyar a los estudiantes. A la Lic Osvelia Ibarra, Bety y Claudia por proveerme siempre de la información administrativa requerida. A Horacio y Manuel agradezco su buena disposición y su auxilio en el centro de cómputo.

Quiero agradecer al Dr. Ricardo Pérez-Enríquez por encausar mi investigación a lo largo de su desarrollo con sus observaciones y consejos. También, quiero agradecerle por haberme aceptado como estudiante y por haberme abierto la puerta al campo de la genética de poblaciones.

Agradezco sinceramente a mis tutores, los Dres. Ana María Ibarra, Sergio Guzmán del Proo, Armando Trasviña y Nick Elliot por sus valiosos comentarios durante las reuniones de trabajo y por los consejos que de manera independiente me brindaron. Todo cuanto me dijeron fue para mí muy importante y valioso.

Agradezco a los doctores Pedro Cruz Hernández y Francisco J. García de León por haberse integrado al comité de revisores, aportándome valiosos comentarios y excelentes sugerencias. Quiero expresarles mi más profundo reconocimiento por su dedica labor, por su gran capacidad y sobre todo por su sencillez.

Quiero agradecer a Armando Vega, Investigador del Instituto Nacional de la Pesca, por sus consejos y sugerencias y por soportar parcialmente la investigación de la langosta roja a través del proyecto SIMAC (No. 20000-7009). También agradezco a la Federación Regional de Sociedades Cooperativas de Producción Pesquera “Baja California,” por participar en la obtención de muestras de langosta roja. A Eduardo González, del CICESE, por su ayuda en el Matlab Ver 7 y al Dr. Nick Elliot por sus comentarios y sugerencias a los manuscritos publicados. A Ira Fogel por sus correcciones al manuscrito en inglés de la langosta roja.

Agradezco mucho al M. C. Raúl González, de la Facultad de Ciencias Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa, México, y a sus estudiantes la gran ayuda que me brindaron durante el muestreo realizado en Sinaloa y Nayarit. A los investigadores del Instituto Nacional de la Pesca, Dra. Elaine Espino por haberme enviado muestras de Jalisco y a los biólogos Rosy Gutiérrez y Esteban Cabrera por el invaluable apoyo que me dieron durante mi estancia en Guerrero. Créanme que sin su ayuda las colectas hubieran sido más que complicadas. El trabajo de langosta azul fue soportado por SAGARPA-CONACYT bajo el proyecto No. SAGARPA-2003-COI-129.

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a las personas que sin tener un compromiso formal se involucraron en mi trabajo y me apoyaron considerablemente. En primero lugar agradezco a los dueños y personal de la pescadería Marsen, ubicada en La Paz, Baja California Sur, por haberme permitido tomar medidas de las langostas de la Península de Baja California. Al Dr. José de la Cruz Agüero, del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-IPN y al Dr. Norman MacLeod, del Museo de Historia Natural de Londres, por su entusiasta participación y valiosa incorporación al trabajo de morfometría de langosta azul.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio: Pedro, José Luis, Rubén, Clarissa, Gaby, Yahir, Betzabe, Miguel, José Ángel, y Susana por su amistad. Recalco mi agradecimiento a Susana Ávila, a quien le debe su apoyo, confianza y amistad y a quien le guardo una profunda admiración por su fortaleza y entusiasmo. Todos ellos son grandes y buenas personas. Mi reconocimiento y admiración por su labor y desempeño.

Agradezco sinceramente a la familia Arizpe Covarrubias por la amistad y por el apoyo incondicional que siempre me ha brindado. Agradezco especialmente a Oscar Aarón por haberme prestado su PC portátil, con la cual escribe el presente documento.

Finalmente quiero agradecer a Alida, mi esposa, y a Ricardo, mi hijo, porque ya desde hace mucho tiempo se volvieron el motivo de mi vida y la razón de mi ser.

## Contenido

---

Acta de revisión de tesis	i
Conformación de comités	ii
Prefacio	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	viii
Lista de tablas	x
Resumen	xi
Abstract	xiii
<b>Introducción general</b>	
Generalidades	1
Justificación de la investigación	4
Objetivos	6
<b>Capítulo 1. Diferenciación genética de la langosta roja <i>Panulirus interruptus</i> (Randall, 1840) a lo largo de la costa oeste de la Península de Baja California, México</b>	
Resumen	7
Introducción	8
Objetivos	13
Materiales y métodos	14
Trabajo de campo	14
Extracción de ADN	14
Amplificación y selección de iniciadores	15
Selección de enzimas de restricción y digestión	17
Análisis de datos	18
Resultados	19
Diversidad genética	19
Diferenciación genética entre poblaciones	21
Discusión	26
<b>Capítulo 2. Análisis morfométrico y genético de poblaciones de langosta azul <i>Panulirus inflatus</i> en el Pacífico mexicano (Bouvier 1895)</b>	
Resumen	35
Introducción	36
Objetivos	39
Materiales y métodos	40
Trabajo de campo	40
Análisis morfométrico	41
Análisis genéticos	44
Resultados	48
Análisis morfométrico	48
Análisis genético	52
Discusión	58

<b>Discusión General</b>	65
Planteamiento de nuevas hipótesis y recomendaciones generales	71
Consideraciones de manejo	72
<b>Conclusiones</b>	74
<b>Literatura citada</b>	75
Anexos	88

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Area de estudio. Localidades de muestreo .....	15
Figura 2	Arbol del vecino mas cercano (NJ) construido de los haplotipos de langosta roja: Bahía Magdalena (1), San Juanico (2), Punta Abrejos (3), Punta Eugenia (4), Isla Guadalupe (5), and Ensenada (6). Los cuadro negros indican la localidad donde cada haplotipo fue encontrado.....	25
Figura 3	Curvas de diversidad: Valores estimados de diversidad haplotípica en función del tamaño de muestras .....	28
Figura 4	Area de estudio. Localidades de muestreo de langosta azul....	41
Figura 5	Vista dorsal (A) y lateral (B) del cefalotórax de la langosta azul <i>Panulirus inflatus</i> . Los círculos oscuros y los números asociados indican respectivamente los puntos homólogos y las medidas consideradas.....	42
Figura 6	Longitud media del cefalotórax de hembras y machos del macizo continental y de la península. MGCf= hembras del macizo continental, MGCm= machos del macizo continental, BCP= hembras de la península, BCPm= machos de la península.....	49
Figura 7	Análisis de Componentes Principales mostrando los "scores" producidos por los dos primeros componentes en el macizo continental (izquierda) y en la Península de Baja California (derecha). Círculos negros = machos, círculos blancos =hembras .....	50
Figura 8	Análisis SPC indicando los "scores" producidos por el segundo y tercer componente en machos (izquierda) y en hembras (derecha). Cuadros negros= Península de Baja California, cuadros blancos = Macizo continental.....	51



Figura 9	Valores promedios de la diversidad genética encontrada a partir de los tres fragmentos analizados del ADNmt de la langosta azul. Las curvas indicadas con símbolo cuadrados y redondo representan la diversidad haplotípica y la diversidad nucleotídica repectivamente .....	53
Figura 10	Arbol del vecino más cercano generado a partir de los 81 haplotipos de la región control. La tabla adjunta contiene las frecuencias observadas de cada uno de lo haplotipos en las localidades .....	55
Figura 11	Arbol del vecino más cercano generado a partir de los 40 haplotipos del 12S. La tabla adjunta contiene las frecuencias observadas de cada uno de lo haplotipos en las localidades ....	56
Figura 12	Arbol del vecino más cercano generado a partir de los 33 haplotipos del 16S. La tabla adjunta contiene las frecuencias observadas de cada uno de lo haplotipos en las localidades ....	57
Figura 13	Relación entre la diversidad haplotípica y diversidad nucleotídica en los tres fragmentos del ADN mitocondrial revisados de la langosta azul.	66

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Frecuencia del número de sitios de restricción reconocidos por cada enzima durante la digestión. Todas las enzimas reconocieron en la mayoría de la muestras un sitio de restricción. ....	21
Tabla 2	Distribución de los haplotipos compuestos en las seis poblaciones. El orden de las letras representa el fragmento producido por las enzimas de restricción: <i>AluI</i> , <i>HaeIII</i> , <i>XbaI</i> , <i>MspI</i> , <i>PflMI</i> and <i>NlaIV</i> .....	22
Tabla 3	Variabilidad genética de la langosta roja a partir de la diversidad haplotípica y nucleotídica. $n_h$ = número de haplotipos, $n$ = tamaño de muestra .....	23
Tabla 4	Porcentaje de diversidad nucleotídica (arriba) y porcentaje de divergencia nucleotídica (abajo) calculados entre cada para de poblaciones .....	26
Tabla 5	Pares de $\Phi_{st}$ entre poblaciones de langosta roja. El nivel de significancia fue evaluado después del ajuste a partir del procedimiento secuencial de Bonferroni .....	26
Tabla 6	Resultados del ANCOVA mostrando las medidas morfométricas que fueron significativamente diferentes entre machos y hembras .....	50
Tabla 7	Tabla 7. Diversidad genética de langosta azul estimada a partir de la región control, el 12S y el 16S en cinco localidades .....	53
Tabla 8	Tabla. 8. Valores $\Phi_{st}$ (abajo) y valores correspondientes de $P$ (arriba) de la langosta azul correspondientes a los tres fragmentos del ADNmt revisado .....	58

## RESUMEN

En el Pacífico mexicano se distribuyen dos especies de langostas que forman parte de un recurso pesquero de alto valor económico. La langosta roja (*Panulirus interruptus*) es una especie de ambiente templado que se distribuye en California, a lo largo de la costa oeste de la Península de Baja California y en algunas localidades del Golfo de California. La langosta azul (*P. inflatus*) es una especie tropical que se distribuye desde el sur de la Península de Baja California hasta el estado de Oaxaca. Debido a su importancia económica casi todos los estudios se han enfocado a proporcionar datos biológicos-pesqueros. Sin embargo pocos esfuerzos han sido conducidos para estudiar la genética poblacional de estas especies.

En el presente trabajo se estudió la estructura poblacional de la langosta roja y de la langosta azul con base en análisis genéticos. Se obtuvieron 229 muestras de tejido muscular de la langosta roja de seis sitios (Bahía Magdalena, San Juanico, Punta Abreojos, Punta Eugenia, Isla Guadalupe y Ensenada) ubicados del lado oeste de la Península de Baja California y se realizó un análisis de Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP, por sus siglas en inglés) basada en una región del ADN mitocondrial (ADNmt) conformada principalmente por la región control. La langosta azul fue estudiada a partir de secuencias provenientes de tres fragmentos del ADNmt: Región control ( $n=112$ ), 12S ( $n=112$ ) y 16S ( $n=113$ ) obtenidos de muestras colectadas en Baja California Sur, Sinaloa, Nayarit, Jalisco y Guerrero. También se obtuvieron medidas del cefalotórax de 129 langostas azules provenientes de la costa oeste de Baja California Sur, Nayarit y Sinaloa con el fin de realizar una comparación morfométrica entre individuos de la península y del macizo continental. Los análisis genéticos fueron enfocados a determinar la variabilidad genética (número de haplotipos, diversidad haplotípica y diversidad nucleotídica), la heterogeneidad de las frecuencias de haplotipos (mediante Chi-cuadrada basada en simulación de Monte Carlo) y la estructuración poblacional a partir de la partición de la variancia dentro y entre las poblaciones (análisis molecular de varianza, AMOVA). La relación entre las poblaciones también fue revisada mediante análisis filogeográficos utilizando árboles del vecino mas cercano (Neighbor-Joining). El análisis morfométrico realizado en la langosta azul se basó en técnicas de morfometría multivariada utilizando un análisis de componente principales modificado para reducir el efecto de la talla y analizar solo las variables de forma (SPCA, de sus siglas Sheared Principal Component Anlysis).

La langosta roja presentó 65 haplotipos y los valores de diversidad fueron relativamente altos y similares entre las seis localidades. Las frecuencias de los haplotipos no fueron heterogéneas entre las poblaciones ( $X^2=338.0$ ,  $P=0.104$ ) y únicamente el 0.84% de la variabilidad genética fue explicada por diferencias entre las localidades y no fue significativamente diferente de cero ( $\Phi_{st} = 0.0084$ ,  $P=0.082$ ). La divergencia nucleotídica promedio fue muy baja (0.094%) y ningún valor pareado de  $\Phi_{st}$  mostró diferencias significativas después del ajuste de Bonferroni. Tampoco se observó la presencia de algún patrón de asociación entre los linajes encontrados y las regiones geográficas a partir del análisis del vecino más cercano. La langosta azul mostró diferencias significativas en la morfometría del cefalotórax entre individuos de la península e individuos del macizo continental. Los “scores” del SPC2 fueron significativamente diferentes entre los machos ( $F= 33.55$ ,  $P<0.05$ ) y los “scores” del SPC3 fueron significativamente diferentes entre las

hembras ( $F=42.8$ ,  $P<0.05$ ). Sin embargo, tanto en machos como en hembras se observó una alta sobreposición de los valores producidos por esos dos componentes. Las medidas de variabilidad genética en la langosta azul fueron diferentes entre los tres fragmentos del ADNmt. La región control fue el fragmento mas variable y el 16S el menos variable. Los tres fragmentos indicaron valores altos de variabilidad genética y cada uno mostró resultados similares entre las cinco poblaciones. Los filogramas producidos a partir del análisis del vecino más cercano no revelaron clados asociados a un área geográfica. La distribución de las frecuencias fueron homogéneas entre las cinco localidades ( $\chi^2= 316.06$ ,  $P=0.787$ , para la región control;  $\chi^2=154.48$ ,  $P= 0.570$ , para el 12S; y  $\chi^2= 120.02$ ,  $P=0.816$ , para el 16S). Los porcentajes de variación explicada por diferencias poblacionales fueron extremadamente bajos y no fueron significativamente diferentes de cero ( $\Phi_{st} = -0.0027$ ,  $P=0.555$ , para la región control,  $\Phi_{st} = -0.0011$ ,  $P=0.466$  para el 12S;  $\Phi_{st} = -0.00834$ ,  $P= 0.759$  para el 16S).

Los resultados anteriores indican que las dos especies de langostas presentan una alta variabilidad genética y carecen de estructuración poblacional en el área estudiada. La ausencia de esta aparente subdivisión sugiere que las langostas mantienen un elevado flujo genético que puede ser consecuencia del extenso período larval y de los procesos oceanográficos que se desarrollan en el Pacífico mexicano que inducen a una elevada dispersión larval lo suficientemente fuerte como para homogeneizar las poblaciones a lo largo de su área de distribución.

---

Dr. Ricardo Pérez Enríquez  
Director de tesis

Palabras Clave: *Panulirus interruptus*, *Panulirus inflatus*, langosta, diversidad genética, ADN mitocondrial, estructura genética.

## ABSTRACT

Two economically spiny lobster species are distributed in the Mexican Pacific. The California spiny lobster (*Panulirus interruptus*) is a temperate species distributed in California, along the west coast of the Baja California Peninsula and in some localities of the Gulf of California. The blue spiny lobster (*P. inflatus*) is a tropical species distributed from southern Baja California Peninsula to Oaxaca. Due to their economic importance studies have been focused to provide biological-fishing data. However few efforts have been conducted to study the population genetics of these species.

In this study, population structure of the California red lobster and the blue lobster were analyzed using genetic techniques. Two hundred twenty nine tissue samples of California lobster were obtained from six localities from the west coast of the Baja California Peninsula (Bahía Magdalena, San Juanico, Punta Abreojos, Punta Eugenia, Isla Guadalupe and Ensenada) and an analysis of RFLPs was carried out based in a region of the mtDNA (composed mainly by the control region). The blue spiny lobster was studied using sequence data of three mtDNA fragments: the control region (n = 112), 12S (n = 112), and 16S (n = 113) obtained of samples from the states of Baja California Sur, Sinaloa, Nayarit, Jalisco y Guerrero. Also, 129 cephalotorax measures were obtained from Baja California Sur, Nayarit and Sinaloa in order to carry out a morphometric comparison between lobster from the peninsula and the continent. In the two species, genetic analyses were focused to determine the genetic variability (number of haplotypes, haplotype diversity and nucleotide diversity), the heterogeneity of the haplotype frequencies (by means of  $X^2$  based on Monte Carlo simulation) and the population structure comparing the variance partition within and among populations (analysis of molecular variance, AMOVA). The relation among the populations was also reviewed from Neighbor-Joining trees. The morphometric analysis of blue spiny lobster was carried out using multivariate morphometry, particularly using an Sheared Principal Component Analysis (SPCA) to analyze the components related to the cephalotorax shape.

Sixty five haplotypes and a relatively high and similar diversity among localities were observed in the California spiny lobster. No heterogeneity in the distribution of haplotypes among localities was revealed using Monte Carlo ( $X^2=338.0$ ,  $P=0.104$ ) and only 0.84% of the genetic variability was explained by differences among localities and was not significantly different from zero ( $\Phi_{st} = 0.0084$ ,  $P=0.082$ ). The nucleotide divergence was very small (0.094%) and pair-wise  $\Phi_{st}$  showed no genetic differentiation when Bonferroni procedure was applied. No phylogeographic pattern was clear in the neighbour-joining tree. The blue spiny lobster showed significant differentiation in cephalotorax morphometry

between individuals from peninsula and from continent. The SPC2 scores were significantly different among males ( $F = 33.55$ ,  $P < 0.05$ ) and the SPC3 scores were significantly different among females ( $F = 42.8$ ,  $P < 0.05$ ). However, both males and females showed high overlapping scores produced by those two components. Genetic variability was different among the three mtDNA fragments. The control region was the most variable fragment and the 16S was the least. The three mtDNA fragments indicated high genetic variability and they were similar among five localities. The neighbour-joining phylogram did not reveal clades associated to a geographical particular area. The distribution of the haplotype frequencies were homogeneous among the five localities ( $\chi^2 = 316.06$ ,  $P = 0.787$ , for the control region;  $\chi^2 = 154.48$ ,  $P = 0.570$ , for the 12S; and  $\chi^2 = 120.02$ ,  $P = 0.816$ , for the 16S). The percentages of variation explained by population differences were extremely small and they were not significantly different from zero ( $\Phi_{st} = -0.0027$ ,  $P = 0.555$ , for the region control,  $\Phi_{st} = -0.0011$ ,  $P = 0.466$  for the 12S;  $\Phi_{st} = -0.00834$ ,  $P = 0.759$  for the 16S). The previous results indicate that the two lobster species present a high genetic variability and they lack of a population genetic structure. It suggests that lobsters maintain a high genetic flow probably as consequence of the extensive larval period and of the oceanographic processes present in Mexican Pacific that combined, induce to a high homogenization of the lobster population along its area of distribution.

# Introducción general

## Generalidades

El género *Panulirus* se encuentra representado por 19 especies distribuidas ampliamente alrededor del mundo y es considerado uno de los géneros más exitosos de la familia Palinuridae (Ptacek, 2001). Varios autores han revisado las relaciones filogenéticas al interior del género y en general existe un acuerdo acerca de los procesos de radiación y divergencia que propiciaron el establecimiento y la distribución actual de las especies. Basado en características morfológicas George y Main (1967) dividieron el género en cuatro grupos, cada uno de los cuales diferenciado con base en las características del segundo y tercer maxilípido. Los análisis realizados por McWilliam (1995) mostraron dos formas morfológicas básicas de las larvas, una de las cuales fue asociada a los grupos I y II y la otra a los grupos III y IV definidos por George y Main (1967). Las relaciones filogenéticas propuestas por George y Marvin (1967) fueron también soportadas recientemente por análisis genéticos basados en dos genes mitocondriales (16S y 12S, Ptacek et al., 2001). Estos análisis produjeron dos principales linajes: uno representado por los Grupos I/II (*P. argus*, *P. interruptus*, *P. guttatus*, *P. penicillatus*, *P. echinatus*, *P. marginatus*, *P. pascuensis*, *P. femoristriga*, *P. cygnus*, *P. longipes*, *P. japonicus*) y el otro por los Grupos III/IV (*P. polyphagus*, *P. laevicauda*, *P. versicolor*, *P. ornatus*, *P. homarus*, *P. inflatus*, *P. stimpsoni*, *P. regius*, *P. gracilis*). Los resultados de este trabajo soportan la idea de que la radiación de las langostas tuvo su origen en un ancestro tipo-*argus* del cual divergieron *P. argus* y *P. interruptus*. Estos a su vez experimentaron un proceso de radicación en el Indo- Pacífico Oeste a partir del cual se originaron las especies del Grupo

I/II a finales del Mioceno. Una radiación mas reciente produjo al Grupo III/IV, el cual posiblemente surgió como consecuencia de especiaciones alopátricas en el Indo-Pacífico Oeste en respuesta a aislamientos temporales. La formación de nuevos hábitas debido al desplazamiento de las placas en el Indopacífico y la alteración de los patrones de circulación han sido propuestos como posibles causas para la especiación de las especies del Grupo III/IV (George, 1997; Ptacek *et al.*, 2001).

En el Pacífico mexicano se establecieron cuatro especies: *P. interruptus*, *P. penicillatus* y *P. inflatus* y *P. gracilis*. Estas conforman un grupo complejo con diferentes historias evolutivas. Por una parte se encuentran las langostas del Grupo I/II (*P. interruptus* y *P. penicillatus*) primeras en radiar, y por otra las del Grupo III/IV (*P. inflatus* y *P. gracilis*) de radicación posterior. *P. interruptus* es una especie templada que se distribuye desde California, USA, hasta el sur de la península de Baja California, con registros en el Golfo de California (Hendrickx, 1995). *P. inflatus* y *P. gracilis* son especies más tropicales. Su distribución en México es muy similar. Inicia en la parte sur de la costa oeste de la Península de Baja California y termina en Oaxaca, para la langosta azul, y en Perú, para la langosta verde. En México, *Panulirus penicillatus* es encontrada principalmente en el Archipiélago de las Islas Revillagigedo (Vega *et al.*, 1996).

A nivel intraespecífico, los estudios sobre la relaciones filogenéticas de las langostas han sido importantes porque además de que permiten definir mejor su taxonomía aportan elementos útiles para el mejor manejo de aquellas especies de importancia comercial.

