

00377



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA**

**“ DIFERENCIACIÓN GENÉTICA DEL CIRRIPEO  
PARÁSITO LOXOTHYLACUS TEXANUS EN EL  
GOLFO DE MÉXICO ”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE :  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
( SISTEMÁTICA )**

**PRESENTA:  
ALEJANDRO BOTELLO CAMACHO**

**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. FERNANDO ÁLVAREZ NOGUERA**

**MÉXICO, D.F.**



**ENERO , 2004**

**COORDINACIÓN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA



# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de octubre de 2003, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Sistemática) del alumno(a) Botello Camacho Alejandro, con número de cuenta 93388869, con la tesis titulada: "Diferenciación genética del cirripedo parásito *Loxothylacus texanus* en el Golfo de México", bajo la dirección del(a) Dr. Fernando Alvarez Noguera.

Presidente: Dr. Alberto Ken Oyama Nakagawa  
Vocal: Dra. Virginia León Régagnon  
Secretario: Dr. Fernando Alvarez Noguera  
Suplente: Dra. Guillermina Alcaraz Zubeldía  
Suplente: Dr. Luis Medrano González

" Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 16 de enero de 2004.

  
Dr. Juan José Morrone Lupi  
Coordinador del Programa

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Alejandro Botello

Camacho

FECHA: 29 enero 2004

FIRMA: 

c.c.p. Expediente del interesado

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por proporcionarme los medios para seguir creciendo académica y personalmente.

Al Posgrado en Ciencias Biológicas por darme la oportunidad de adquirir una formación de excelencia.

Al Instituto de Biología de la UNAM por acogerme y brindarme las herramientas para realizar este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme la beca gracias a la cual me pude dedicar de tiempo completo a este proyecto.

Al Dr. Fernando Álvarez Noguera por enseñarme con su ejemplo, guiarme con sus conocimientos y darme la libertad necesaria para crecer en mi carrera.

Al M. en C. José Luis Villalobos Hiriart por su apoyo y por permitirme aprender de su sabiduría y experiencia.

A la M. en C. Laura Márquez Valdelamar, encargada del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología de la UNAM y del secuenciador automático, por la asistencia prestada durante la amplificación y secuenciación del materia genético.

A los miembros del Comité Tutorial:

Dra. Virginia León Règagnon, por brindarme las facilidades para trabajar en el Laboratorio de Biología Molecular 3 del Instituto de Biología a su cargo, y por sus consejos siempre atinados.

Dra. Guillermina Alcaraz Zubeldía, por que sus cuestionamientos me motivaron a buscar respuestas alternativas.

A los miembros del Jurado, Dr. Alberto Ken Oyama Nakagawa y Dr. Luis Medrano González, que con sus comentarios enriquecieron este trabajo.

Por su ayuda en el campo agradezco a: M. en C. José Luis Villalobos Hiriart, Biól. Antonio Celis Villalba, M. en C. Horacio Vázquez, Biól. Rolando Mendoza y al Dr. Carlos Rosas Vázquez por su apoyo en Ciudad del Carmen, Campeche.

Al Dr. Jack O'Brien de la Universidad del Sur de Alabama por proporcionarme las muestras de *Loxothylacus texanus* de la Bahía Apalache, Florida.

A mis compañeros de la Colección Nacional de Crustáceos, que siempre me brindaron su ayuda e hicieron que cada día de trabajo fuera divertido.

A los jaiberos y pescadores de Tamiahua, Alvarado y Sontecomapan, Veracruz, Sánchez Magallanes, Tabasco y Atasta, Campeche.

## RESUMEN

Los balanos