La importancia pesquera de las langostas espinosas del género *Panulirus* ha sido causa de que varios estudios se hayan enfocado a determinar las relaciones genéticas de las



poblaciones. Estos esfuerzos han permitido reconocer patrones claros de diferenciación poblacional en ciertas especies y ausencia completa de diferencias genéticas en otras. En Hawai, los estudios sobre la estructura genética de la langosta del archipiélago de Hawaii *Panulirus marginatus* no reportaron diferencias significativas entre las localidades estudiadas mediante análisis de alozimas (Shaklee y Samollow, 1984). La langosta del Caribe *Panulirus argus* tampoco mostró diferencias entre las Bermudas y Florida mediante análisis de alozimas (Hateley y Sleeter, 1993) y RFLP's del ADN mitocondrial (ADNmt) (Silberman *et al.*, 1994a y 1994b). Sin embargo, los análisis realizados utilizando secuencias de ADNmt si indicaron diferencias genéticas significativas en la langosta del Caribe distribuida en Venezuela y Brasil (Sarver *et al.* 1998). Esfuerzos por identificar stocks mediante ADN mitocondrial también han sido conducidos en langostas comercialmente importantes de Australia: *Jasus edwardsii* y *J. verreauxi* (Ovenden *et al.*, 1992; Brasher *et al.*, 1992). Los resultados de los RFLPs para estas dos especies fueron contrastantes; mientras que en *J. edwardsii* se detectó una homogeneidad genética, en *J. verreauxi* se encontró restricción del flujo genético entre poblaciones de Nueva Zelanda y Australia (Ovenden y Brasher, 1994). Muestras de la langosta *P. cygnus* no permitieron detectar diferencias genéticas entre poblaciones de Australia mediante variantes de alozimas (Thompson *et al.*, 1996).

Especies de langostas de otros géneros también han sido estudiadas para determinar su estructura genética. Los estudios sobre ADN nuclear empleando marcadores RAPDs sugirieron la ausencia de diferencias genéticas en la langosta americana *Homarus americanus* en Canadá (Harding *et al.* 1997).

Otras aproximaciones metodológicas como análisis morfométricos también han sido implementadas en estudios de diferenciación poblacional en langostas (Harding *et al.*, 1993; Cadrin, 1995; Debuse *et al.*, 2001).

## Justificación de la investigación

La pesquería de langostas espinosas es una actividad económica importante que se desarrolla en el Pacífico Mexicano. Su explotación ha sido conocida desde finales del siglo XIX, sin embargo las regulaciones de manejo implementadas por el gobierno de México se iniciaron hasta 1930. Las estimación de las capturas anuales en el Pacífico mexicano fluctúan alrededor de las 1,800 t (Vega *et al.*, 1996 y Pérez-González *et al.* 2002) y se componen de la langosta roja *P. interruptus*, de la langosta azul *P. inflatus* y de la langosta verde *P. gracilis*. De éstas, la langosta roja es la especie más abundante y se estima que su contribución en los volúmenes de captura debe fluctuar alrededor de 1,300 t anuales (Vega *et al.*, 1996). La importancia comercial en México de las langostas tropicales es menor, y ha sido estimada en aproximadamente 500-650 t (Pérez-González *et al.* 2002).

Varios estudios se han realizado en las langostas espinosas de México, principalmente sobre aspectos biológico-pesqueros (Ayala, 1983; Briones y Lozano 1992; Pérez-González *et al.* 1992a, Pérez- González *et al.*, 1992b; Vega *et al.*, 1996; Guzmán del Prío *et al.*, 2003; Vega, 2003). Sin embargo, las relaciones genéticas entre poblaciones discretas a lo largo de la costa de México han sido escasamente estudiadas (Pérez-Enríquez *et al.* 2001).

La identificación de subpoblaciones ó stock es uno de los primeros pasos para determinar el “status” del recurso y para el desarrollo de una pesquería racional (Skillman, 1989). Hay

ejemplos que muestran que cuando los stock no están claramente delimitados el manejo efectivo de las pesquerías puede ser limitado (Austin *et al.*, 1998). Campbell y Mohn (1983), define stock como “un grupo de individuos autosustentable sobre el tiempo, que responde en forma similar a los cambios ambientales dentro de un área geográfica discreta. Esta definición puede o no corresponder con poblaciones reproductivamente aisladas”.

A lo largo de la costa oeste de la península de Baja California la langosta roja muestra diferencias biológicas (abundancia, temporada de reproducción, tallas) que son influidas por factores ambientales (Vega 2003); sin embargo aun no esta claro si éstas diferencias denotan también poblaciones genéticamente diferentes. La langosta azul requiere de un mayor esfuerzo de investigación sobre la dinámica poblacional (Pérez-González *et al.*, 2002) y a la fecha no existen estudios sobre genética poblacional de esta especie.

Debido a la poca información disponible sobre la estructura genética de las langostas en el Pacífico mexicano y dada la importancia de tener datos que soporten un mejor manejo de los recursos naturales, se plantea realizar un estudio sobre la estructura poblacional de la langosta roja y de la langosta azul basado en análisis genéticos y morfométricos. El trabajo se centra en responder las siguientes preguntas: ¿La langosta roja y la langosta azul se encuentran conformadas respectivamente por poblaciones genéticamente diferentes a lo largo del área de estudio? ¿Las diferencias biológicas y morfológicas presentes en las langostas provenientes de diferentes localidades coinciden con diferencias genéticas? ¿Qué factores influyen en las relaciones genéticas existentes en las langostas?

## Objetivo general

Evaluar las relaciones genéticas en las poblaciones de langosta roja y en las poblaciones de langosta azul con la intención de identificar el grado de estructuración poblacional al interior de cada una de ellas y con el fin de comprender mejor los principales factores que determinan en el Pacífico mexicano los procesos de diversidad y divergencia en estas especies.

## Objetivos Particulares:

- Determinar la diversidad y estructura genética de la langosta roja *Panulirus interruptus* en la costa oeste de la Península de Baja California a partir de análisis basados en RFLPs de un fragmento del ADNmt.
- Determinar las relaciones morfométricas y genéticas de la langosta azul *Panulirus inflatus* en México con el fin de conocer si la especie se encuentra conformada por poblaciones discretas a lo largo del área de estudio.

## Capítulo 1

# Diferenciación genética de la langosta roja *Panulirus interruptus* (Randall, 1840) a lo largo de la costa oeste de la Península de Baja California, México

### Resumen

La identificación de subpoblaciones en especies comerciales es relevante para las estrategias de manejo de una pesquería. En este trabajo, se obtuvieron muestras de tejido muscular de langosta roja (*Panulirus interruptus*) de seis localidades ubicadas en la costa oeste de la Península de Baja California (Ensenada, Isla Guadalupe, Punta Eugenia, Punta Abreojos, San Juanico y Bahía Magdalena) para determinar su estructura genética. La metodología consistió en realizar un análisis de RFLPs aplicada a la región control del ADNmt. Se estimó la diversidad haplotípica y nucleotídica y la estructura genética fue evaluada mediante pruebas de Chi-cuadrada, AMOVA y comparaciones pareadas de estimadores análogos de  $F_{st}$ . Los resultados indicaron que todas las localidades compartieron los haplotipos principales y que la distribución de las frecuencias de todos los haplotipos fue espacialmente homogénea. El análisis molecular de varianza indicó que muy poca variabilidad genética fue explicada por diferencias entre las localidades y que no fue significativamente diferente de cero. Se sugiere que los principales procesos oceanográficos existentes a lo largo de la costa y el prolongado período larval que influye en el transporte pasivo pueden explicar los resultados encontrados en el presente estudio.

## Introducción

La langosta roja *Panulirus interruptus* (Randall, 1840) es una especie subtropical que se distribuye desde California hasta el sur de la Península de Baja California. También existen registros de su presencia en la costa este de la península (Hendrickx, 1995), incluso observaciones no documentadas indican la existencia de una población dentro del Golfo de California tan al norte como Bahía de Los Ángeles (Vega<sup>1</sup> com. Pers.). Sin embargo, poco se sabe acerca de los atributos poblaciones y los aspectos básicos de la biología de esta especie dentro del golfo. La langosta roja es una especie que habita fondos rocosos y rocoso-arenosos, desde aguas someras hasta profundidades de alrededor de los 150 m (Vega *et al.*, 1996). Es comercialmente importante y sin duda es la langosta mejor estudiada en México.

La pesquería de la langosta roja ha influido fuertemente en el aspecto social, cultural y económico de la región y ha experimentado cambios notorios durante su desarrollo. Varios poblados ubicados en la costa oeste de la península tuvieron su origen y se establecieron en torno a la explotación de este recurso que comenzó a capturarse comercialmente a finales del siglo XIX y principios del siglo XX (Allen, 1916; Wilson, 1948). Andrade (1991) y Vega y Lluch-Cota (1992), reconocen tres etapas en las tendencias históricas de las capturas en la península de Baja California que muestran el desarrollo pesquero y económico. La primera etapa fue la de subexplotación que abarcó desde principios del siglo XX hasta 1945 y que se caracterizó por una captura promedio de alrededor de las 300 t al

---

<sup>1</sup> Vega, A. Centro Regional de Investigaciones Pesqueras-Instituto Nacional de la Pesca. La Paz, B.C.S., México.

año. La segunda etapa fue la de expansión que comprendió el período de 1946 a 1960 y que se caracterizó por un incremento pesquero cuyos volúmenes de capturas ascendieron en promedio a las 1000 t al año. La última etapa, la de la captura sostenida, se considera desde 1961 hasta nuestros días y se caracteriza por la presencia de una pesquería estable cuyas capturas fluctúan alrededor de las 1,300 t anuales. Actualmente la producción pesquera de langosta roja proviene casi en su totalidad de la costa oeste de la península de Baja California, en donde existen 26 cooperativas autorizadas que extraen en promedio unas 1,300 t cada año. La mayor abundancia de individuos adultos y larvas, registrada frente a las costas de Punta Eugenia (Johnson, 1960), incide en la alta producción pesquera que se registra entre los 26.5° N y los 28.5° N y cubre alrededor del 81% de la captura registrada en la península (Vega, 2001). Solo tres cooperativas operan de manera irregular en el Golfo de California y la cantidad que aportan a la producción total es mínima (Vega *et al.*, 1996).

El alto valor comercial de la langosta roja, ha propiciado el interés por obtener datos biológico-pesqueros que permitan establecer una mejor estrategia de manejo y un mejor aprovechamiento del recurso (Ayala, 1983; Vega *et al.*, 1996; Guzmán del Proó *et al.*, 2003; Vega, 2003). Actualmente se sabe que existe un desfase del inicio de la temporada de reproducción que varía respecto a la latitud y que se caracteriza porque se inicia primero en el norte y tres a cuatro meses más tarde se inicia en el sur. Este comportamiento diferencial tiene consecuencias prácticas y de manejo importantes ya que ha permitido definir mejor el establecimiento de épocas de veda y de períodos de capturas a lo largo de la península (Vega *et al.*, 1996). Recientemente Vega (2003) revisó un considerable número de datos provenientes de 250,000 hembras colectadas a lo largo de 10

años (de agosto de 1989 a septiembre de 1999) para evaluar la influencia de las diferentes condiciones oceanográficas (temperatura e índices de surgencias) sobre los patrones de reproducción. El estudio, basado en colectas realizadas en la costa oeste de la península (entre los 27.5° N y 28° N), evaluó el porcentaje de hembras con espermatozoides (R1), hembras con huevos fecundados (R2) y hembras con ovarios maduros (MO) como indicadores del estado de madurez sexual. Los resultados sugieren que el comportamiento reproductivo es afectado por las condiciones ambientales asociadas a las surgencias y principalmente a las variaciones en temperatura del agua. En condiciones de El Niño cuando el agua es menos fría, la madurez sexual (R1, R2 y MO) comienza antes de lo normal pero durante La Niña cuando el agua es más fría se retrasa. A partir de esta información se recomienda que las épocas de veda deban retrasarse o acelerarse en función de los factores ambientales (Vega, 2003).

Mientras que los esfuerzos por determinar los parámetros pesqueros en la langosta roja son notorios, la aplicación de técnicas moleculares y análisis genéticos que permitan interpretar mejor los datos biológicos y ecológicos y entender mejor los factores que afectan la estructura poblacional han sido escasos. En México, el único trabajo realizado utilizando técnicas moleculares para evaluar la estructura genética poblacional de la langosta roja fue abordado por Pérez-Enríquez *et al.* (2001). El estudio se basó en el análisis de 12 alozimas y contempló la revisión de muestras colectadas en cinco sitios ubicados a lo largo de la costa oeste de la Península de Baja California. La comparación de los valores de  $F_{st}$  entre todas las poblaciones indicó cierto grado de estructura genética atribuible principalmente a las diferencias en las frecuencias alélicas presentes en los loci *EST-4* y *LAP*. A pesar de la



gran distancia geográfica existente entre las localidades de Ensenada y Bahía Magdalena el valor del  $F_{st}$  estimado entre ellas no indicó diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo San Juanico que fue la población más cercana a Bahía Magdalena si mostró diferencias significativas. Una correlación entre el número de migrantes y la separación geográfica de las localidades muestreadas indicó un aislamiento por distancia del centro (Punta Abreojos) al norte de la península (Ensenada), pero no del centro al sur (Bahía Magdalena). Los autores sugieren que esta diferenciación poblacional puede ser consecuencia de las condiciones oceanográficas locales que propician la retención larval y disminuyen el flujo genético. Varios procesos como la corriente de Davidson, los giros semipermanentes y las condiciones locales, previamente señalados como eventos relevantes en la distribución larval (ver Johnson, 1960; Pringle, 1986), podrían estar actuando como barreras marinas y explicar los resultados encontrados. Alternativamente, los autores proponen otras dos explicaciones posibles. Una de ellas basada en un fenómeno conocido como “caos patchiness” y el cual fue originalmente propuesto por Hedgecock (1994) para explicar lo que ocurre en varias especies marinas que se encuentran bajo la influencia de la corriente de California. De acuerdo con Hedgecock (1994) algunas poblaciones muestran una homogeneidad genética a gran escala espacial, sin embargo presentan diferenciación genética a escala local o microgeográfica. Este fenómeno, encontrado a partir del análisis de alozimas en poblaciones del balano *Balanus glandula* y de la anchoveta *Engraulis mordax* fue explicado como el producto de un error de muestreo propiciado por el éxito reproductivo de un grupo de individuos los cuales producen una alta varianza genética. La alternativa a las dos previas explicaciones es que las diferencias poblacionales encontradas

en las langostas no son consecuencia precisamente de una diferenciación genética sino de un efecto de selección natural que actúa de manera diferencial sobre las alozimas.

Mientras que varios trabajos sobre diferenciación genética en poblaciones animales han encontrado resultados concordantes cuando aplican distintos marcadores moleculares, muchos otros han indicado grandes discrepancias sobre todo cuando se comparan los resultados obtenidos a partir de alozimas con los obtenidos a partir de marcadores del ADN (Karl y Avise, 1992; Pogson *et al.*, 1995; Allendorf y Seeb 2000; García-Machado *et al.*, 2001; Poteaux *et al.*, 2001). Las consideraciones anteriores sugieren que una mejor comprensión de la biología poblacional de una especie desde la perspectiva de su estructura genética se espera que sea obtenida cuando el análisis se encuentra sometido a diferentes herramientas moleculares e incluso a diferentes aproximaciones metodológicas. Esto resulta particularmente importante para aquellas especies que integran recursos biológicos con un alto nivel de conservación o con una gran importancia comercial ya que los resultados obtenidos pueden ser considerados como una fuente de información valiosa para apoyar estrategias de manejo.

En el presente estudio se realizó un análisis de la estructura genética de la langosta roja a lo largo de la costa oeste de la Península de Baja California usando análisis del ADNmt. Los resultados se basan en muestras obtenidas a partir de cinco localidades costeras, previamente utilizadas en análisis de alozimas (Pérez-Enríquez *et al.*, 2001), y una oceánica, la de la Isla Guadalupe (29° N, 118°15' W). Esta población no ha sido estudiada previamente desde el punto de vista de la genética poblacional. Considerando la diferenciación poblacional encontrada por Pérez-Enríquez *et al.*, (2001) en el presente

trabajo se espera también que encontrara diferencias genéticas entre las localidades de langostas a partir del análisis del ADNmt.

## Objetivo general

Determinar la diversidad y estructura genética de la langosta roja *Panulirus interruptus* en la costa oeste de la Península de Baja California a partir de análisis basados en RFLPs del ADNmt.

## Objetivos particulares

- Determinar la diversidad y divergencia genética de la langosta roja proveniente de localidades ubicadas en la costa oeste de la Península de Baja California mediante el análisis de la región control del ADNmt
- Evaluar la concordancia de los resultados obtenidos a partir de la técnica planteada en este trabajo con datos previamente reportadas y obtenidos con otras herramientas moleculares

## Materiales y métodos

### Trabajo de campo

Todas las muestras de tejido muscular analizadas en este trabajo fueron obtenidas de seis localidades ubicadas en la costa oeste de la Península de Baja California: Bahía Magdalena (BM), San Juanico (SJ), Punta Abreojos (PA), Punta Eugenia (PE), Ensenada (ENS) e Isla Guadalupe (GUA) (Fig. 1). El tamaño de la muestra varió de 36 a 40 individuo por localidad y con excepción de las muestras obtenidas en Isla Guadalupe todos los colectas se realizaron entre junio y diciembre de 1999. El tejido muscular de estas colectas fue congelado en nitrógeno líquido inmediatamente después de haber sido extraído de cada espécimen. Posteriormente, en el laboratorio, las muestras fueron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Las muestras de Isla Guadalupe se colectaron en diciembre del 2002 y a diferencia de las muestras anteriores, éstas se conservaron en etanol al 70% y se almacenaron a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### Extracción de ADN

La extracción del ADN consistió en hacer una reacción con buffer de TNS, proteinasa K y tejido muscular de cada individuo e incubarlo a  $37^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. Posteriormente se siguió el procedimiento estándar de extracción de ADN usando fenol-cloroformo (Pérez-Enríquez y Taniguchi, 1999). Después de la extracción, todas las muestras de ADN fueron resuspendidas en 100  $\mu\text{l}$  de buffer de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.6) y almacenados a  $4^{\circ}\text{C}$ .

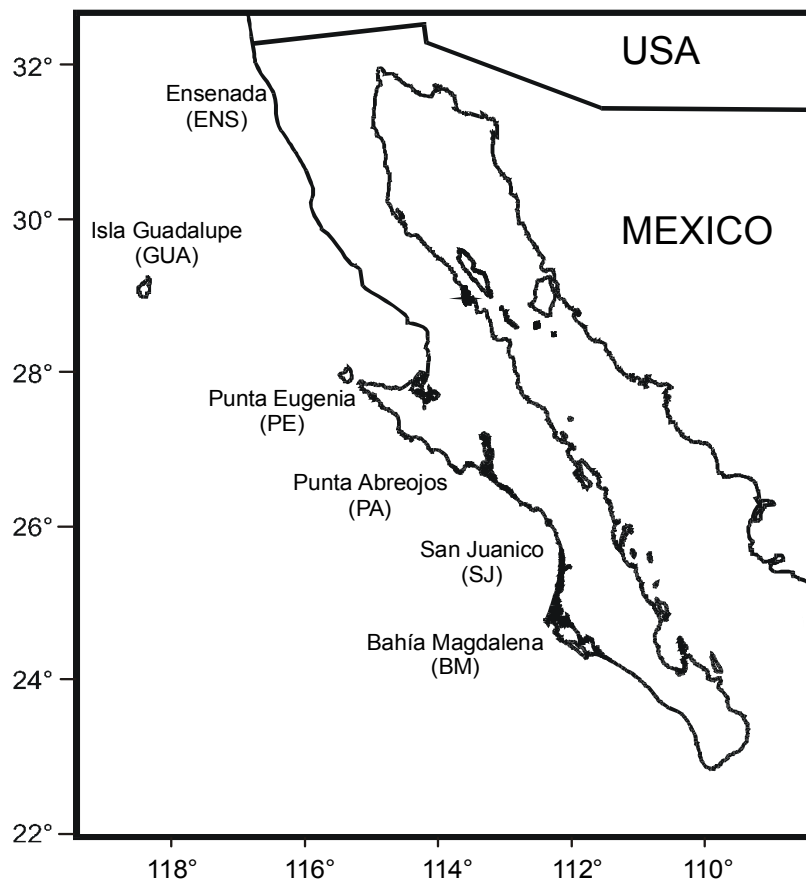


Fig. 1. Area de estudio. Localidades de muestreo

#### Amplificación y selección de iniciadores

Se amplificó una región (COI-16S) aproximadamente de 5,000 pb del ADNmt, localizada entre la subunidad grande del RNA ribosomal (16S) y la subunidad I del citocromo oxidasa (COI), con los iniciadores HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA) y 16sbr-H (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT) reportados respectivamente por Folmer *et al.* (1994) para invertebrados y por Palumbi *et al.* (1991) tanto para vertebrados como

invertebrados. La PCR fue preparada en un volumen total 12.5  $\mu$ l (Buffer Ix de PCR INVITROGENE, 0.8 mM de una mezcla de dNTP, 0.48  $\mu$ M de cada primer, 4.0 mM de  $MgCl^2$  y 1.25 U de polimerasa *Taq*). Los parámetros del termociclador (iCycler thermal cycling Bio-Rad) comprendieron 40 ciclos, cada uno de los cuales con tres segmentos (98°C durante 10 seg, 49°C durante 1 min y 68°C durante 17 min). Posteriormente, el producto obtenido de ésta PCR fue diluido (1/20) y 0.5  $\mu$ l de la dilución fue usado en una segunda PCR para la amplificación de la región control (contenida en el fragmento COI-16S) usando los iniciadores tRNA<sup>met</sup> (5'-GGGCATGAACCCACTAGCTT) y srRNA (5'-CAGGGTATCTAATCCTGGTT) reportados por Weider *et al.* (1996) para el crustáceo *Daphnia*. Estos iniciadores no fueron utilizados directamente sobre el genoma total del ADN debido a que produjeron amplificaciones inespecíficas. Una buena alternativa hubiera sido utilizar el primer fragmento amplificado (COI-16S) para los análisis futuros, sin embargo en la mayoría de las muestras la cantidad de producto obtenido de la PCR no fue suficiente como para hacer directamente los análisis de RFLPs. La reacción para amplificar la región control se preparó en volúmenes de 50  $\mu$ l utilizando las mismas concentraciones que se utilizaron en la primer PCR excepto que se agregaron 0,2 mM de mezcla de dNTP y 2.5 U de polimerasa *Taq* (INVITROGENE). El programa del termociclador consistió de 40 ciclos cada uno de los cuales con los parámetros siguientes: 95°C por 1 min, 45°C por 1 min, y 72°C por 1.5 min. Después de los 40 ciclos se agregó una extensión final a 72° durante 7 min. El producto de la segunda PCR de cinco individuos provenientes de localidades diferentes (excepto de San Juanico) fue purificado del gel de agarosa al 2% utilizando el kit de QIAGEN y enviados a secuenciación (Macrogen Inc. Corea). Basado en las secuencias obtenidas se diseñaron iniciadores internos (LanCR-F 5'-

GCGTTTAGCTTATTATTCG y LanCR-R 5'-AAAAATTCAGGCTAATGGA) utilizando el programa PRIMER3 (Rozen y Skaletsky, 2000) para obtener la secuencia completa de la región control.

### Selección de enzimas de restricción y digestión

Las secuencias obtenidas de los cinco individuos (con los primers LanCR-F y LanCR-R) se alinearon mediante el programa MultAlin (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) para visualizar las diferencias existentes entre ellas. También, se sometió cada una de las secuencias al programa ChromasPro ver. 1.33 para realizar una digestión virtual; a partir de la cual se seleccionaron seis enzimas de restricción (*AluI*, *HaeIII*, *XbaI*, *MspI*, *PfMI*, y *NlaIV*; New England BioLabs) que reconocieron sitios polimórficos. Cada muestra fue digerida con cada una de las enzimas en reacciones independientes utilizando 5 µl del producto de la amplificación de la región control y de 3 a 5 U de cada enzima. La digestión se hizo incubando la reacción durante toda la noche a la temperatura óptima sugerida por el fabricante para cada enzima. Los fragmentos digeridos se separaron mediante electroforesis de geles de agarosa al 2% y se revelaron con SybrGold 1x (10,000x; Molecular probes). El tamaño de los fragmentos fue estimado con base en un marcador de peso molecular conocido. Los patrones obtenidos de la digestión de cada enzima fueron identificados mediante letras, las cuales se utilizaron posteriormente para asignar el haplotipo compuesto de cada individuo.

## Análisis de datos

Los datos de los fragmentos generados de la digestión se convirtieron en formato binario y la matriz resultante fue utilizada para estimar las distancias genéticas (Nei, 1987; Nei y Li, 1979), las cuales junto con la distribución de las frecuencias de los haplotipos de cada población fueron empleadas para estimar la diversidad haplotípica (Nei, 1987), la diversidad nucleotídica dentro de cada población y la diversidad y divergencia nucleotídica entre las poblaciones (Nei and Tajima, 1981). La diversidad haplotípica es equivalente a la heterocigosidad esperada para datos diploides. Mide la probabilidad de que dos haplotipos escogidos al azar en una muestra sean diferentes. Por otra parte, la diversidad nucleotídica mide la probabilidad de que dos nucleótidos homólogos escogidos al azar sean diferentes. La diversidad nucleotídica representa el número promedio de sustituciones por sitio en una muestra de secuencias. Estos cálculos fueron realizados usando la rutina D y DA del programa REAP Ver. 4 (McElroy *et al.*, 1991).

Para determinar si la heterogeneidad de haplotipos entre las poblaciones era estadísticamente significativa se realizó una prueba de Chi-cuadrada basada en 1000 simulaciones estimadas a partir del procedimiento de Monte Carlo (Roff y Bentzen, 1989). Este análisis fue realizado usando la rutina Monte del programa REAP (McElroy *et al.*, 1991). Con los datos de divergencia nucleotídica de los haplotipos se construyó en el programa MEGA Ver 3.1 (Kumar *et al.*, 2001) un dendrograma basado en el algoritmo del vecino mas cercano (Neighbor-Joining). La intención de hacer este análisis fue para tratar de detectar patrones filogeográficos; es decir si el grado de divergencia de los linajes detectados mantenían una relación con su procedencia geográfica. También se realizó un



análisis molecular de varianza (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992) para conocer la partición de la varianza total entre diferentes niveles jerárquicos y detectar si las poblaciones de langostas se encontraban estructuradas. Las diferencias genéticas entre las poblaciones fueron evaluadas también mediante los valores de  $\Phi_{st}$  (análogo a  $F_{st}$ ). Debido a que se realizaron pruebas múltiples, se trató de disminuir el error de tipo I corrigiendo los niveles de significancia de los valores de  $\Phi_{st}$  mediante el procedimiento secuencial de Bonferroni (Rice, 1989). El AMOVA y los valores de  $\Phi_{st}$  fueron estimados en el programa ARLEQUIN Ver 2.000 (Schneider *et al.*, 2000)

## Resultados

### Diversidad genética

El fragmento amplificado sobre el cual se realizó el análisis de RFLP fue estimado en aproximadamente 1,350 pb. Con referencia en la secuencia de la langosta del Japón *Panulirus japonicus* (acceso al GENBANK con número NC\_004251) este fragmento se encontró integrado por una región del gen del 12S (alrededor de 430 pb), la región control (alrededor de 723 pb) y RNAs de transferencia (alrededor de 196 pb). Las seis enzimas de restricción empleadas en este trabajo mostraron diferente grado de polimorfismo. La enzima *PfMI* reveló tres patrones de restricción, la *HaeIII* cuatro, la *XbaI* y la *MspI* cinco, la *NlaIV* diez y la *AluI* catorce. Ninguna de estas enzimas reconoció más de tres sitios de restricción por individuo y todas reconocieron en la mayoría de las muestras solo un sitio de restricción (Tabla 1). Los mapas de sitios de restricción generados a partir de la

información anterior permitieron estimar que, a través de todas las muestras, la enzima *AluI* reconoció su sitio de digestión en doce posiciones diferentes a lo largo del fragmento analizado, la enzima *HaeIII* en cuatro, las enzimas *XbaI* y *MspI* en tres, la enzimas *PfMI* en dos y la enzima *NlaIV* en seis posiciones. Basado en estos datos y en el tamaño del sitio de reconocimiento de cada enzima se estimó que el número de nucleótidos evaluados en cada muestra fue de 130 pb. Con la intención de tener una referencia de la concordancia de los datos, se confirmó que los sitios de restricción generados de la digestión de las enzimas coincidieran con la ubicación de los sitios de restricción en las cinco secuencias conocidas.

Se reconocieron 65 haplotipos compuestos en las seis poblaciones estudiadas (Tabla 2). El haplotipo mas frecuente (AABAA) se encontró en el 34% de las langostas. Este haplotipo fue también el más común en cada una de las localidades muestreadas variando desde el 28.2% en Bahía Magdalena hasta el 44% en Punta Abrejos. Los dos haplotipos siguientes mas frecuentes fueron también encontrados en todas la poblaciones. Estos tres haplotipos fueron en conjunto observados en el 52.8% de todas las muestras.

El promedio de la diversidad haplotípica fue de 0.862 y el de la diversidad nucleotídica 3.4%. Los valores más altos fueron encontrados en Bahía Magdalena y Punta Eugenia. El número de haplotipos por tamaño de muestra fue similar entre todas las poblaciones, excepto para Punta Abrejos, la cual presentó los menores valores (Tabla 3).

Tabla 1. Frecuencia del número de sitios de restricción reconocidos por cada enzima durante la digestión. Todas las enzimas reconocieron en la mayoría de la muestras un sitio de restricción.

No. de sitios reconocido	AluI	HaeIII	XbaI	MspI	PfMII	NlaIV
0	2	0	34	35	53	7
1	189	224	172	191	176	201
2	31	5	23	3	0	21
3	7	0	0	0	0	0
	229	229	229	229	229	229

#### Diferenciación genética entre poblaciones

El análisis de Chi-cuadrada basado en la simulación de Monte Carlo no reveló heterogeneidad alguna en la distribución de los haplotipos a lo largo de las seis localidades estudiadas ( $X^2=338.0$ ,  $P=0.104$ ). Los resultados obtenidos del AMOVA considerando distintos niveles jerárquicos al agrupar las localidades en región norte (Ensenada), región centro (Guadalupe, Punta Eugenia y Punta Abrejos) y región sur (San Juanico y Bahía Magdalena) tampoco mostraron diferencias significativas que sugirieran diferencias poblacionales (entre regiones  $\Phi_{CT}=0.0073$ ,  $P=0.189$ ; entre poblaciones dentro de las regiones  $\Phi_{SC}=0.0030$ ,  $P=0.295$ ; y dentro de la poblaciones  $\Phi_{st}=0.0103$ ,  $P=0.063$ ). Casi toda la variación genética fue explicada por la varianza dentro de las poblaciones (98.97%).

Tabla 2. Distribución de los haplotipos compuestos en las seis poblaciones. El orden de las letras representa el fragmento producido por las enzimas de restricción: *AluI*, *HaeIII*, *XbaI*, *MspI*, *PfMI* and *NlaIV*.

	HAPLOTYPE	BM	SJ	PA	PE	GUA	ENS	AVERAGE
1	AABAAA	28.2	34.2	44.7	30.0	33.3	36.8	34.5
2	AABABA	7.7	13.2	10.5	7.5	22.2	7.9	11.4
3	AABBAA	7.7	2.6	7.9	7.5	8.3	7.9	7.0
4	AACAAA	5.1	0.0	10.5	5.0	0.0	2.6	3.9
5	AAAAAA	5.1	5.3	0.0	2.5	2.8	5.3	3.5
6	AAAABA	2.6	2.6	2.6	0.0	2.8	2.6	2.2
7	GABAAA	0.0	0.0	2.6	5.0	2.8	2.6	2.2
8	AADAAA	7.7	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0	1.7
9	AACABA	0.0	5.3	0.0	0.0	2.8	0.0	1.3
10	AABABB	0.0	0.0	0.0	5.0	2.8	0.0	1.3
11	AACBAA	2.6	0.0	0.0	0.0	5.6	0.0	1.3
12	AAABAA	2.6	2.6	0.0	0.0	2.8	0.0	1.3
13	AABAAB	0.0	5.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9
14	ABBAAA	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	2.6	0.9
15	DAAAAA	0.0	0.0	2.6	0.0	2.8	0.0	0.9
16	BABAAA	0.0	0.0	5.3	0.0	0.0	0.0	0.9
17	AACAAB	0.0	2.6	0.0	2.5	0.0	0.0	0.9
18	DADABA	5.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9
19	LABAAA	0.0	0.0	0.0	5.0	0.0	0.0	0.9
20	DABAAA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.3	0.9
21	GAAAAA	0.0	2.6	0.0	0.0	0.0	2.6	0.9
22	AABAAF	0.0	2.6	0.0	2.5	0.0	0.0	0.9
23	AABAAE	0.0	2.6	0.0	2.5	0.0	0.0	0.9
24	GACBAA	0.0	0.0	2.6	2.5	0.0	0.0	0.9
25	FABABA	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	0.0	0.4
26	AABCAG	0.0	0.0	0.0	2.5	0.0	0.0	0.4
27	AAAAAD	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.6	0.4
28	AABCBA	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	0.0	0.4
29	AAAAAB	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.6	0.4
30	AABBAE	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	0.0	0.4
31	AABBAB	0.0	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4
32	AAAAAE	0.0	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4
33	AABABI	0.0	0.0	2.6	0.0	0.0	0.0	0.4
34	AAABBF	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4
35	AABABF	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4
36	AAAAAH	0.0	0.0	0.0	2.5	0.0	0.0	0.4
37	AAAAAJ	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4
38	AAABBA	0.0	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4
39	AABACF	0.0	0.0	2.6	0.0	0.0	0.0	0.4
40	EAADBF	0.0	0.0	0.0	2.5	0.0	0.0	0.4
41	MAAABA	0.0	0.0	0.0	2.5	0.0	0.0	0.4
42	KADAAA	0.0	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4
43	KABAAA	0.0	0.0	0.0	2.5	0.0	0.0	0.4
44	KAABAF	0.0	0.0	0.0	2.5	0.0	0.0	0.4
45	JABBA	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4
46	JABAAA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.6	0.4
47	IAAAAA	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4
48	HABBAA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.6	0.4
49	HAAAAA	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4
50	GACAAB	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4
51	GABBAA	0.0	0.0	0.0	2.5	0.0	0.0	0.4
52	ACBABA	0.0	0.0	0.0	2.5	0.0	0.0	0.4
53	EABAAA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.6	0.4
54	AADAAB	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.6	0.4
55	DADAAB	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4
56	DABABA	0.0	0.0	2.6	0.0	0.0	0.0	0.4
57	DAAABH	0.0	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4
58	DAAABB	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.6	0.4
59	CABBBC	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.6	0.4

Tabla 2. *Continua...*

60	BACAAA	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4
61	BABBAA	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4
62	ADBABE	0.0	0.0	0.0	2.5	0.0	0.0	0.4
63	ACBEAA	0.0	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4
64	AAEBAA	0.0	0.0	2.6	0.0	0.0	0.0	0.4
65	AAEAAA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.6	0.4
	N	39	38	38	40	36	38	229

Tabla 3. Variabilidad genética de la langosta roja a partir de la diversidad haplotípica y nucleotídica.  $n_h$  = número de haotipos,  $n$  = tamaño de muestra.

Localidades	n	$n_h$	$N_h/n$	Diversidad haplotípica	Diversidad nucleotídica (%)
Bahía Magdalena	39	20	0.51	0.9096 +/- 0.03583	4.51
San Juancio	38	19	0.50	0.8706 +/- 0.04702	3.88
Punta Abreojos	38	13	0.34	0.7838 +/- 0.06326	2.21
Punta Eugenia	40	21	0.53	0.9026 +/- 0.03893	3.81
Isla Guadalupe	36	15	0.42	0.8444 +/- 0.04542	2.79
Ensenada	38	19	0.50	0.8592 +/- 0.05232	3.21
Average		$17.8 \pm 3.13$		$0.8617 \pm 0.00035$	$3.40 \pm 0.001\%$

Debido a que esta agrupación pudiera no ser natural también se realizó un AMOVA considerando todas las poblaciones como un solo grupo. De este análisis se observó que únicamente el 0.84% de la variabilidad genética fue explicada por diferencias entre localidades y no fueron significativamente diferentes de cero ( $\Phi_{st} = 0.0084$ ,  $P = 0.082$ ). Tampoco se observó algún patrón filogeográfico del árbol del vecino más cercano construido a partir de las distancias interhaplotípicas (Fig., 2). La diversidad nucleotídica promedio entre pares de poblaciones fue de 3.49%, con un valor mínimo de 2.43% (Punta

Abreojos-Guadalupe) y un máximo de 4.34% (Bahía Magdalena-Punta Eugenia). Los valores más altos se encontraron cuando las poblaciones fueron comparadas con Bahía Magdalena (Tabla 4). La divergencia nucleotídica promedio fue muy baja (0.094%) y cinco de los valores de divergencia pareados entre localidades fueron menores que cero, lo que indicó también una baja diferenciación entre las poblaciones (Tabla 4). Las mayores divergencias se encontraron entre Bahía Magdalena-Punta Abreojos (0.336%), Bahía Magdalena- Punta Eugenia (0.185%) y Bahía Magdalena-Guadalupe (0.436%). Los valores de  $\Phi_{st}$  no mostraron diferencia significativa, excepto entre Bahía Magdalena y Punta Abreojos ( $P=0.034$ ) y entre Bahía Magdalena e Isla Guadalupe ( $P=0.021$ ). Sin embargo después de aplicar el procedimiento secuencial de Bonferroni, no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 5).

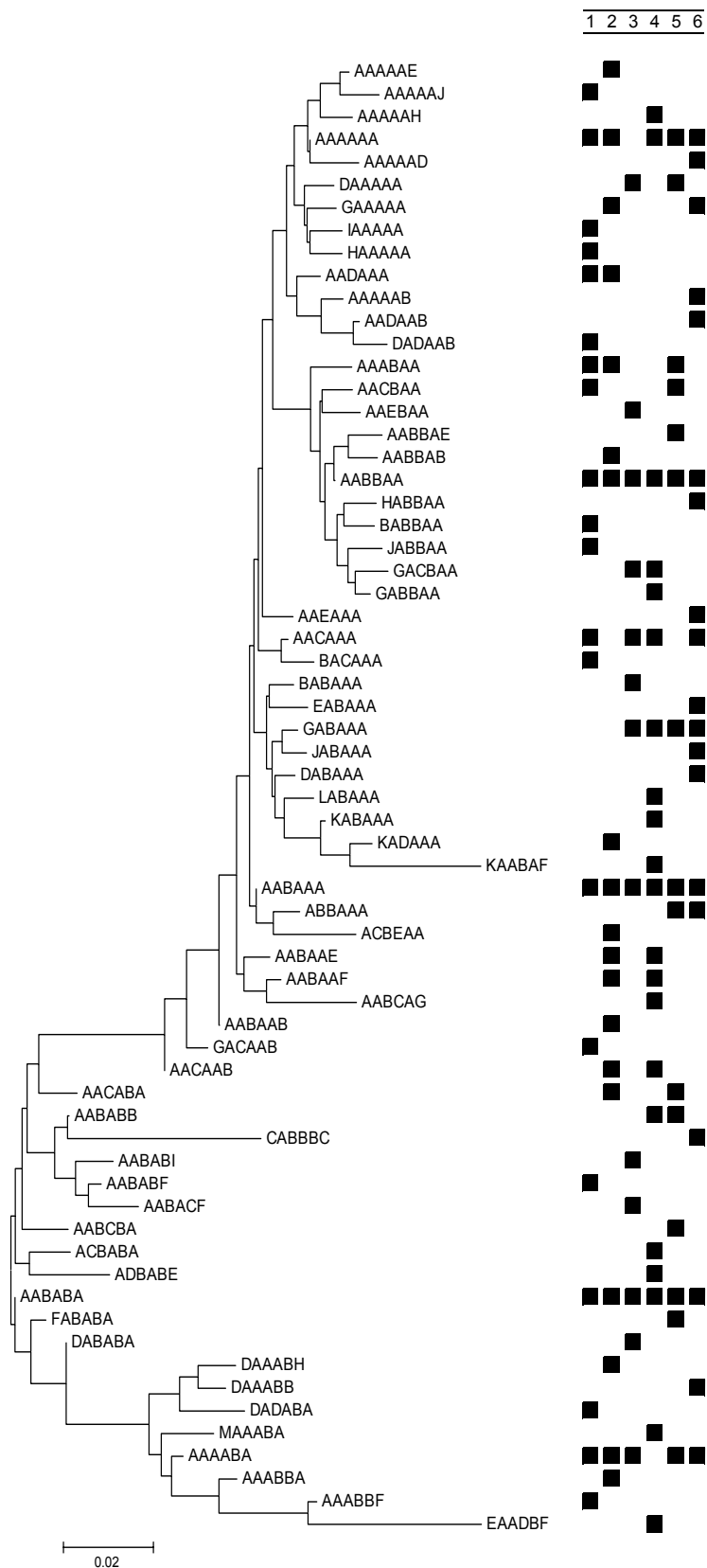


Figura 2. Arbol del vecino mas cercano (NJ) construido de los haplotipos de langosta roja: Bahía Magdalena (1), San Juanico (2), Punta Abrejos (3), Punta Eugenia (4), Isla Guadalupe (5), and Ensenada (6). Los cuadros negros indican la localidad donde cada haplotipo fue encontrado.

Tabla 4. Porcentaje de diversidad nucleotídica (arriba) y porcentaje de divergencia nucleotídica (abajo) calculados entre cada par de poblaciones.

	Bahía Magdalena	San Juanico	Punta Abreojos	Punta Eugenia	Isla Guadalupe	Ensenada
Bahía Magdalena		4.236	3.696	4.344	4.083	3.955
San Juanico	0.044		3.167	3.835	3.445	3.523
Punta Abreojos	0.336	0.121		3.009	2.425	2.799
Punta Eugenia	0.185	-0.010	-0.004		3.252	3.519
Isla Guadalupe	0.436	0.112	-0.075	-0.048		3.135
Ensenada	0.099	-0.019	0.089	0.010	0.138	

Tabla 5. Pares de  $\Phi_{st}$  entre poblaciones de langosta roja. El nivel de significancia fue evaluado después del ajuste a partir del procedimiento secuencial de Bonferroni.

	Bahía Magdalena	San Juanico	Punta Abreojos	Punta Eugenia	Isla Guadalupe	Ensenada
Bahía Magdalena						
San Juanico	0.00198 ns					
Punta Abreojos	0.02772 ns	0.01164 ns				
Punta Eugenia	0.01658 ns	-0.00336 ns	0.00021 ns			
Isla Guadalupe	0.03671 ns	0.00533 ns	0.00370 ns	0.00736 ns		
Ensenada	0.00905 ns	-0.00443 ns	-0.00147 ns	-0.00398 ns	0.01799 ns	

## Discusión

Los resultados encontrados a partir del metodología molecular planteada y de los análisis estadísticos realizados indican que no hay evidencias claras de una estructura genética tal que sugiera el establecimiento de diferentes poblaciones de langosta roja a lo largo de la costa oeste de la Península de Baja California. Debido a que estos hallazgos contrastan con los patrones de variación de alozimas encontrados previamente por Pérez-Enríquez et al. (2001) es conveniente revisar primero las posibles causas por la que ambos marcadores



moleculares arrojaron resultados contrastantes y posteriormente exponer las causas que permiten explicar nuestros resultados.

Se descarta un efecto propiciado por diferencias en el muestreo (diferencia en las fechas y sitios de colecta de tejido) debido a que, con excepción de las muestras obtenidas en la Isla Guadalupe, todas las muestras provienen de los mismos especímenes utilizados previamente en el estudio de alozimas (Pérez-Enríquez *et al.*, 2001). Se considera que el tamaño de la muestra tampoco afectó el análisis. Esta idea se basa en la revisión de las curvas de diversidad genética. Se estimó la diversidad haplotípica (altamente correlacionada con la diversidad nucleotídica ( $r=0.94$ ,  $P=0.0057$ ) de acuerdo con Nei (1987), para diferentes tamaños de muestra y se construyeron curvas de diversidad. El procedimiento consistió en calcular para cada localidad valores de diversidad haplotípica cada vez que el tamaño de la muestra se incrementaba de manera azarosa. Este procedimiento se realizó 1,000 veces para cada localidad usando una rutina generada en Matlab Ver 7. Con base en estos resultados se notó que pocas variaciones fueron observadas en cada localidad después de analizar 30 individuos (Fig. 3) sugiriendo que el tamaño de la muestra utilizado en este trabajo fue adecuado.

Una posible explicación de los resultados contrastantes entre las alozimas y el ADNmt podría estar relacionada con el efecto diferencial que tiene la selección natural sobre los distintos marcadores moleculares. Comúnmente se ha considerado que las alozimas son marcadores neutros y que lo que muestran es el resultado de procesos de reproducción azarosa; sin embargo muchos trabajos han encontrado diferencias considerables entre los resultados arrojado utilizando alozimas y los arrojados mediante análisis de marcadores del

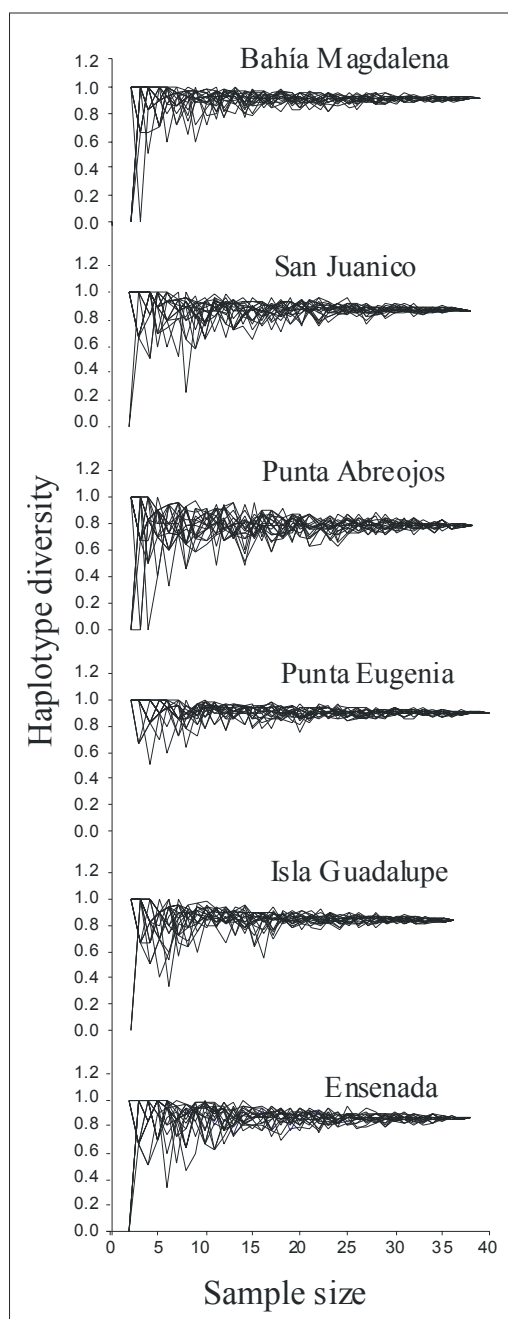


Fig. 3. Curvas de diversidad: Valores estimados de diversidad haplotípica en función del tamaño de muestra.

ADN y éstas diferencias han sido atribuidas a la presencia de una mayor presión selectiva sobre las alozimas (Scribner *et al.*, 1994; Pogson *et al.*, 1995; Allendorf y Seeb, 2000). Algunos estudios han mostrado que mientras que los datos de alozimas sugieren homogeneidad genética, los datos de ADN indican poblaciones estructuradas genéticamente. Karl y Avise (1992) encontraron un patrón de diferenciación genética en poblaciones del ostión *Crassostrea virginica* muy parecido cuando hicieron el análisis con ADN nuclear y cuando lo hicieron con ADN mitocondrial, pero muy diferente cuando lo hicieron con alozimas, el cual sugirió una población geográficamente homogénea. Basados en estos resultados los autores concluyen que las diferencias encontradas entre alozimas y ADNmt, y las similitudes entre el ADN nuclear y el ADNmt, reflejan la ausencia de factores biológicos que afecten diferencialmente el genoma

mitocondrial del nuclear y sugieren como explicación más plausible una selección balanceada sobre la proteínas, que homogeniza las frecuencias alélicas. Pogson *et al.* (1995) obtuvieron resultados parecidos en *Gadus morhua* mediante procedimientos similares. Ellos sugieren que la deriva genética actúa de manera mas intensa a nivel del ADN mientras que la selección natural actúa más a nivel de las proteínas.

Los datos mostrados en este trabajo indican resultados contrarios; menor divergencia con ADNmt que con alozimas. Sin embargo las causas podrían ser similares como ha sido sugerido en otros estudios. Barker *et al.* (1997) observaron una mayor diferenciación a partir de loci proteicos que a través del ADN nuclear (microsatélites) en poblaciones del búfalo *Bubalus bubalis* y señalan que sus resultados son evidencia de que las proteínas son afectadas por la selección natural. Un proceso similar en el cual las frecuencias alélicas de las alozimas se hubieran visto alteradas por factores ambientales podría haber sucedido en la langosta roja. La heterogeneidad en la distribución de las frecuencias alélicas de algunas alozimas ha sido fuertemente asociado con factores ambientales tales como la temperatura o la salinidad (Watt 1977; Koehn *at al.* 1980). Nissen *et al.* (2005) encontró una correlación entre la heterocigosidad de cada uno de los loci EST1 y PGM y la talla del cangrejo *Carcinus menea*, indicando que la divergencia genética evaluada mediante alozimas puede ser afectada cuando se comparan individuos de diferente talla. Otros factores ambientales y biológicos (inestabilidad trófica, latitud, nivel trófico y vagilidad) han mostrado una correlación con la heterocigosidad obtenida a partir de análisis de alozima en crustáceos decápodos (Nelson y Hegdecock, 1980).

Es probable que la diferenciación poblacional encontrada en las langostas utilizando alozimas sea mas causa de las distintas condiciones ambientales operando a nivel local que de una diferenciación genética. La selección natural actuando a nivel de proteína en la langosta roja podría ser reflejada por el pequeño número de loci que produjeron diferencias significativas entre las poblaciones (*EST-4* y *LAP*; Pérez-Enríquez *et al.*, 2001). Según Allendorf y Seeb (2000), la deriva, la mutación y la migración actúan en general de manera similar en todos los loci, mientras que la selección se espera que comúnmente actúe de manera diferencial. Este proceso ha sido sugerido para explicar resultados similares encontrados en otras especies (Scribner *et al.*, 1994; Pogson *et al.*, 1995; Allendorf y Seeb, 2000).

La no diferenciación poblacional encontrada en este trabajo probablemente es el reflejo de un alto flujo genético a lo largo de la costa oeste de la península. A la fecha no existe información documentada de los desplazamientos de los individuos adultos por lo que no es posible determinar si hay intercambio a nivel de animales adultos. Existen trabajos realizados en la costa este de Canadá que indican que el desplazamiento de la langosta americana (*Hammarus grammurus*), puede variar en función de la topografía de la costa. La mayoría de los desplazamientos reportados para esta especie son menores a los 20 km, y muy pocos han sido mayores a los 70 km (Comeau y Savoie, 2002). Considerando que la langosta roja presentara desplazamientos similares, el intercambio de individuos entre localidades no sería muy fuerte. Es importante considerar que los procesos de dispersión dependen de un gran número de factores asociados a la disponibilidad de alimento,

estrategias de reproducción, balances energéticos, etc., de tal manera que estas suposiciones deben ser consideradas con reserva.

Al margen de los movimientos que los individuos adultos pudieran realizar e influir en el intercambio de individuos entre localidades, la dispersión larval podría ser la vía más importante para el intercambio genético. Debido a que las larvas se encuentran sujetas a la influencia de las corrientes, la baja diferenciación genética observada en la langosta roja podría estar principalmente asociada a las condiciones oceanográficas. La corriente de California representa el flujo de agua más importante que se desarrolla a lo largo de la plataforma oeste de la Península de Baja California. Trae consigo aguas frías y subárticas hacia el sur y gira hacia al oeste para alimentar la Corriente Norecuatorial (Durazo y Baumgartner, 2002). La intensidad y el desplazamiento de la Corriente de California induce al mantenimiento del transporte larval de especies marinas y debe ser un mecanismo importante para la dispersión a grandes distancias y el flujo genético en las poblaciones de langostas. Esta mezcla larval puede ser incrementada por variaciones interanuales en las condiciones oceanográficas ocurridas durante períodos de El Niño y La Niña.

Varias especies distribuidas a lo largo de la costa de la península manifiestan eventos vicariantes que inducen la interrupción del flujo genético y la formación de poblaciones discretas. Los resultados obtenidos por Bernardi *et al.* (2003) a lo largo de la costa de la península, indican que algunas especies de peces, entre las que se encuentra *Girella nigricans* muestran diferencias genéticas que sugieren la presencia de subpoblaciones. Otras especies, sin embargo, como *Sebastes malcondonaldi*, distribuidas en la misma área, presenta mayor flujo genético y reflejan la existencia de una población panmíctica. Estas observaciones manifiestan que los mecanismos y los factores que llevan una población a un

aislamiento son variados y complejos. En la langosta roja el prolongado período larval puede ser un importante factor que contribuya a la aparente alta dispersión a lo largo de la costa oeste de la península de Baja California. El desarrollo larval de la langosta roja ha sido dividido en 11 estadios con una duración de siete a ocho meses (Jonson, 1960). Considerando este período y tomando en cuenta que a lo largo de la península existe un retraso en el inicio de la temporada de reproducción, estadios larvales deben estar presentes a lo largo del año, lo cual en combinación con los procesos oceanográficos propiciaría una alta dispersión.

En varios trabajos se ha discutido la importancia que tienen los procesos oceanográficos locales para limitar el desplazamiento de individuo y diferenciar poblaciones marinas en la costa central de la Península Baja California (Clark, 1947; Hubbs, 1960; Vrooman, 1964, Valentine, 1966). Se ha sugerido que a la altura de Punta Eugenia ( $\sim 28^{\circ}\text{N}$ ) existe un límite taxonómica que, asociada a las condiciones oceanográfica como la corriente de Davidson (un flujo de contracorriente) y los giros semipermanentes, limitan la distribución de algunos organismos hacia el sur (Hewitt, 1981). Las condiciones oceanográficas que se desarrollan frente a Punta Eugenia han sido también sugeridas como responsables de la retención larval de la langosta roja y consecuentemente de su gran abundancia a lo largo de la Península de Baja California (Johnson, 1960; Pringle, 1986). Con base en los resultados presentados en este trabajo se sugiere que estos procesos no han influido notoriamente en una estructuración clara a nivel poblacional de la langosta roja. Los resultados muestran apenas indicios que sugieren ligeras diferencias poblacionales. Por ejemplo, aunque la distancia interhaplotípica no reflejan un patrón filogeográfico claro (Fig. 2) los valores de  $\Phi_{st}$  y de divergencia nucleotídica fueron en general mas altos cuando Bahía Magdalena fue

comparada con otras localidades (Tabla 3, 4). Bahía Magdalena se encuentra en una zona de transición templado-tropical donde la Corriente de Costa Rica converge con la Corriente de California de agosto a diciembre (Wyrcki 1967; Badan 1997). En esta región la langosta roja coexiste con las otras dos especies de langosta de importancia comercial: la langosta azul (*P. Inflatus*) y la langosta verde (*P. gracilis*), las cuales encuentran ahí su límite norte de distribución.

De acuerdo con Skillman (1989) la mejor resolución para la diferenciación de stocks se obtiene de la combinación de información biológica, ecológica y genética. En la langosta roja los esfuerzos de investigación han permitido conocer varios de estos parámetros y adecuarlos exitosamente a la administración de este recurso. Trabajos previos indican que existen diferencias en las tallas de los adultos y en el inicio de la época de reproducción a lo largo de su distribución y que éstos son afectados por las distintas condiciones locales que prevalecen sobre la costa. Las variaciones en los loci protéicos (Pérez-Enríquez *et al.*, 2001) también representan resultados importantes ya que, al margen de su reconocimiento como marcadores neutros, las variaciones que presentan podrían estar reflejando el efecto diferencial de las condiciones ambientales a nivel local. Los resultados encontrados en el presente trabajo no soportan la idea de que la langosta roja se encuentre conformada por poblaciones genéticamente discretas, por lo que es conveniente considerar que esto puede ser el reflejo de un alto flujo genético que debe ser considerado ya que las medidas aplicadas en una localidad dada podría potencialmente influir en otros sitios.

La pesquería de la langosta roja en México es un buen ejemplo de una pesquería exitosa. Recientemente la pesquería que se desarrolla en la parte Central de Baja California fue certificada por una organización internacional de relevante reconocimiento (Marine

Stewardship Council, Documento No. SCS.BCL.FB.042704). Un mayor esfuerzo debe ser conducido para profundizar en la comprensión de las relaciones genéticas asociadas a las características biológicas y ecológicas de la especie: fuente de abastecimiento larval, variación temporal en la estructura genética, flujo genético a través de marcadores mas polimórficos como microsatélites y estimaciones de las relaciones poblacionales en toda el área de distribución incluyendo muestras de California y del Golfo de California.



## Capítulo 2

# Análisis morfométrico y genético de poblaciones de langosta azul *Panulirus inflatus* en el Pacífico mexicano (Bouvier 1895)

### Resumen

Datos de morfometría y secuencias de ADNmt fueron obtenidos con el fin de estudiar la estructura poblacional de la langosta azul *Panulirus inflatus* (Bouvier 1895) en el Pacífico mexicano. El análisis morfométrico se basó en la comparación multivariada de 17 medidas obtenidas a partir de ocho puntos homólogos ubicados en el cefalotórax. Todas las medidas fueron sometidas a un Análisis de Componentes Principales modificado para eliminar el efecto de la talla y poder comparar solo las variables de la forma del cuerpo (Sheared PCA). Previo a la comparación se evaluó el dimorfismo sexual y debido a que se detectaron diferencias dentro de cada localidad la comparación poblacional se hizo separando los sexos (para hembras y para machos). El análisis genético se basó en la revisión de 112 secuencias parciales de la región control, 112 secuencias parciales del 12S y 113 secuencias parciales del 16S del ADNmt. Las secuencias fueron utilizadas para construir árboles filogeográficos, estimar medidas de diversidad genética y diferenciar poblaciones a partir de estimadores análogos a  $F_{st}$ . Los resultados indicaron ligeras diferencias en la morfometría de las langostas de regiones comparadas. Los valores de diversidad genética fueron similares entre las localidades y las variaciones moleculares encontradas fueron atribuibles a diferencias dentro de las poblaciones pero no a variaciones entre las poblaciones. Los bajos niveles de diferenciación encontrados a partir de la comparación del cefalotórax y la ausencia de una estructura genética clara sugieren la presencia de una sola población panmíctica con cierta plasticidad fenotípica que puede estar asociada a condiciones locales del ambiente.

## Introducción

La langosta azul *Panulirus inflatus* se distribuye en el litoral del Pacífico mexicano desde Las Barracas, B.C.S., hasta Puerto Ángel, Oaxaca. Es una especie que habita fondos rocosos y generalmente se encuentra en aguas someras que no superan los 30 m de profundidad. Su mayor importancia pesquera, asociada a su principal distribución, se concentra en la costa del continente y solo una fracción del volumen total proviene del estado de Baja California Sur, específicamente del área de Bahía Magdalena (Vega *et al.*, 1996).

La langosta azul es un recurso pesquero de gran importancia comercial a nivel local y junto con la langosta verde representa la única pesquería de langosta que se desarrolla en las costas del continente, principalmente de Sinaloa a Oaxaca. A pesar de su importancia económica y de ser un recurso explotado por décadas, los registros oficiales de captura en el Pacífico Mexicano comenzaron a obtenerse hace relativamente poco tiempo (1989). Los reportes muestran que la producción pesquera de langostas en México ha presentado variaciones considerables y algunas estimaciones indican que, junto con la langosta verde, las capturas comerciales en el Pacífico Mexicano, incluyendo el área de Baja California Sur, fluctúa entre las 500-650 t (Pérez-González *et al.*, 2002).

La pesca de langosta azul se realiza implementando técnicas que en general difieren a lo largo de su área de distribución. En la Península de Baja California la captura se realiza utilizando trampas que son fabricadas principalmente con madera o con alambre galvanizado recubierto con plástico (Vega *et al.*, 1996). En el norte del Pacífico Mexicano,

específicamente en Sinaloa, la pesquería de esta especie se realiza con redes tipo chinchorro cuya longitud y altura generalmente varían de 75 a 200 m y de 0.9 a 1.8 m, respectivamente. En otras áreas de pesca, sobre todo hacia el centro y sur de su área de distribución, la langosta azul se pesca mediante buceo libre o autónomo utilizando ganchos metálicos que son maniobrados manualmente (Pérez-González *et al.*, 2002).

La langosta azul es un recurso de alta importancia comercial y los esfuerzos de investigación se han centrado principalmente en determinar los parámetros biológico-pesqueros (Briones *et al.* 1981; Briones y Lozano 1992; Pérez-González *et al.*, 1992a, Pérez-González *et al.*, 1992b; Muñoz-García *et al.*, 1998; Muñoz-García *et al.*, 2000). Con base en la información disponible actualmente se han establecido épocas de veda. También se han fijado tallas mínimas de captura que varían de los 92.5 mm de longitud del cefalotórax (LC) en el sur de Baja California Sur a los 75 mm de LC en las costas del sur, de Michoacán a Chiapas. A pesar de los esfuerzos de investigación realizados, aun existe información que debe ser obtenida para un buen manejo de su pesquería. Es importante conocer con mayor precisión a lo largo de su área de distribución, la actividad reproductiva, tasas de crecimiento, tasas de mortalidad, edad de la primera madurez e índices de reclutamiento (Pérez-González *et al.*, 2002). Recientes esfuerzos, que marcan la incorporación de nuevos investigadores al estudio de langostas están siendo conducidos en los estados de Baja California Sur (Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-Instituto Politécnico Nacional), Jalisco y Guerrero (Instituto Nacional de la Pesca).

Varias estrategias de análisis han sido abordadas para comparar poblaciones en langostas. Éstas incluyen técnicas de morfometría tradicional basada en métodos multivariados

(Harding *et al.*, 1993; Cadrin, 1995; Debuse *et al.*, 2001) y técnicas moleculares que permiten evaluar mediante electroforesis las diferentes variantes aloenzimáticas (Shaklee y Samollow, 1984; Hateley y Sleeter, 1993; Thompson *et al.* 1996; Pérez-Enríquez *et al.*, 2001). Las estrategias moleculares para la diferenciación de poblaciones también incluyen técnicas que incorporan cada vez más el análisis del ADN mitocondrial (Silberman *et al.*, 1994a y 1994b; Sarver *et al.*, 1998; Ovenden y Brasher 1994; Sarver *et al.*, 2000; Triantafyllidis *et al.*, 2005) y del ADN nuclear (Harding *et al.*, 1997).

En el presente estudio se analizó la morfología del cefalotórax y las características genéticas de la langosta azul con la intención de investigar la estructura poblacional. Las diferencias morfométricas entre poblaciones resultan de gran interés debido a que pueden ser asociadas con adaptaciones a condiciones locales del hábitat debido a un alto grado de plasticidad fenotípica (Doadrio *et al.*, 2002), o si los fenotipos se encuentran bien diferenciados pueden también sugerir la presencia de poblaciones genéticamente estructurados. En este estudio se utilizó morfometría multivariada basada en datos de distancias, la cual ha mostrado previamente ser una herramienta informativa para distinguir taxa cercanamente relacionados (Corti *et al.*, 1981; Creech 1992; Elliot *et al.* 1995; Eisenhour, 1997; Lourie *et al.*, 1998). Los métodos morfométricos permiten cuantificar las diferencias en talla y forma del cuerpo basado en características anatómicas correspondientes. Específicamente, la morfometría multivariada ha sido aplicada para estudiar la variación intrapoblacional en varias especies de langostas (Harding *et al.*, 1993; Cadrin 1995; Castro *et al.*, 1998; Debuse *et al.*, 2001) y en general en estudios con especies de importancia pesquera (Krause *et al.*, 1994; Tzeng *et al.*, 2001).

Por su parte las técnicas moleculares utilizando ADN se han hecho cada vez más accesibles, lo cual ha permitido que un mayor número de grupos taxonómicos pueda ser estudiado bajo este enfoque. Estudios previos sobre diferenciación poblacional en langostas se basaron en análisis de alozimas (Shaklee y Samollow, 1984; Hateley y Sleeter, 1993; Thompson *et al.*, 1996; Pérez-Enríquez *et al.*, 2001). Sin embargo el análisis de linajes mitocondriales se ha implementado también como una estrategia para evaluar la estructura poblacional en este grupo de crustáceos (Triantafyllidis *et al.*, 2005). En el presente estudio el análisis genético se basó en la revisión de tres fragmentos del ADN mitocondrial: una porción de la región control, una porción del 12S y una porción del 16S del ARN ribosómico. Aun cuando el gen del 16S es relativamente poco variable los trabajos de Sarver *et al.* (1998) y Sarver *et al.*, (2000), muestran que en langostas espinosas puede ser útil para estudios de genética poblacional.

## Objetivo general

Determinar las relaciones morfométricas y genéticas de la langosta azul en México con el fin de conocer si la especie se encuentra conformada por poblaciones naturales discretas a lo largo de su área de distribución.

### Objetivos específicos

- Revisar las diferencias poblacionales de langostas provenientes de la península de Baja California y de las costas del continental mexicano con base en las características morfométricas del cefalotórax
- Determinar la diversidad y divergencia genética de la langosta azul proveniente de cinco localidades ubicadas a lo largo de su área de distribución.

## Materiales y Métodos

### Trabajo de campo

Todos los especímenes analizados en este estudio provienen de capturas realizadas entre septiembre del 2002 y mayo del 2005 en los estados de Baja California Sur (localidad: Bahía Magdalena) y en los estados de la costa del continente: Sinaloa (Mazatlán), Nayarit (La Peñita y Sayulita), Jalisco (Barra de Navidad), y Guerrero (Zihuatanejo) (Fig. 4). Las langostas obtenidas en Baja California Sur fueron capturadas usando trampas langosteras tradicionalmente usadas en la pesquería comercial, mientras que los especímenes obtenidos en las costas del continente fueron colectados con redes tipo chinchorro y mediante buceo como se realiza la captura comercial en esa región. Para los análisis genéticos, se extrajo una porción de músculo de cada uno de los individuos y se conservó en alcohol al 70%.

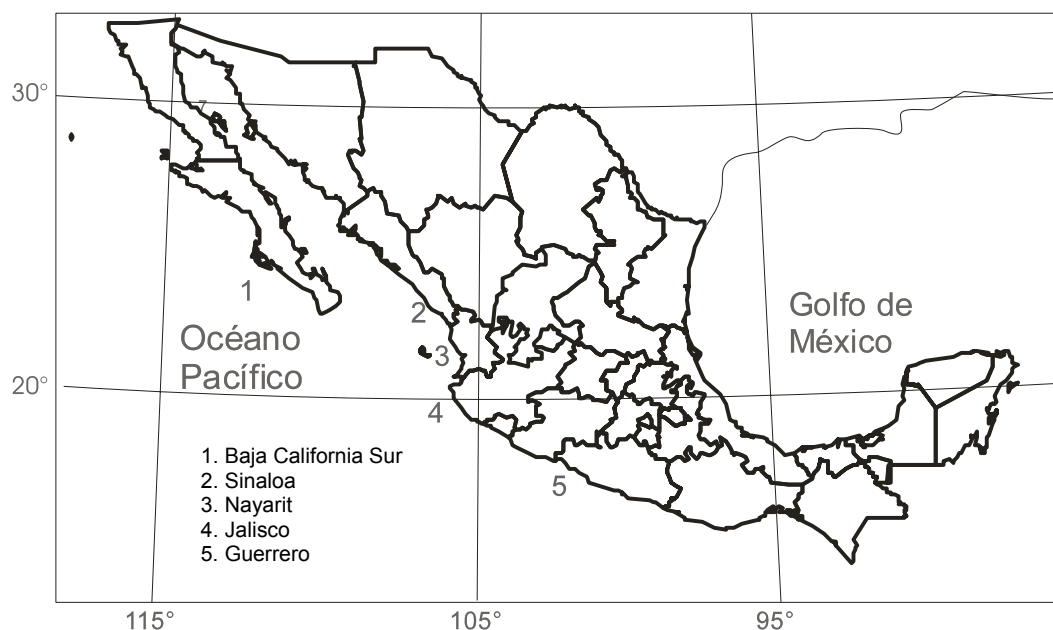


Fig. 4. Area de estudio. Localidades de muestreo de langosta azul

### Análisis morfométrico

#### *Obtención de datos*

El análisis morfométrico fue realizado a partir de individuos colectados solo en Baja California Sur, Sinaloa y Nayarit debido a que no fue posible obtener datos de las otras localidades. Para incrementar el tamaño de la muestra la información proveniente de Sinaloa y Nayarit fue combinada de tal manera que el análisis se enfocó a comparar individuos provenientes de la península con individuos provenientes de las costas del continente.

Se obtuvieron 17 medidas del cefalotórax derivadas de ocho puntos morfológicamente homólogos (Fig. 5) siguiendo un protocolo modificado de rejilla (Strauss y Bookstein, 1982). Las medidas fueron obtenidas de 129 individuos, 75 de los cuales fueron colectados en la Península de Baja California y 54 en las costas del continente. Los ocho puntos homólogos fueron elegidos debido a que ellos no representan puntos ambiguos en la morfología del caparazón. Además reflejan una buena representación de la forma. Para minimizar los sesgos durante la toma de datos se siguieron los siguientes criterios: a) todos los individuos fueron medidos por la misma persona, b) el orden en la cual se midieron los machos y las hembras fue azaroso y c) las medidas en todos los casos fueron tomadas de un mismo lado del espécimen (para este caso particular se consideró el lado derecho). Todos las langostas fueron medidas utilizando un vernier electrónico con una precisión de 0.01 mm.

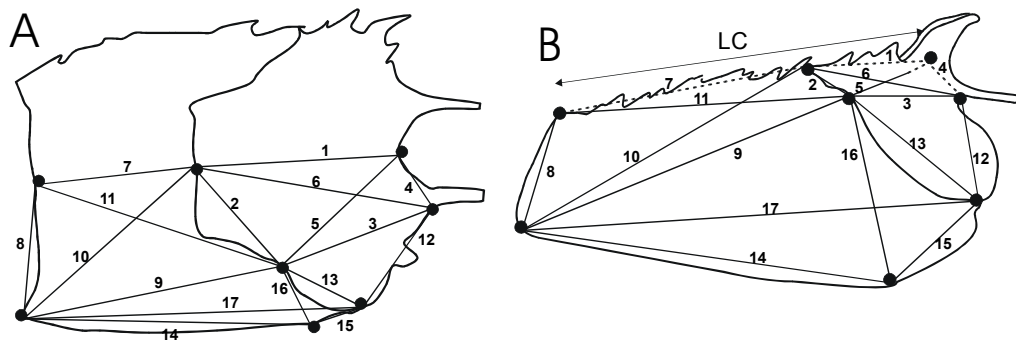


Fig. 5. Vista dorsal (A) y lateral (B) del cefalotórax de la langosta azul *Panulirus inflatus*. Los círculos oscuros y los números asociados indican respectivamente los puntos homólogos y las medidas consideradas.



### *Análisis de datos morfométricos*

Previo a la comparación poblacional los datos fueron divididos en machos y en hembras de cada región para determinar el efecto del sexo sobre la morfología. Las diferencias entre machos y hembras por localidad se probaron mediante Análisis de Covarianza (ANCOVA), haciendo regresiones de cada variable morfométrica contra la longitud del cefalotórax (LC), la cual fue considerada como un estimador del tamaño del individuo. El dimorfismo sexual fue también explorado mediante un análisis de componente principales (PCA, por sus siglas en inglés).

Las diferencias poblacionales se evaluaron por medio de un análisis de componentes principales, modificado para comparar la forma del cuerpo. Este análisis denominado SPCA (por sus siglas en inglés de Sheared Principal Component Analysis; Bookstein *et al.*, 1985) fue realizados dos veces; uno para comparar machos y otro para comparar hembras de ambas localidades. El SPCA se basa en un algoritmo que restringe la variación de la talla al primer componente de tal manera que los componentes subsecuentes son asociados con la forma del cuerpo (Bookstein *et al.*, 1985). Por tal motivo las diferencias poblacionales fueron ilustradas graficando el segundo y tercer componente obtenidos del SPCA. La significancia de las diferencias observadas se probó mediante un ANOVA. El SPCA fue realizado aplicando la rutina SHEAR-PCA (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>). El resto de los análisis fueron realizados usando el programa Statistica 5.5 (Statsoft, Inc.).

## Análisis genético

### *Extracción de ADN*

Las muestras de tejido muscular de las langostas fueron utilizadas para extraer el ADN total. La extracción se realizó digiriendo el tejido con proteinasa (pK) durante 18 horas a 37°C. Posteriormente se realizaron lavados con fenol-alcohol-isoamílico y cloroformo. Finalmente el ADN obtenido fue resuspendido en 100 µl de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.6) y almacenado a 4 °C para su posterior análisis.

### *Amplificación y secuenciación*

Se amplificaron dos regiones del ADNmt. Una integrada por una porción del 12S y de la región control (12S-RC) y otra por un fragmento del 16S. En todos los casos, la reacción de la amplificación usando un termociclador iclycler termal cycling Bio-rad se realizó en un volumen total de 50 µl (INVITROGENE PCR buffer 1X, 0.2 mM de dNTP mix, 0.48 µM de cada iniciador, 4.0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1.25 U polimerasa Taq INVITROGENE).

Previo a la amplificación de la región 12S-RC se probaron dos pares de iniciadores en individuos representativos de las distintas localidades de muestreo. Uno de los pares consistió en los iniciadores reportados por Weider *et al.* (1996): tRNA<sup>met</sup> (5'-GGGCATGAACCCACTAGCTT) y srRNA (5'-CAGGGTATCTAATCCTGGTT), los cuales fueron empleados debido a que ya habían sido previamente utilizados en la langosta roja (ver capítulo 1). El programa del termociclador (consistió de 40 ciclos, cada uno de los cuales integrado por una desnaturalización de 1 min a 95°C, un alineamiento de 1 min a

45°C, y una extensión de 1.5 min a 72°C. Una vez concluidos los 40 ciclos, se realizó una extensión final de 7 min a 72°C. El otro par de iniciadores que se probó (LanespRC\_F: 5'-TTCAGTGGGCCTTCAAGTCT y LanespRC\_R: 5'-TGGTGTGATCCCGTTACTTG) consistió de oligonucleótidos diseñados a partir de una secuencia de langosta roja (ver capítulo 1). Las condiciones del termociclador consistieron de una desnaturalización inicial de 2 min a 94°C, seguida de 35 ciclos compuestos por una desnaturalización de 1 min a 94°C, un alineamiento de 1 min a 68°C, y una extensión de 2 min a 72°C. Después de los 35 ciclos se realizó una extensión final de 4 min a 72°C. Una última amplificación fue realizada combinando los primer srRNA (Weider *et al.*, 1996) y LanespRC\_R. Las condiciones de esta amplificación fueron similares a las de la amplificación realizada con los primers LanespRC\_F y LanespRC\_R excepto que el alineamiento se realizó a 58°C.

Los productos de las amplificaciones fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 1%. Posteriormente fueron revelados con Sybrgold y visualizados mediante un transiluminador de luz blanca Dark Reader. En todos los casos el tamaño esperado del fragmento fue confirmado a partir de un marcador molecular de tamaño conocido.

Las amplificaciones realizadas con estas tres combinaciones de primers fueron exitosas en varias muestras, sin embargo en algunos casos también se amplificaron otros fragmentos no deseados cuando se utilizó la combinación: tRNA<sup>met</sup> - srRNA y LanespRC\_F-LanespRC\_R. Las amplificaciones obtenidas cuando se combinaron los iniciadores srRNA y LanespRC\_R resultaron ser la más adecuada, por lo que todas las muestras se amplificaron utilizando este par de iniciadores.

Las amplificaciones obtenidas con los iniciadores srRNA y LanespRC\_R fueron purificadas y secuenciadas en ambos sentidos (Macrogen, Inc., Corea). Sin embargo solo fue posible obtener secuencias limpias con el primer srRNA. La dificultad por obtener secuencias adecuadas utilizando el primer LanespRC\_R fue quizá debido a su inespecificidad, no notada en un principio en el gel de agarosa, pero sí durante la secuenciación. Con las secuencias obtenidas se diseñó un nuevo iniciador (PinRC1\_b: 5'-GATGGCCCATTACCGAACTA) y fue utilizado junto con el iniciador srRNA para amplificar y secuenciar las muestras que con los iniciadores srRNA y LanespRC\_R fallaron. Las concentraciones y las condiciones para esta última amplificación fueron similares a las anteriores excepto que la temperatura de alineamiento fue de 63°C.

El fragmento correspondiente al gen del 16S fue amplificado utilizando los iniciador reportados por Palumbi *et al.* (1991): 16Sar-L y 16Sbr-H. Las condiciones de la amplificación consistieron de una desnaturalización inicial de 2 min a 94°C, seguida de 30 ciclos compuestos por una desnaturalización de 1 min a 94°C, un alineamiento de 1 min a 60°C, y una extensión de 2 min a 72°C. Se realizó una extensión final de 4 min a 72°C.

#### *Análisis de datos genéticos*

Las secuencias obtenidas fueron revisadas y arregladas en el programa Sequencher Ver 4.5 (GeneCode, Inc.). Este programa permite hacer alineamiento múltiple de tal manera que fue posible revisar cada secuencia y compararla al mismo tiempo con el resto de ellas. Para disminuir la variabilidad genética de la región 12S-RC (datos no mostrados) y comparar las poblaciones bajo niveles de variabilidad genética diferente, esta región fue dividida en dos

fragmentos: presumiblemente el 12S y la región control. La asignación del sitio final de uno y del inicio del otro fue obtenida de su alineamiento con la región 12S-región control de *P. japonicus* (acceso al GENBANK con número NC\_004251) Todos los análisis subsecuentes fueron realizados considerando tres fragmentos (región control, 12S y 16S).

Las secuencias correspondientes a cada gen fueron alineadas usando MEGA ver. 3.0 (Kumar *et al.*, 2004), el cual utiliza el algoritmo del Clustal\_W (Higgins *et al.*, 1994). Posteriormente fueron incorporadas al programa DNAs (Rozas *et al.*, 2003) para obtener los haplotipos únicos. Con el programa DNAs fueron también generados los archivos posteriormente utilizados para los siguientes análisis.

Para cada fragmento del ADNmt se estimó la diversidad haplotípica ( $h$ ) y nucleotídica ( $\pi$ ) dentro de cada población utilizando el programa Arlequin (Schneider *et al.*, 2000). Se realizó un árbol filogeográfico del vecino mas cercano (Neighbor-Joining) utilizando como grupo externo la langosta *Panulirus japonicus*. Esta especie fue elegida debido a que no se encontraron reportadas otras secuencias del mismo fragmento para especies del género. Se adicionó un grupo externo (*P. laevicauda*) al filograma del gen 16S, para el cual existe un gran número de secuencias publicadas, pero se eligió *P. laevicauda* debido a que es una de las especies más cercanamente relacionadas con la langosta azul (Ptacek *et al.*, 2001). Los árboles filogeográficos fueron generados usando MEGA ver. 3.0 (Kumar *et al.*, 2004). Con las frecuencias de los haplotipos se realizó una prueba de Chi-cuadrada basada en 1000 simulaciones de Monte Carlo usando el programa REAP Ver. 4 (McElroy *et al.*, 1991). Esto permitió revisar si los haplotipos se encontraban distribuidos homogéneamente entre las cinco localidades estudiadas. Finalmente se realizó un Análisis Molecular de Varianza

(AMOVA) para determinar qué tanto de la variación genética era producida por diferencias dentro de las poblaciones y qué tanto era producida por diferencias entre las poblaciones. Debido a que no se encontró un patrón filogeográfico claro, el AMOVA fue realizado considerando las cinco localidades como un solo grupo. Los valores de  $\Phi_{st}$ , (análogos a  $F_{st}$ ) fueron estimados para todos los posibles pares de localidades. Tanto el AMOVA como la estimación de los valores de  $\Phi_{st}$  fueron realizadas usando el Arlequín (Schneider *et al.*, 2000).

## Resultados

### Análisis morfométrico

La talla de las langostas varió de 55.7 mm a 108 mm de longitud del cefalotórax (LC). Los individuos colectados en la Península de Baja California fueron significativamente mas grandes que los colectados en las costas el continente ( $F=166.19$ ,  $p<0.05$ ) con una media de 88.7 mm y 71.9 mm de LC respectivamente (Fig. 6). El ANCOVA mostró diferencias en algunas medidas, indicando diferentes patrones de crecimiento entre hembras y machos (Tabla 6). El PCA indicó también dimorfismo sexual en cada localidad (Fig. 7). El primer componente principal explicó el 94.7% de la variación registrada en las costas del continente y el 87.2% de la variación registrada en la península. Este componente fue interpretado para ambas áreas como representante de la talla del caparazón (los “scores” estuvieron significativamente correlacionados con la LC:  $r= 0.98$ ,  $p< 0.05$ , para la

península, y  $r = 0.99$ ,  $p < 0.05$  para el continente). Los “scores” son los valores de los componentes principales estimados para cada unidad experimental en el conjunto de datos. En ambas regiones geográficas (principalmente en la península) los “scores” del segundo componente mostraron una sobreposición mayor cuando los “scores” del primer componente fueron menores (Fig. 7). Esto puede sugerir que las diferencias entre machos y hembras vienen a ser más evidentes en individuos grandes. Las diferencias encontradas en el tamaño de los especímenes y el dimorfismo sexual presente, soportaron el análisis separando hembras y machos y la corrección del efecto de la talla para la comparación de las dos regiones.

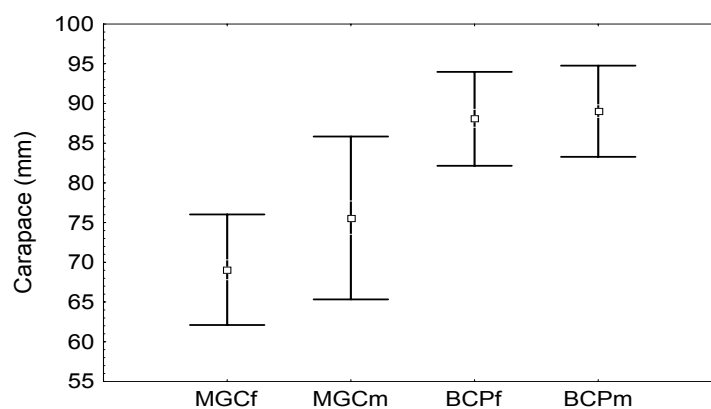


Fig. 6. Longitud media del cefalotórax de hembras y machos de las costas del continente y de la península. MGCf= hembras de las costas del continente, MGCm= machos de las costas del continente, BCPf= hembras de la península, BCPm= machos de la península.

Tabla 6. Resultados del ANCOVA mostrando las medidas morfométricas que fueron significativamente diferentes entre machos y hembras.

Medidas	Continente		Península	
	ANCOVA	TP	ANCOVA	TP
1	0.0003*	0.4815	0.5765	0.2951
2	0.0627	0.5827	0.0160*	0.1892
3	0.5802	0.2205	0.5794	0.1316
4	0.0344*	0.4390	0.5491	0.3917
5	0.0004*	0.9426	-	< 0.0001*
6	0.1546	0.3872	0.8585	0.4816
7	0.0038*	0.2614	0.5481	0.4011
8	-	0.0270*	< 0.0001*	0.2269
9	0.5930	0.3499	0.9516	0.2318
10	0.0225*	0.2673	0.0003*	0.8710
11	0.2562	0.2342	0.6847	0.8466
12	0.7223	0.1995	0.0592	0.5180
13	0.0007*	0.2278	0.0555	0.6521
14	-	0.0019*	0.5160	0.3098
15	0.7255	0.8591	0.1893	0.7922
16	0.0428*	0.1996	0.0002*	0.0582
17	-	0.0383*	0.1331	0.8630

\* Diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre machos y hembras, TP prueba de paralelismo.

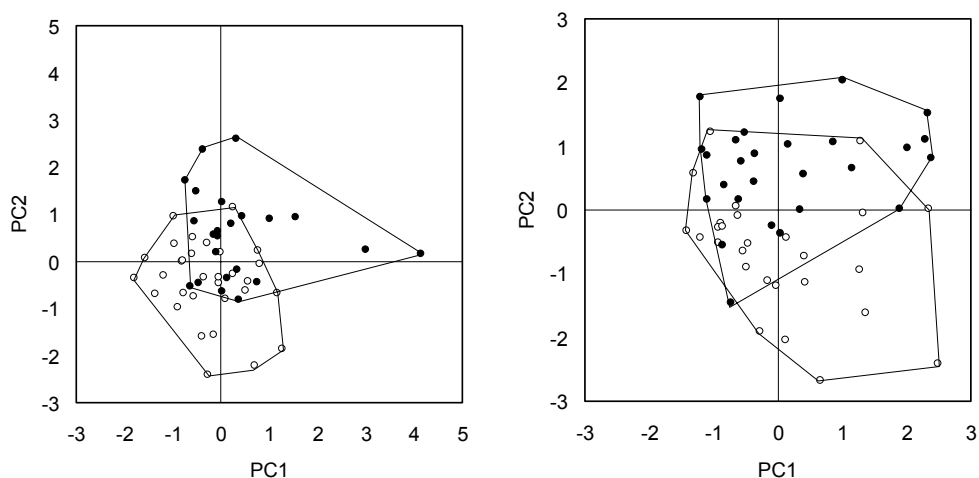


Fig. 7. Análisis de Componentes Principales mostrando los "scores" producidos por los dos primeros componentes en las costas del continente (izquierda) y en la Península de Baja California (derecha). Círculos negros = machos, círculos blancos = hembras.



El SPCA aplicado a los machos arrojó una alta sobreposición (porcentaje de “scores” sobre el mismo eje que se encuentra en ambas regiones geográficas) de los “scores” obtenidos tanto del SPC2 (83%) como del SPC3 (sobreposición total) (Fig. 8). Los valores obtenidos a partir del SPC2 fueron significativamente diferentes ( $F=33.55$ ,  $p<0.05$ ). En la hembras, los “scores” también mostraron una alta sobreposición entre las localidades (completa sobreposición a partir del SPC2 y 58.6% de los “scores” estimados a partir del SPC3). Los “scores” del SPC3 indicaron diferencias significativas entre las hembras de ambas regiones geográficas ( $F=42.80$ ,  $p<0.05$ ). Los resultados anteriores indican diferencias entre los valores encontrados entre las dos regiones; sin embargo, la alta sobreposición de las variables morfométricas no soporta de manera robusta la idea de que las langostas vengan de dos poblaciones aisladas. Lo único que muestran los valores obtenidos del SPC2 y SPC3 es que pueden ser indicativos de morfologías muy parecidas o diferencias muy sutiles.

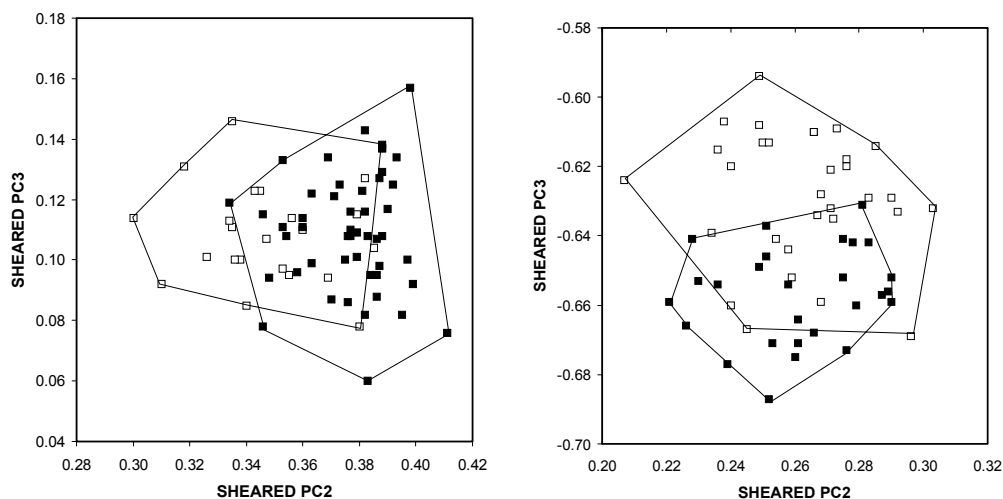


Fig. 8. Analisis SPC indicando los “scores” producidos por el segundo y tercer componente en machos (izquierda) y en hembras (derecha). Cuadros negros= Península de Baja California, cuadros blancos = Costas del continental.

## Análisis genético

### *Diversidad genética*

Se obtuvieron 113 secuencias del fragmento del gen del 16S (543 pb) y 112 tanto de la porción del 12S (325 pb) como de la región control (338 pb). En algunos casos no fue posible obtener del mismo espécimen los tres fragmentos. De las 113 muestras utilizadas para amplificar el 16S, en 72 de ellas fue posible amplificar también la región 12-RC.

Los indicadores de variabilidad genética mostraron que el fragmento más variable fue la región control y que el menos variable fue el 16S. El número de haplotipos encontrado para la región control, el 12S y el 16S fue de 81, 40 y 33, respectivamente. Los valores de diversidad haplotípica y diversidad nucleotídica fueron también mayores en la región control y menores en el 16S (Fig. 9). Los tres fragmentos arrojaron valores significativamente diferentes ( $F=23.05$ ,  $P<0.05$ ) para la diversidad haplotípica y ( $F=97.77$ ,  $P<0.05$ ) para la diversidad nucleotídica. Estas diferencias indican que el análisis poblacional de la langosta azul realizado en este estudio se fundamenta en la revisión de regiones del ADNmt con niveles de variabilidad genética diferentes.

Los valores de diversidad haplotípica y de diversidad nucleotídica fueron en general altos y similares en las cinco localidades (Tabla 7).

Tabla 7. Diversidad genética de langota azul estimada a partir de la región control, 12S y 16S en cinco localidades. BCS= Baja California Sur.

	Localidad	<i>n</i>	No. de haplotipos	Diversidad haplotípica	Diversidad nucleotídica
Región control	BCS	20	18	0.9895 +/- 0.0193	0.025703 +/- 0.013845
	Sinaloa	19	19	1.0000 +/- 0.0171	0.028018 +/- 0.015044
	Nayarit	22	18	0.9567 +/- 0.0367	0.019223 +/- 0.010552
	Jalisco	29	26	0.9926 +/- 0.0111	0.022292 +/- 0.011934
	Guerrero	22	20	0.9913 +/- 0.0165	0.024117 +/- 0.012979
12S	BCS	20	17	0.9789 +/- 0.0245	0.011972 +/- 0.007005
	Sinaloa	19	13	0.9415 +/- 0.0375	0.012129 +/- 0.007105
	Nayarit	22	9	0.8442 +/- 0.0606	0.007081 +/- 0.004501
	Jalisco	29	19	0.8867 +/- 0.0560	0.009140 +/- 0.005477
	Guerrero	22	13	0.8918 +/- 0.0550	0.008911 +/- 0.005427
16S	BCS	24	10	0.8043 +/- 0.0702	0.003663 +/- 0.002388
	Sinaloa	18	9	0.8627 +/- 0.0609	0.004153 +/- 0.002678
	Nayarit	26	15	0.8554 +/- 0.0666	0.004590 +/- 0.002850
	Jalisco	16	8	0.8417 +/- 0.0748	0.003745 +/- 0.002485
	Guerrero	29	14	0.8251 +/- 0.0679	0.003792 +/- 0.002435

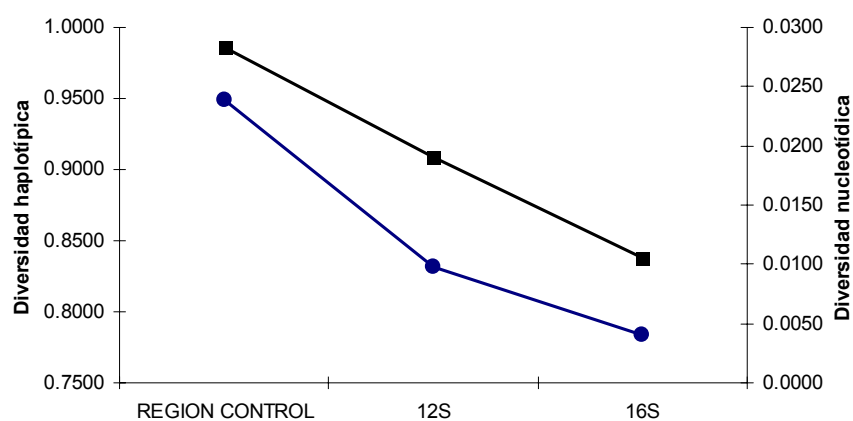


Fig 9. Valores promedio de la diversidad genética encontrada a partir de los tres fragmentos analizados del ADNmt de la langota azul. Las curvas indicadas con símbolo cuadrados y redondo representan la diversidad haplotípica y la diversidad nucleotídica respectivamente.

### *Filogeografía y subdivisión poblacional*

Los análisis filogeográficos basados en los árboles del vecino más cercano no revelaron clados evidentes que estuvieran asociados a alguna región geográfica particular (Figs. 10, 11 y 12). Esto se observa también en las frecuencias de los haplotipos producidos a partir de cada uno de los tres fragmentos, las cuales no indicaron en ningún caso una distribución heterogénea de los haplotipos en las cinco localidades de acuerdo con las pruebas de Chi-cuadrada basadas en la simulación de Monte Carlo que se realizó en el programa REAP ( $X^2=316.06$ ,  $P=0.787$ , para la región control;  $X^2=154.48$ ,  $P=0.570$ , para el 12S;  $X^2=120.02$ ,  $P=0.816$ , para el 16S). Con el fin de reducir el efecto de la variabilidad durante la comparación, se exploró un análisis de RFLPs virtual. Este consistió en digerir virtualmente (utilizando el programa ChromasPro ver. 1.33) las 112 secuencias obtenidas de la región 12S–región control utilizando cinco enzimas de restricción (*EcoRI*, *HpaI*, *SspI*, *TfiI* y *TspRI*). El total de haplotipos encontrado con este análisis fue nueve y la prueba de Chi-cuadrada mediante simulación de Monte Carlo tampoco indicó una distribución heterogénea de los haplotipos ( $X^2=29.35$ ,  $P=0.673$ ).

Los resultados encontrados a partir del AMOVA arrojaron porcentajes de variación explicada por diferencias poblacionales extremadamente bajos, los cuales no fueron significativamente diferentes de cero ( $\Phi_{st} = -0.0027$ ,  $P=0.555$ , para la región control,  $\Phi_{st} = -0.0011$ ,  $P=0.466$  para el 12S;  $\Phi_{st} = -0.00834$ ,  $P=0.759$ ). De acuerdo con lo anterior toda la variancia fue estadísticamente atribuible a la variación dentro de las poblaciones. Con ninguno de los tres fragmentos las comparaciones pareadas mostraron diferencias significativas (Tabla 8).

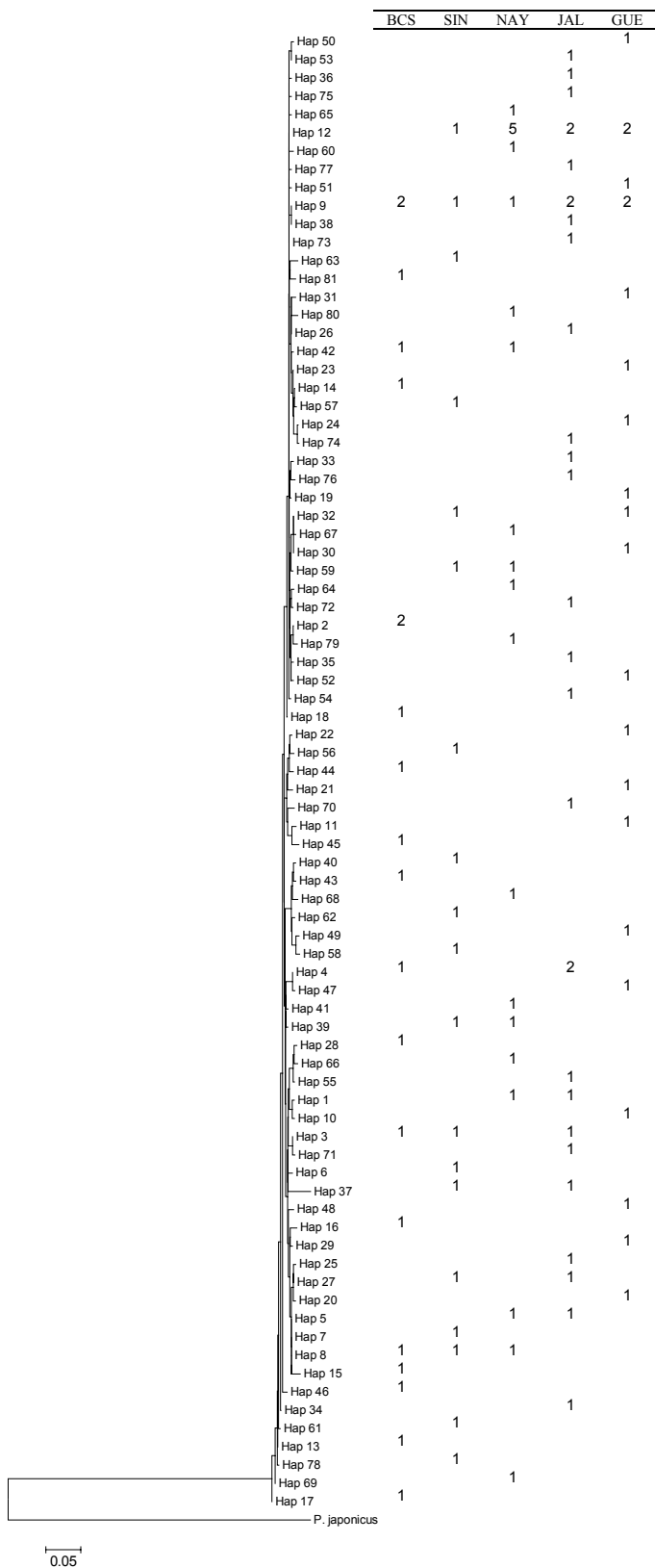


Fig. 10. Arbol del vecino más cercano generado a partir de los 81 haplotipos de la región control. La tabla adjunta contiene las frecuencias observadas de cada uno de los haplotipos en las localidades. BCS= Baja California Sur, SIN= Sinaloa, NAY=Nayarit, JAL= Jalisco, GUE=Guerrero.

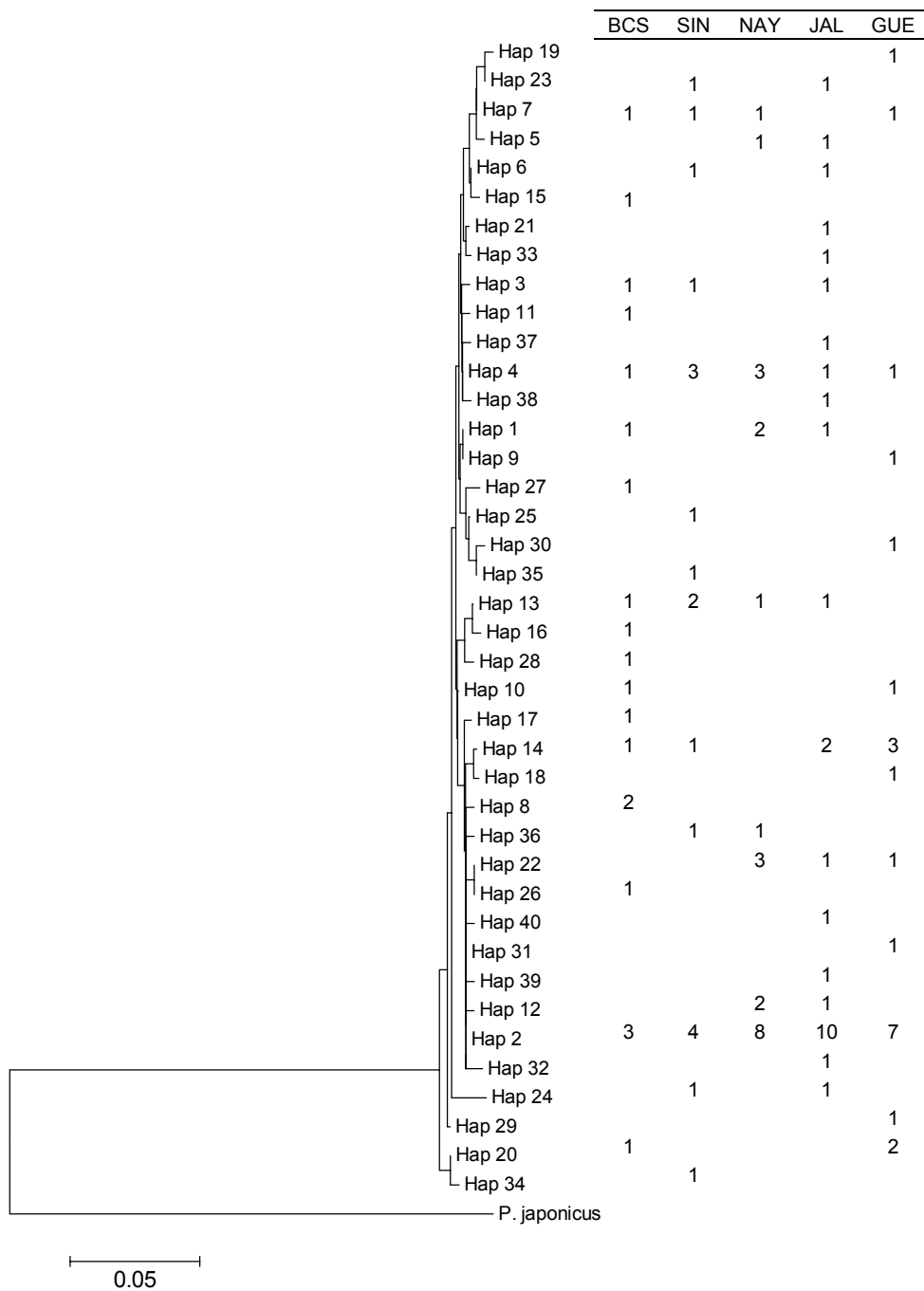


Fig. 11. Arbol del vecino más cercano generado a partir de los 40 haplotipos del 12S. La tabla adjunta contiene las frecuencias observadas de cada uno de los haplotipos en las localidades. BCS= Baja California Sur, SIN= Sinaloa, NAY=Nayarit, JAL= Jalisco, GUE=Guerrero.

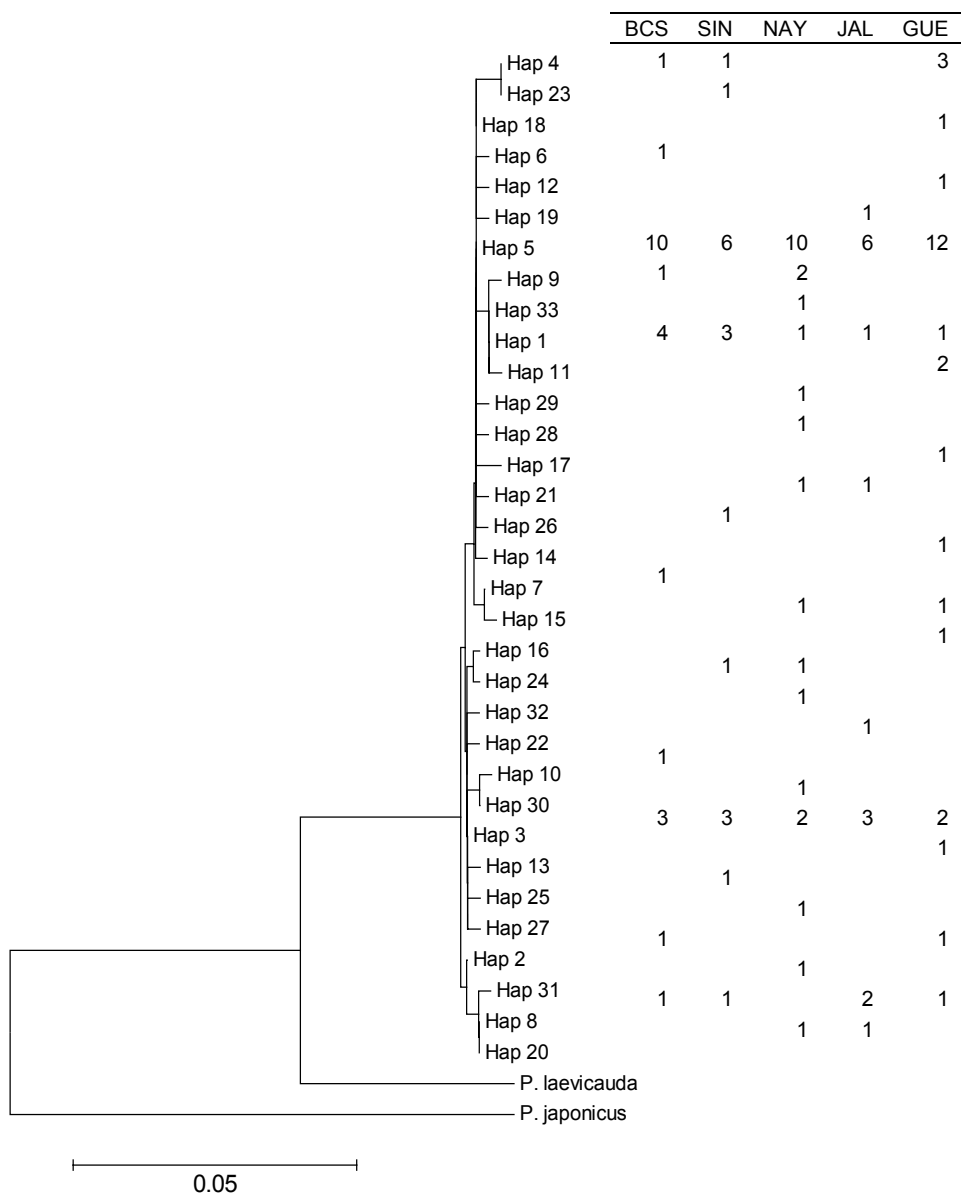


Fig. 12. Arbol del vecino más cercano generado a partir de los 33 haplotipos del 16S. La tabla adjunta contiene las frecuencias observadas de cada uno de los haplotipos en las localidades. BCS= Baja California Sur, SIN= Sinaloa, NAY=Nayarit, JAL= Jalisco, GUE=Guerrero.

Tabla. 8. Valores  $\Phi_{st}$  (abajo) y valores correspondientes de  $P$  (arriba) de la langosta azul correspondientes a los tres fragmentos del ADNmt revisado. BCS= Baja California Sur.

	Localidades	BCS	Sinaloa	Nayarit	Jalisco	Guerrero
<b>REGIÓN</b>						
CONTROL	BCS	-	0.9580	0.4727	0.4180	0.3809
	Sinaloa	-0.0243	-	0.1650	0.1543	0.1211
	Nayarit	-0.0049	0.0180	-	0.9063	0.8535
	Jalisco	-0.0015	0.0168	-0.0178	-	0.9248
	Guerrero	0.0019	0.0206	-0.0169	-0.0179	-
12S	BCS	-	0.8936	0.3447	0.4824	0.2881
	Sinaloa	-0.0253	-	0.0781	0.2090	0.2197
	Nayarit	0.0026	0.0346	-	0.9541	0.4590
	Jalisco	-0.0037	0.0128	-0.0251	-	0.9209
	Guerrero	0.0084	0.0160	-0.0033	-0.0194	-
16S	BCS	-	0.9297	0.9307	0.1856	0.6592
	Sinaloa	-0.0294	-	0.8486	0.3223	0.8565
	Nayarit	-0.0224	-0.0198	-	0.5859	0.4756
	Jalisco	0.0227	0.0036	-0.0112	-	0.1572
	Guerrero	-0.0114	-0.0210	-0.0025	0.0220	-

## Discusión

Los niveles de variabilidad genética a lo largo del ADNmt fueron altos en la langosta azul. Esto puede observarse de las diferencias encontradas en el número de haplotipos y en las diversidades genéticas de los fragmentos analizados. La región control fue el fragmento más variable y el 16S el menos variable. La región control no es una región codificante de la molécula de ADNmt, y es conocida como la región del ADNmt que mas rápido evoluciona (Heyer *et al.*, 2001). Debido a su alta variabilidad es comúnmente utilizada en la detección de diferencias genéticas entre poblaciones. Los otros dos fragmentos del ADNmt analizados (12S y 16S) fueron menos variables, sobre todo el fragmento del 16S. Este gen ha sido comúnmente utilizado en estudios filogenéticos debido a que en general es



un fragmento relativamente conservado que permite comparar linajes evolutivos a nivel de especie (Ovenden *et al.*, 1997, Ptacek *et al.*, 2001). A pesar de las diferencias en los niveles de diversidad genética encontrados entre los tres fragmentos revisados, tanto el 12S como el 16S presentaron valores de diversidad genética altos (número de haplotipos, diversidad haplotípica y diversidad nucleotídica), lo cual sugiere que la langosta azul mantiene una elevada variabilidad. La alta variabilidad genética encontrada en esta especie puede ser consecuencia de un tamaño poblacional considerable, lo cual permite incrementar un mayor número de variantes alélicas. Una causa de la alta variabilidad encontrada en otros crustáceos ha sido sugerida como resultado de una elevada tasa de mutación (Palumbi y Benzoe, 1991).

Los resultados encontrados del análisis morfométrico indicaron diferencias entre individuos de la península e individuos de La costa continental. Las diferencias encontradas en las tallas entre ambas localidades puede ser el resultado de causas ambientales y/o factores asociados a las actividades pesqueras. Los factores ambientales que podrían influir son la temperatura y la disponibilidad de alimento. Una mayor temperatura puede inducir en la ocurrencia de langostas pequeñas sexualmente maduras (Harding *et al.*, 1993) en las costas del continente. La presencia de tallas menores puede también ser el reflejo de incumplimientos de las regulaciones pesqueras por parte de los pescadores (Pérez-González *et al.* (2002). En contraste, la presencia de tallas relativamente grandes en PBC podría ser debido a la gran disponibilidad de alimento. Es conveniente recalcar que en el sur de la costa oeste de la Península de Baja California existe una alta productividad (Lluch-Belda *et al.*, 2000), la cual ha sido aprovechada por numerosas especies, algunas de ellas integrantes

de pesquerías importantes como la de la langosta roja *P. interruptus*, langosta verde *P. gracilis* (Vega *et al.*, 1996) y la de la sardina Monterrey *Sardinops sagax* (Rodríguez-Sánchez *et al.*, 1996).

Las comparaciones morfométricas realizadas por una parte entre machos y por otra entre hembras indicaron la presencia de morfologías ligeramente diferentes entre los individuos de la Península de Baja California y los individuos de las costas del continente. Sin embargo, las comparaciones de los tres fragmentos del ADNmt indicaron la ausencia de una diferenciación genética evidente entre las cinco localidades. Las diferencias encontradas en la morfología del cefalotórax podrían ser consecuencia principalmente de una plasticidad fenotípica como respuesta adaptativa a condiciones locales entre las dos regiones comparadas y las similitudes genéticas presentes entre las poblaciones podrían sugerir principalmente la existencia de un elevado flujo genético a lo largo del Pacífico mexicano. La diversidad genética en los tres niveles de variabilidad revisados fue relativamente similar en las cinco localidades y los parámetros genéticos evaluados a nivel poblacional no fueron suficientemente diferentes como para sugerir la existencia de poblaciones discretas.

Aunque no existen niveles de divergencia asociados con niveles taxonómicos, puede ser útil tomar como referencia las divergencias encontradas en otros grupos biológicos que han sido estudiados bajo procedimientos parecidos para comparar los resultados de los patrones filogeográficos encontrados en la langosta azul. Existen algunos estudios sobre genética poblacional de langostas basados en el análisis parcial o total del ADNmt, pero la mayoría utiliza sitios de la molécula o procedimientos diferentes (Silberman *et al.*, 1994a y 1994b;

Sarver *et al.*, 1998; Ovenden y Brasher 1994; Triantafyllidis *et al.*, 2005). Sarver *et al.*, (1998) compararon muestras de la langosta *P. argus* provenientes del Caribe con muestras colectadas en Brasil utilizando la misma secuencia parcial del 16S utilizada en este trabajo. Sus resultados muestran claramente la existencia de dos grupos poblacionales completamente separados, los cuales han sido considerados como subespecies (*P. a. argus* en el Caribe y *P. a. westonii* en Brasil). Sarver *et al.* (1998) asoció el aislamiento genético a las condiciones oceanográficas (baja salinidad y alta turbidez) presentes en la costa, las cuales son influidas por las descargas del Río Orinoco que funcionan como una barrera geográfica e impiden la dispersión larval y el asentamiento de postlarvas. La langosta azul no presentó diferencias en ninguna de las regiones mitocondriales analizadas. Los niveles de agrupamiento filogeográfico basados en la región del 16S (Fig. 10, 11 y 12) no fueron evidentes y mucho menos al nivel en el que fueron separados los dos grupos de langosta del Caribe. Un mayor número de muestras quizá podría haber sido necesario para el análisis de la región control. Sin embargo para el 16S consideramos que el tamaño de la muestra fue adecuado, sobre todo considerando el tamaño de muestra analizado en otros trabajos (Sarver *et al.*, 1998, Sarver *et al.*, 2000). Los resultados encontrados en este estudio parecen obedecer a un alto flujo genético a lo largo del área de distribución estudiada de la langosta azul, el cual podría principalmente ser consecuencia de dos aspectos principales: las condiciones oceanográficas que se desarrollan en el Pacífico oriental mexicano y el extenso período larval de esta especie.

Similar a este estudio, otros trabajos sobre diferenciación poblacional basados en análisis de alozimas en la langosta de Hawai *Panulirus marginatus* (Shaklee y Samollow, 1984), la

langosta de las Bermudas *P. argus* (Hateley y Sleeter, 1993) y la langosta de Australia *P. cygnus*, (Thompson *et al.*, 1996) tampoco encontraron una estructuración poblacional evidente. Los autores sugieren como causantes del flujo genético el extenso período larval y los patrones favorecidos por la circulación marina.

Los esquemas de circulación oceánica en el Pacífico mexicano muestran una oceanografía física compleja. Una reciente revisión realizada por Kessler (en prensa), en la cual retoma la información recabada en estudios previos (ej. Wyrki, 1967) e incorpora nuevos datos, muestra la presencia de diferentes corrientes marinas y sus variaciones estacionales (Kessler, en prensa). Una de las más importantes es la Corriente de California, la cual fluye a lo largo de la Península de Baja California y gradualmente se desvía hacia el oeste para alimentar la Corriente Norecuatorial. La intensidad de su influencia sobre la circulación marina en el Sur varía en función de la estación del año. De enero a junio, principalmente en primavera, la Corriente de California continua su flujo hasta los 13°N y 105°W aproximadamente y gira hacia el oeste para ejercer una gran influencia sobre la Corriente Norecuatorial. De julio a diciembre la Corriente de California se debilita y su influencia sobre la Corriente Norecuatorial disminuye (Wirtki, 1967, Badan, 1997, Keesler, en prensa). De acuerdo con Keesler (en prensa) durante este período, otra corriente se intensifica; una corriente denominada Corriente del Oeste de México que se desplaza a lo largo de la costa hacia el norte, desde el Golfo de Tehuantepec hasta Cabo Corrientes, aproximadamente a 20° N. A diferencia de la Corriente de California, la Corriente del Oeste de México incrementa su velocidad principalmente de junio a octubre cuando se piensa que transporta mas agua tropical al Golfo de California. La Corriente de California y

la Corriente del Oeste de México se ven influidas, aunque de manera contraria, por la ausencia o presencia de El Niño. En su ausencia la corriente de California se incrementa y ejerce una mayor influencia sobre los trópicos, pero en presencia de El Niño se debilita y la Corriente del Oeste de México incrementa su flujo hacia el Norte (Keesler, en prensa). Estos procesos oceanográficos que varían temporalmente deben ser importantes en la deriva larval y podrían explicar parcialmente la homogeneización genética de la población de langosta azul a lo largo de área de distribución. Johnson (1974) encontró larvas de *P. gracilis* (cuya distribución es similar a la de la langosta azul) al oeste de las islas Galápagos, lo cual muestra una fuerte influencia de las corrientes sobre la dispersión y la distribución de estas especies.

Contrariamente, se ha observado que el camarón blanco es una especie que conforma poblaciones discretas en el Pacífico mexicano. Valles-Jiménez *et al.* (2004) sugieren que las condiciones locales oceánicas (como la presencia de una zona llamada “Alberca de Agua Cálida”, Trasviña *et al.*, 1999), y la duración del período larval (dos semanas antes de entrar a las lagunas costeras), son aparentemente responsables de la diferenciación genética. Estas no son condiciones que afecten de manera similar a las poblaciones de langosta azul. A pesar de que los patrones de circulación oceánica conectan diferentes áreas marinas, en el Pacífico oriental mexicano existen varios ejemplos que muestran por una parte ausencia y por otra presencia de diferenciación genética para áreas comunes. Bernardi *et al.* (2003), por ejemplo, encuentran dos patrones filogeográficos para 12 especies de peces distribuidos en el Golfo de California y en la costa oeste de la Península de Baja California. Ocho de estas especies presentaron poblaciones discretas (patrón 1) y cuatro mantuvieron un alto

flujo genético como para ser consideradas como panmícticas (patrón 2). Procesos de dispersión larval, eventos de vicariancia y factores ecológicos son retomados para explicar dichos hallazgos.

Los resultados encontrados en la langosta azul no sugieren la presencia de una estructura poblacional. Una característica ecológica importante que debe estar implicada en esta falta de estructura poblacional puede ser su extenso período larval. El ciclo biológico de las langostas espinosas incluye una etapa larvaria denominada filosoma que permanece a la deriva de 6 a 11 meses (Johnson, 1960). A diferencia de la langosta roja, la langosta azul (y la langosta verde) presentan desoves parciales a lo largo del año (Briones *et al.*, 1981; Pérez-González *et al.*, 1992b). En el sureste del Golfo de California los desoves más importantes se presentan de marzo a noviembre (Pérez-González *et al.*, 1992b) tiempo en el cual la Corriente de California y la Corriente del Oeste de México se expanden y se retraen.

## Discusión general

El presente documento aporta los resultados de la investigación realizada sobre la estructura poblacional de la langosta roja y de la langosta azul en México. Este trabajo representa uno de los primeros esfuerzos por comprender mejor el grado de relación de las poblaciones de langostas a partir de análisis moleculares basados en el ADNmt y técnicas de morfometría tradicional. A partir de la información encontrada también ha sido posible plantear hipótesis de trabajo y emitir recomendaciones sobre investigaciones futuras para el mejor manejo de estas pesquerías.

Los tres fragmentos del ADNmt analizados en la langosta azul indicaron valores altos de variabilidad genética. Los valores de diversidad genética en la langosta roja también fueron altos. Algunos estudios sobre langostas (Silberman *et al.*, 1994, Ovenden y Brasher, 1994, Triantafyllidis *et al.*, 2005) y sobre otros crustáceos decápodos (Benzie *et al.*, 2002; McMillen-Jackson y Bert, 2004) basados en ADNmt muestran valores de diversidad similares o menores a los encontrados en este trabajo. Desafortunadamente estos valores no pueden ser directamente comparados debido a que las estimaciones no fueron basadas bajo el mismo procedimiento. Los resultados encontrados a partir de la langosta azul muestran las discrepancias que pueden ser generadas al utilizar metodologías diferentes. El número de haplotipos encontrados a partir del análisis de la secuencia 12S-RC (datos no mostrados en los resultados) fue de 86, mientras que el mismo fragmento digerido virtualmente usando cinco enzimas produjo solo nueve haplotipos. En el caso de los RFLPs, los valores de diversidad pueden variar dependiendo del número y del tipo de enzima implicado en el

análisis. Y tanto en los RFLPs como en la secuencias, las medidas de diversidad se ven afectadas por el tamaño del fragmento y de manera importante por la región del genoma mitocondrial estudiada ya que pueden existir tasas de mutación diferentes a lo largo de la molécula del ADNmt (Heyer *et al.*, 2001). Los resultados encontrados a partir del análisis de las secuencias de la langosta azul mostraron diferencias significativas en las medidas de diversidad entre los fragmentos revisados. La figura 13 ilustra que la relación que se obtiene entre la diversidad haplotípica y la diversidad nucleotídica no es la misma a lo largo del genoma mitocondrial, lo cual implica que dos poblaciones aun teniendo diversidades haplotípicas similares, pueden mostrar diversidades nucleotídicas diferentes si los análisis son basados en regiones mitocondriales distintas.

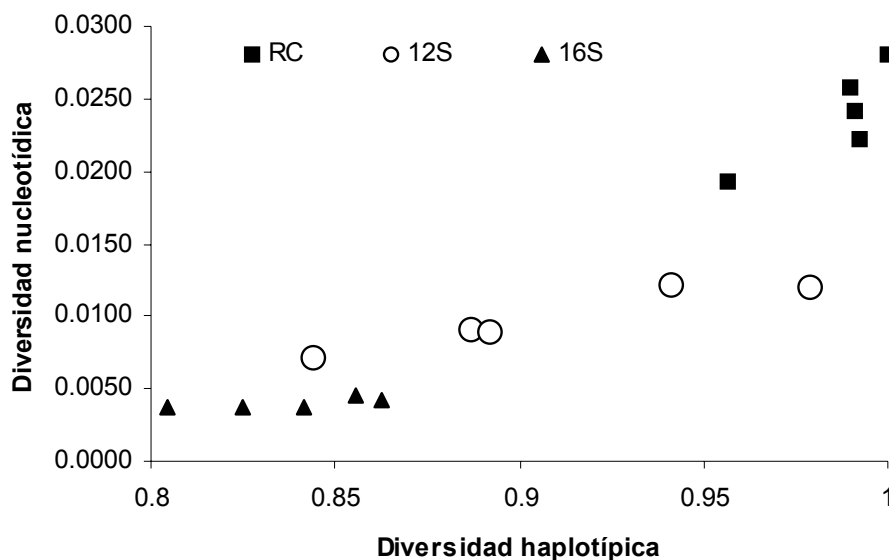


Fig. 13. Relación entre la diversidad haplotípica y diversidad nucleotídica en los tres fragmentos del ADN mitocondrial revisados de la langosta azul.



La langosta roja presentó 65 haplotipos y la langosta azul nueve (de acuerdo con los RFLPs virtuales realizado sobre la región 12S-RC). Considerando que el análisis virtual de RFLPs fue basado en: a) la mitad de las secuencias utilizadas en la roja, b) la mitad del número de especímenes y c) una enzima de restricción menos que las utilizadas con la langosta roja, la variabilidad genética de ambas especies podría ser similar. La alta variabilidad genética puede ser el reflejo de un tamaño efectivo de la poblacional considerablemente grande (Nei, 1987) lo cual es consistente con el potencial pesquero que tienen las poblaciones de langosta espinosas distribuidas en el Pacífico mexicano (Vega *et al.*, 1996). Un elevado intercambio genético que permita la mezcla de variantes alélicas podrá también explicar los altos valores de variabilidad. Los resultados encontrados en este trabajo también soportan el considerable flujo genético vía transporte larval. Los altos valores de diversidad también han sido atribuidos a elevadas tasas de evolución molecular en ciertos grupos taxonómicos (Palumbi y Benzie, 1991) y a eventos demográficos asociados a una gran población estable con una larga historia evolutiva.

La langosta roja y la langosta azul no presentaron poblaciones genéticamente estructuradas a lo largo del área de estudio. En ambas especies los procesos combinados de la dinámica marina que se desarrolla en el Pacífico mexicano y el extenso período larval juegan aparentemente un papel importante en la homogeneización de las poblaciones.

En el Pacífico mexicano se desarrolla un sistema de corrientes marinas que se intensifica o se debilitan de acuerdo con la estación del año y de acuerdo con eventos anuales como El Niño o La Niña (Durazo y Baumgartner, 2002). La Corriente de California es una de las corrientes más importantes que se desarrolla en el Pacífico mexicano. Esta corriente se

desplaza hacia el sur y dependiendo de la temporada del año puede alcanzar latitudes muy bajas a partir de donde alimenta la corriente Norecuatorial. Otra corriente importante que se desarrolla en las costas de México, es la Corriente del Oeste de Mexico, la cual acarrea agua tropical hacia el Golfo de California (Keesler, en prensa). Las langostas espinosas se encuentran sujetas a la deriva larval durante un extenso período de tiempo, en el que la dispersión larval puede ocurrir a grandes distancias como ha sido notado por Johnson (1974).

A nivel local, las corrientes marinas aparentemente ejercen una influencia considerable sobre la distribución de las langostas; sin embargo éstas no parecen ser lo suficientemente fuertes como para propiciar procesos de divergencia genética entre las poblaciones. Los trabajos realizados en la costa oeste de la Península de Baja California muestran eventos oceanográficos locales que afectan la dispersión larval (Johnson, 1971; Heweit, 1981) Entre estos eventos se encuentran la Corriente de California, procesos de surgencia, la Corriente de Davidson y giros semipermanentes a la altura de Punta Eugenia (en la parte media de la península) que Pringle (1986) señala como importantes para la retención larval. Estas observaciones y los resultados obtenidos sobre las temporadas de reproducción, las tallas de madurez y los volúmenes de captura permitieron regionalizar la pesquería de la langosta roja en la costa oeste de la Península (Vega *et al.*, 1996). También permitieron sugerir la presencia de poblaciones genéticamente aisladas. Con el fin de evaluar esta posibilidad Pérez-Enríquez *et al.* (2001) realizaron un estudio de diferenciación poblacional basado en análisis de alozimas. Sus resultados indicaron diferencias principalmente en los loci *EST-4* y *LAP* entre los pares de las poblaciones de Ensenada, Punta Eugenia, Punta

Abreojos, San Juanico y Bahía Magdalena (excepto Ensenada-Bahía Magdalena y Punta Eugenia-Punta Abreojos). Estas diferencias fueron atribuidas a una restricción en el flujo genético o a un evento denominado por Hedgecock (1994) como “Chaos patchiness”, el cual se origina por el muestreo de un grupo de individuos exitosos en algún momento o espacio, que no reflejan precisamente las variantes genéticas de la población. Las diferencias también fueron atribuidas a fuerzas de selección actuando de manera diferencial sobre ciertos loci (Pérez-Enríquez *et al.*, 2001). Los resultados obtenidos a partir del análisis del ADNmt mostraron poca diferenciación genética a lo largo de la costa de la Península y soportan una de las ideas propuestas por Pérez-Enríquez (2001) en el sentido de que los resultados obtenidos mediante alozimas pueden interpretarse como producto de presiones selectivas locales actuando de forma diferente sobre las frecuencias aloenzimáticas. Factores ambientales tales como la temperatura o la salinidad pueden afectar fuertemente la heterocigosidad de ciertos loci (Watt, 1977, Koehn *et al.*, 1980, Nelson y Hedgecock, 1980; Nissen *et al.*, 2005).

Las condiciones locales parecen también afectar las diferencias en la morfología de las langostas; sin embargo éstas no fueron lo suficientemente grandes como para soportar la idea de la presencia de poblaciones aisladas reproductivamente. Los análisis genéticos apoyan el planteamiento de que la langosta azul se encuentra conformada por una sola población cuyos procesos de dispersión larval son lo suficientemente adecuados como para mantener un alto flujo genético maternal a lo largo del área de distribución. Factores ambientales como la temperatura y la disponibilidad de alimento podrían en principio

propiciar diferencias fenotípicas (morfológicas, conductuales y fisiológicas) en crustáceos (Harding *et al.*, 1993; Devey, 1960).

Si bien eventos de aislamientos reproductivos no parecen estar presentes al interior de cada una de las especies de langostas estudiadas en este trabajo, éstos podrían existir si los procesos de divergencia fueran relativamente recientes como para poder ser detectados mediante análisis mitocondriales. A este nivel, esta idea no puede ser reconocida, pero podría ser planteada y revisada en un futuro mediante otros marcadores moleculares nucleares como los microsatélites. Los marcadores moleculares tipo microsatélites, son secuencias cortas que se repiten en tandem y que se localizan en el ADN nuclear (Goldstein y Schlötterer, 1999). Estos son ampliamente usados en genética de poblaciones debido a que reflejan diferencias poblacionales que resultan en parte de eventos de recombinación, lo cual permite observar procesos de divergencia relativamente recientes. Ha sido documentado que existe una correlación positiva entre la tasa de recombinación y el nivel de polimorfismo (Moriyama y Powell, 1996). Actualmente no hay un solo trabajo sobre genética poblacional en langostas del género *Panulirus* que haya implementado análisis con microsatélites. Por tal motivo y debido al bajo nivel de diferenciación y estructuración genética observada en langostas, nuevas investigaciones deberán abordar esta herramienta que permitirán profundizar en el estudio de regiones geográficas previamente estudiadas mediante ADNmt e iniciar estudio sobre genética poblacional en áreas aun no investigadas.

## Planteamiento de nuevas hipótesis y recomendaciones generales en la investigación de langosta espinosas en el Pacífico oriental

1. Hipótesis: Las similitudes genéticas encontradas entre las localidades de langosta roja son causa aparentemente de los procesos de circulación oceánica y del extenso período larval. Existen poblaciones de langosta roja en el Golfo de California las cuales podrían presentar un grado de aislamiento reproductivo considerable respecto a las poblaciones del Pacífico. Recomendación: Realizar estudios con el fin de determinar diferencias genéticas entre poblaciones extremas considerando en primera instancia poblaciones del Pacífico (Ensenada) y poblaciones dentro del golfo (Bahía de Los Angeles).
2. Hipótesis: Los resultados encontrados con la langosta azul sugieren que la langosta verde, cuyo ámbito geográfico se encuentra expuesto a las mismas condiciones oceanográficas y cuyas estrategias de reproducción son relativamente similares, podría presentar niveles de no estructuración genética parecidos. Recomendación: Realizar estudio sobre genética poblacional de la langosta verde con el fin de aportar información que soporte los programas de manejo y que permita comprender mejor las causas históricas de la presencia de ambas especies en México. Debido a que la Corriente Costera de Costa Rica puede ejercer una fuerte influencia en la distribución y retención de larvas al sur del Pacífico mexicano, la comparación de poblaciones de langosta verde debe considerar especímenes provenientes de Sudamérica.

3. Hipótesis: La ausencia de una estructura genética no representa estrictamente la existencia de un flujo genético continuo en todas direcciones. Los procesos de oceanográficos podrían mantener con mayor intensidad el flujo larval hacia una dirección lo cual implicaría que el origen larval podría estar ubicado en un sitio diferente al sitio de asentamiento de postlarvas. Recomendación: Realizar análisis basados en el seguimiento temporal de la estructura genética de poblaciones de larvas.
4. Hipótesis: La langosta roja y la langosta azul podrían estar conformadas por poblaciones aisladas y no ser detectadas mediante ADNmt si los tiempos de divergencias fueran relativamente recientes: Recomendación: Realizar estudios sobre genética de poblaciones utilizando marcadores nucleares tipo microsatélites.

## Consideraciones de manejo

Los resultados encontrados en este trabajo sugieren que tanto la langosta roja como la langosta azul representan cada una de ellas una población con alto flujo genético; cuyas características fenotípicas pueden variar a lo largo de su área de distribución. Este planteamiento manifiesta la importancia de implementar estrategias de manejo adecuadas a partir de esfuerzos coordinados. La detección de un elevado flujo genético a lo largo del área de distribución sugiere que una inadecuada administración en cierta área geográfica podría alterar las características genéticas poblacionales en localidades distantes; por ejemplo, las actividades pesqueras y el tipo de manejo implementado en Jalisco podría

influir en las condiciones de salud de las poblaciones de Baja California o Guerrero, y viceversa. Es recomendable realizar estudios que permitan determinar los parámetros poblacionales a mayor profundidad lo largo del área de distribución de esta especie. Las estimaciones de estos parámetros soportarán un apropiado aprovechamiento del recurso en función de las características biológicas encontradas de manera local.

Esfuerzos notorios han sido realizados en la administración pesquera de la langosta roja. La implementación de acciones de manejo (asignación de zonas de captura, tallas mínimas de captura por zona, vedas zonificadas, otorgamiento de concesiones por zona) características locales (Vega *et al.*, 1996) han mostrado ser medidas eficientes. A la par, el cumplimiento de la legislación es un factor fundamental para el mejor desempeño de la pesquería. Esto puede reflejarse en la reciente certificación otorgada a la pesquería de langosta roja que se desarrolla en la parte central de la Península de Baja California (Marine Stewardship Council, Documento No. SCS.BCL.FB.04270).

## Conclusiones

- La langosta roja y la langosta azul mostraron altos valores de variabilidad genética a lo largo del Pacífico mexicano. Esta puede ser el reflejo de un elevado tamaño efectivo de la población.
- Con base en los análisis de ADNmt las poblaciones de langosta de roja y de langosta azul no mostraron evidencias de una estructura poblacional clara como para reconocer que al interior de cada una de ellas existen poblaciones aisladas reproductivamente.
- Los factores ambientales y biológicos que permiten explicar la ausencia de divergencia a nivel poblacional son los procesos de circulación oceánica y el extenso período larval que presentan las langostas.
- Las diferencias morfológicas encontradas en la langosta azul pueden ser el reflejo de variaciones ambientales que inciden a nivel local sobre la plasticidad fenotípica. Los factores ambientales también podrían explicar las diferencias encontradas en las frecuencias de los loci aloenzimáticos en la langosta roja .
- Aunque de manera incipiente los procesos de circulación local podrían estar influyendo en propiciar diferencias genéticas en *P. interruptus*. Las langostas provenientes de Bahía Magdalena arrojaron valores ligeramente distintos al resto de las poblaciones. Marcadores moleculares con mayor resolución en la detección de



procesos de divergencias recientes (ej. microsátélites) deberían ser aplicados en nuevas investigaciones.

## Literatura citada

- Allendorf, F.W. y W. Seeb .2000. Concordance of genetic divergence among sockeye salmon populations at allozyme, nuclear DNA, and mitochondrial DNA markers. *Evolution* 54(2):640–651.
- Allen, B.M. 1916. Notes on the spiny lobster (*Panulirus interruptus*) of the California coast. *Univ. Calif. Publ. Zool.* 16(12):139-152.
- Andrade, P.M.L. 1991. Sinopsis evolutiva de la pesquería de la langosta roja (*Panulirus interruptus* Randall, 1840) en el litoral Pacífico de la Península de Baja California, y su relación con los mecanismos regulatorios. Documento interno. Federación Reg. Soc. Coop. Ind. Pesquera “Baja California”, F.C.L. 31 pp.
- Austin, H.M., D. Scoles y A.J. Abell. 1998. Morphometric separation of annual cohorts within mid-Atlantic bluefish, *Pomatomus saltatrix*, using discriminant function analysis. *Fish. Bull.*, 97:411-420.
- Ayala, M.Y. 1983. Madurez sexual y aspectos reproductivos de la langosta roja *Panulirus interruptus* (Randall 1840) en la costa oeste central de la península de Baja California, México. Secretaría de Pesca/INP. *Ciencia Pesquera* 4:33–48.
- Badan, A. 1997. La Corriente Costera de Costa Rica en el Pacífico mexicano. *In*: M.L. Lavin (ed) *Contribuciones a la oceanografía física de México*. Monografía No. 3, Unión Geofísica Mexicana, pp 99–112.

- Barker, J.S.F., S.S. Moore, D.J.S. Hetsel, D. Evans, S.G. Tan, y K.. Byrne. 1997. Genetic diversity of Asian water buffalo (*Bubalus bubalis*): Microsatellite variation and a comparison with protein-coding loci. *Anim Genet* 28:103–115.
- Benzie, J.A.H., E. Ballment, A.T. Forbes, N.T. Demetriades, K. Sugama, Haryanti y S. Moria. 2002. Mitochondrial DNA variation in Indo-Pacific populations of the giant tigre prawn, *Penaeus monodon*. *Molecular Ecology*, 11: 2553-2569.
- Bernardi, G., L. Findley y A. Rocha-Olivares. 2003. Vicariance and dispersal across Baja California in disjunct marine fish populations. *Evolution*, 57(7): 1599-1609.
- Bookstein, F.L., B. Chernoff, R.L. Elder, J.M. Humphries, G.R. Smith, R. Strauss. 1985. *Morphometrics in evolutionary biology*. Special Publication No. 15. The Academy of Natural Sciences of Philadelphia.
- Brasher, D.J. J.R. Ovenden y R.W.G. 1992. Mitochondrial DNA variation and phylogenetic relationships of *Jassus* spp. (Decapode: Palinuridae). *Journal of Zoology London*, 227:1-16.
- Briones, P. y E. Lozano. 1992. Aspects of the reproduction of *Panulirus infatus* (Bouvier) and *P. gracilis* Strets (Decapoda: Palinuridae) from the Pacific coast of Mexico. *J Crust Biol* 12:41-50.
- Briones, P., E. Lozano, A. Martínez-Guerrero y A. S. Cortés. 1981. Aspectos generales de la biología y pesca de las langostas en Zihuatanejo, Gro., México (Crustacea: Palinuridae). *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología*. UNAM, 8(1): 79-101.
- Cadrin, S. 1995. Discrimination of American lobster (*Homarus americanus*) stocks off southern New England on the basis of secondary sex character allometry. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52:2712-2723.

- Campbell, A., y R.K. Mohn. 1983. Definition of American lobster stocks for the Canadian Maritimes by analysis of fishery-landing trends. *Trans. Am. Fish. Soc.* 112:744-759.
- Castro, M., P. Gancho y P. Henriques. 1998. Comparison of several population of Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (Linneo 1758), from the Mediterranean and adjacent Atlantic: a biometrics study. *Sci. Mar.* 62:71-79.
- Clark, F.N. 1947. Analysis of population of the Pacific sardine on the basis of vertebral counts. *Fish Bull* 65:1–26.
- Comeau, M. y F. Savoie. 2002. Movement of American lobster (*Homarus americanus*) in the southewastern Gulf of St. Lawrence. *Fish Bull* 100:181–102.
- Cope, J.M. 2004. Population genetics and phylogeography of the blue rockfish (*Sebastes mystinus*) from Washington to California. *Can J Fish Aquat Sci* 61:332–342.
- Corti, M., R. Thorpe, S. Sola, L. Sbordoni, V. Cataudella. 1981. Multivariate morphometrics in aquaculture: a case study of six stocks of the common carp (*Cyprinus carpio*) from Italy. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45:1548-1554.
- Creech, S. 1992. A multivariate morphometric investigation of *Atherina boyeri* Risso, 1810 and *A. presbyter* Cuvier, 1829 (Teleostei: Atherinidae): morphometric evidence in support of the two species. *J. Fish. Biol.* 41: 341-353.
- Debuse, V.J., J.T. Addison y J.D. Reynodls. 2001. Morphometric variability in UK population of the European lobster. *J. Mar. Biol. Ass. U.K,* 81: 369-479.
- Deevey, G.B. 1960. Relative effects of temperature and food on seasonal variations in length of marine copepods in some American and western European water. *Bull. Bingham Ocean Col Pap* 17:55-86

- Doadrio I, J. Carmona, C. Fernández-Delgado. 2002. Morphometric study of the Iberian *Aphanis* (Actinopterygii, Cyprinodontiformes), with description of a new species. *Folia Zool*, 51(1): 67-79.
- Durazo, R. y T.R. Baumgartner. 2002. Evolution of oceanographic conditions off Baja California: 1997–1999. *Prog Oceanog* 54:7– 31.
- Eisenhour, D. 1997. Distribution and systematics of *Notropis wickliffi* (Cypriniformes: Cyprinidae) in Illinois. *Transactions of the Illinois State Academy of Science* 90 (1 and 2): 65-78.
- Elliot, N.G., K. Haskard, J.A. Koslow. 1995. Morphometrics analysis of orange roughy (*Hoplostethus atlanticus*) off continental slope of southern Australia. *J. Fish. Biol.* 46: 202-220.
- Excoffier, L., P.E. Smouse y J.M. Quattro. 1992. Analyses of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131(2):479–491.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz y R. Vriejenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3(5):294–299.
- García-Machado, E., A. Robainas, G. Espinosa, M. Oliva, J. Páez, N. Verdecia y M. Monnerot. 2001. Allozyme and mitochondrial DNA variation in Cuban populations of the shrimp *Farfantepenaeus notialis* (Crustacea: Decapoda). *Mar Biol* 138:701–707.
- George, R.W. 1997. Tectonic plate movements and the evolution of *Jasus* and *Panulirus* spiny lobster (Palinuridae). *Mar. Freshwater REs.* 48: 1121-1130
- George, R.W. y A.R. Main. 1967. The evolution of spiny lobster (Palinuridae): a study of evolution in the marine environment. *Evolution*, 21: 803-820.

- Goldstein, D.B. y C. Schlötterer. 1999. *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press.
- Guzmán del Prío, S.A., L.L. Carreón-Paula, J. Belmar-Pérez, J. Carrillo-Laguna y R. Herrera-Fragoso. 2003. Effects of the “El Niño” event on the recruitment of the benthic invertebrates in Bahía Tortugas, Baja California Sur. *Geofis Int* 42(3):429–438.
- Harding, G., E. Kenchington, C.J. Bird, D.S. Pezack y D.C. Landry. 1997. Genetic relationships among subpopulations of the American lobster (*Homarus americanus*) as revealed by random amplified polymorphic DNA. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54:1762–1771
- Harding, G., E. Kenchington, Z. Zheng .1993. Morphometrics of American lobster (*Homarus americanus*) larvae in relation to stock determinations in the Maritimes, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50:43-52.
- Hateley, J.G. y T.D. Sleeter. 1993. A biochemical genetic investigation of spiny lobster (*Panulirus argus*) stock replenishment in Bermuda. *Bull Mar Sci* 52(3):993–1006.
- Hedgecock, D. 1994. Temporal and spatial genetic structure of marine animal populations in the California Current. *CalCOFI Rep* 35:73–81.
- Hendrickx, M.E. 1995. Langostas (Langostas espinosas, bogavantes, cigarras y zapateras, langostas de lodo, etc.). *In*: Fisher W., F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K.E. Carpenter, V.H. Niem (eds). *Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico Centro-Oriental vol I. Plantas e invertebrados*. F.A.O. Roma, pp 385–415.
- Hewitt, R. 1981. Eddies and speciation in the California Current. *CalCOFI Rep*, vol XXII.
- Heyer, E., E. Zietkiewicz, A. Rochowski, V. Yotova, J. Puymirat y D. Labuda. 2001. Phylogenetic and familial estimates of mitochondrial substitution rates: study of

- control region mutations in deep-rooting pedigrees. *American Journal of Human Genetics*, 69: 1113-1126.
- Higgins D., Thompson J., Gibson T. Thompson J. D., Higgins D. G. y Gibson T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.
- Hubbs, C. 1960. The marine vertebrate of the outer coast. Symp: the biogeography of Baja California and adjacent seas. *Syst Zool* 4:134–147.
- Johnson, M.W. 1960. The offshore drift of larvae of the California spiny lobster *Panulirus interruptus*. *CalCOFI Rep* 7:147–161.
- Johnson, M.W. 1971. The palinurid and scyllarid lobster larvae of the tropical eastern Pacific and their distribution as related to the prevailing hidrography. *Bull. Scripps Inst. Oceanogr.* 19: 1-36
- Johnson, M.W. 1974. On the dispersal of larvae into the east Pacific barrier (Decapoda, Palinuridae). *Fish. Bull.* 72:639-647.
- Karl, S. y Avise J.C. 1992. Balancing selection at allozyme loci in oyster: implications from nuclear RFLPs. *Science* 256:100–102.
- Kessler, W.S. En prensa. The circulation of the eastern tropical Pacific: A review. *Prog.Oceanogr.*
- Koehn, R.K., R.I.E. Newell y F.W. Immerman. 1980. Maintenance of an aminopeptidase allele frequency cline by natural selection. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:5385–5389
- Krause, M.K., W.S. Arnold, W.G. Ambrose Jr. 1994. Morphological and genetic variation among three population of calico scallops, *Argopecten gibbus*. *Journal of Shellfish Research*, 13 (2): 529-537.

- Kumar S, K. Tamura, I.B. Jakobsen y M. Nei. 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. Arizona State University, Tempe.
- Kumar, S., K. Tamura y M. Nei. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163.
- Lluch-Belda, D. 2000. Centros de actividad biológica en la costa occidental de Baja California. *In*: D. Llich-Belda, J. Elorduy-Garay, S.E. Lluch-Cota, G. Ponce-Diaz (eds). BAC Centros de Actividad Biológica del Pacífico mexicana. Centro Investigaciones Biológicas del Noroeste, SC, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Consejo de Ciencia y Tecnología, México, pp 49-64.
- Lourie, S.A., J.C. Pritchard, S.P. Casey, S.K. Truong, H.J. Hall, A.C.J. Vincent. 1996. The taxonomy of Vietnam's exploited seahorses (family Syngnathidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 66: 231-256.
- McElroy, D., P. Moran, E. Bermingham y I. Kornfield. 1991. The restriction enzymes analysis package Ver. 4. Department of Zoology Migratory Fish Research Institute and Center for Marines Studies, University of Maine, Orono, Maine.
- McWilliam, P.S. 1995. Evolution in the phyllosoma and puerulus phases of the spiny lobster genus *Panulirus* White. *Journal of Crustacean Biology* 15, 542-557.
- McMillen-Jackson, A.L. y T.M. Bert. 2004. Genetic diversity in the mtDNA control region and population structure in the pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum*. *J Crustacean Biol* 24(1): 101–109.
- Moriyama, E.N. y J.R. Powell. 1996. Intraspecific nuclear DNA variation in *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution*, 13: 261-277.
- Muñoz-García, I., R. Pérez-González, L.M. Flores-Campaña y M.I. Borrego. 1998. Patrones de distribución y abundancia de larvas filosomas de *Panulirus* spp.

- (Decapada: Palinuridae) en el sur de Sinaloa (1989-1992). Proceeding of third workshop of the spiny lobster of América, México-Cuba '97.
- Muñoz-García, I., R. Pérez-González, L.M. Flores-Campaña y M.I. Borrego. 2000. Distribución y abundancia de filorosmas de *Panulirus* (Decapada: Palinuridae) en el sureste del Golfo de California, México. *Rev. Biol. Trop.*, 48(1): 159-167.
- Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nei, M. y F. Tajima. 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics* 97:145–163.
- Nei, M. y W.H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Nat Acad Sci* 76:5269–5273.
- Nelson, K. y D. Hedgecock. 1980. Enzyme polymorphism and adaptive strategy in the decapod Crustacea. *Am Nat* 116:238– 280.
- Nissen, L.R., P. Bjerregaard y V. Simonsen. 2005. Interindividual variability in metal status in the shore crab *Carcinus maenas*: the role of physiological condition and genetic variation. *Mar Biol* 146(3): 571–580.
- Ovenden, J.R. y D.J. Brasher. 1994. Stock identity of the red (*Jasus edwardsii*) and green (*J. verreauxi*) rock lobster inferred from mitochondrial DNA analysis. *In*: Phillips BF, Cobb JS, Kittaka J (eds) *Spiny lobster management*. Fishing News Books, pp 230–249.
- Ovenden, J.R., J.D. Booth y A.J. Smolenski. 1997. Mitochondrial DNA phylogeny of red and green rock lobster (genus *Jasus*). *Mar. Freshwater Res.* 48: 1131–1136.
- Ovende, J.R., D,J, Brasher y R.W.G. White 1992. White. Mitochondrial DNA analysis of the red rock lobster *Jasus edwardsii* supports an apparent absence of population subdivisión throughout Australasia. *Marine Biology*, 112: 319-326.



- Palumbi, S.R. y J. Benzoe. 1991. Large mitochondrial DNA differences between morphologically similar Penaeid shrimp. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1(1):27-34.
- Palumbi, S.R., A. Martin, S. Romano, W.O. McMillan, L. Stice, and G. Grabowski. 1991. A simple fool's guide to PCR, ver. 2.0. Special publication of the University of Hawaii Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory, 46 p. Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory, Univ. Hawaii, Honolulu, HI 96822.
- Pérez-Enríquez, R. y N. Taniguchi. 1999. Genetic structure of red sea bream (*Pagrus major*) population off Japan and the Southwest Pacific, using microsatellite DNA marker. *Fish Sci* 1:23–30.
- Pérez-Enríquez, R., A. Vega, S. Avila y J.L. Sandoval. 2001. Population genetics of red spiny lobster (*Panulirus interruptus*) along the Baja California Peninsula, Mexico. *Mar Fresh Res* 52:1541–1549.
- Pérez-González, R., L.M. Flores-Campaña A. Núñez-Pasten. 1992a. Análisis de la distribución de tallas, captura y esfuerzo en la pesquería de las langostas *Panulirus inflatus* (Bouvier, 1985) y *P. gracilis* Streets, 1871 (Decapoda: Palinuridae) en las costas de Sinaloa, México. *Proc San Diego Soc Natural Hist* 15:1-5.
- Pérez-González, R., I. Muñoz, L.M. Valadez y M.L. Borrego. 2002. The current status of the fishery for spiny lobsters *Panulirus inflatus* and *P. gracilis* (Decapoda: Palinuridae) along the Mexican Pacific coast. *In: Hendrickx ME (ed) Contributions to the Study of East Pacific Crustaceans. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM.* 250p.
- Pérez-González, R., L.M. Flores-Campaña, A. Núñez-Pasten y A. Ortega-Salas. 1992b. Algunos aspectos de la reproducción en *Panulirus inflatus* (Bouvier) y *P. gracilis* Streets (Decapoda: Palinuridae) en el sureste del Golfo California, México. *Inv Mar CICIMAR* 7: 25-33.

- Pogson, G.H., K.A. Mesa y R.G. Boutilier. 1995. Genetic population structure and gene flow in the Atlantic cod, *Gadus morhua*: a comparison of allozyme and nuclear RFLP loci. *Genetics* 139:375–385.
- Poteaux, C., P. Berrebi y F. Bonhomme. 2001. Allozymes, mtDNA and microsatellites study introgression in a stocked trout population in France. *Rev Fish Biol Fish* 10:281–292.
- Pringle, J.D. 1986. California spiny lobster (*Panulirus interruptus*) larval retention and recruitment: A review and synthesis. *Can J Fish Aquat Sci* 43:2142–2152.
- Ptacek, M.B., S.K. Sarver, M.J. Childress y W. F. Herrnkind. 2001. Molecular phylogeny of the spiny lobster genus *Panulirus* (Decapoda: Palinuridae). *Mar Fresh Res* 52:1037–1047.
- Rice, W.R. 1989. Analyzing tables of statistic tests. *Evolution* 42:223–225.
- Rodríguez-Sánchez, R., S. Hernández-Vázquez, D. Lluch-Belda, R. Félix-Uraga, S. Ortega-García, J. Villa-Arce, G. Ponce-Díaz, D. Lluch-Cota. 1996. Pesquerías de pelágicos menores (sardinas y anchovetas) *In*: M. Casas-Valdez, G. Ponce-Díaz (eds). Estudio del Potencial Pesquero y Acuícola de Baja California Sur. CICIMAR, La Paz, BCS, Mexico, pp 317-350.
- Roff, D.A. y P. Bentzen. 1989. The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms:  $X^2$  and the problem of small samples. *Mol Biol Evol* 6(5):539–545.
- Rozas, J., J.C. Sánchez-DelBarrio, X. Messeguer y R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19: 2496- 2497.
- Rozen, S. y H. Skaletsky. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *In*: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.

- Sarver, S.K., D.W. Freshwater y P.J. Walsh. 2000. The occurrence of the provisional Brazilian subspecies of spiny lobster (*Panulirus argus westonii*) in Florida waters. Fish. Bull. 98:870-873.
- Sarver, S.K., J.D. Silberman y P.J. Walsh. 1998. Mitochondrial DNA sequence evidence supporting the recognition of two subspecies or species of the Florida spiny lobster *Panulirus argus*. J Crust Biol 18(1):177–186.
- Schneider, S., D. Roessli y L. Excoffier. 2000. Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetic and Biometry Laboratory, University of Genova, Switzerland
- Scribner, K.T., J.W. Arntzen y T. Burke. 1994. Comparative analysis of intra- and interpopulation genetic diversity in *Bufo bufo*, using allozyme, single-locus microsatellite, minisatellite, and multilocus minisatellite data. Mol Biol Evol 11:737–748.
- Shaklee, J.B. y P.B. Samollow. 1984. Genetic variation and population structure in a spiny lobster, *Panulirus marginatus*, in the Hawaiian Archipelago. Fish. Bull. FAO 82:693–702.
- Silberman, J.D., S.K. Sarver y P.J. Walsh. 1994a. Mitochondrial DNA variation and population structure in the spiny lobster *Panulirus argus*. Mar Biol 120:601–608.
- Silberman, J.D., S.K. Sarver y P.J. Walsh. 1994b. Mitochondrial DNA Variation in seasonal cohorts of spiny lobster (*Panulirus argus*) postlarvae. Mol Mar Biol Biotechnol 3(3):165–170.
- Skillman, R.A. 1989. Stock identification and Billfish Management. Mar Rec Fish 13:207–214.
- Strauss, R.E. y F.L. Bookstein. 1982. The truss: body form reconstruction in morphometrics. Syst Zool 31: 113-135.

- Thompson, A.P., J.R. Hanley y M.S. Johnson. 1996. Genetic structure of western rock lobsters, *Panulirus cygnus*, with the benefit of hindsight. *Mar Fresh Res* 47:889–896.
- Trasviña, A., D. Lluch-Cota, A.E. Filonov y A. Gallegos. 1999. Oceanografía y El Niño. In: V.O.R. Magaña (ed). *Los impactos de El Niño en México*. UNAM, pp 69-101.
- Triantafyllidis, A., A.P. Apostolidis, V. Katsares, E. Kelly, J. Mercer, M. Hughes, K.E. Jørstad, A. Tsolou, R. Hynes y C. Triantaphyllidis. 2005. Mitochondrial DNA variation in the European lobster (*Homarus gammarus*) throughout the range. *Mar Biol* 146(2):223–235.
- Tzeng, T.D., C.S. Chiu, S.Y. y Yeh. 2001. Morphometric variation in red-spot prawn (*Metapenaeopsis barbata*) in different geographic water off Taiwan. *Fisheries Research* 53: 211-217.
- Valentine, J. 1966. Numerical analysis of marine molluscan ranges on the extratropical northeastern Pacific shelf. *Limn Oceanogr* 11:198–211.
- Valles-Jiménez, R., P. Cruz y R. Pérez-Enríquez. 2004. Population genetic structure of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from Mexico to Panama: Microsatellite DNA variation. *Marine Biotechnology*, 5: 475-484.
- Vega, V.A. 2003. Reproductive strategies of the spiny lobster *Panulirus interruptus* related to the marine environmental variability off central Baja California, México: management implications. *Fish Res* 65:123–135.
- Vega, V.A. y D.B. Lluch-Cota. 1992. Análisis de las fluctuaciones en la producción de langosta (*Panulirus* spp.), del litoral oeste de la Península de Baja California, en relación con el desarrollo histórico de la pesquería y la variabilidad del marco ambiental. Mem., Taller Inter. México-Australia sobre el reclutamiento de Recursos marinos Bentónicos de la Península de Baja California. IPN. ENCB-CICIMAR. IPN. La Paz, B.C.S., 25-29 de noviembre de 1991.

- Vega, V.A., G. Espinoza-Castro y C. Gómez-Rojo. 1996. Pesquería de la langosta *Panulirus* spp. In: Casas-Valdez, M. y G. Ponce-Diaz (eds) Estudio del Potencial Pesquero y Acuícola de Baja California Sur, pp 227–261.
- Vrooman, A. 1964. Serologically differentiation of subpopulations of the Pacific sardine, *Sardinops caeruleus*. J Fish Res Board Can 21(4):691–701.
- Watt, W.B. 1977. Adaptation at specific loci. Natural selection on phosphoglucose isomerase of *Colias* butterflies: biochemical and population aspect. Genetic 87:177–194.
- Weider, L.J., A. Hobaek, T.J. Crease y H. Stibor. 1996. Molecular characterization of clonal population structure and biogeography of arctic apomictic *Daphnia* from Greenland and Iceland. Mol Ecol 5: 107–118.
- Wilson, R.C. 1948. A review of the southern California spiny lobster fishery. Calif. Fish. And Game, 34(2).
- Wyrski, K. 1967. Circulation and water mass in the eastern equatorial Pacific Ocean. Int J Oceanol Limnol 1(2):117–147.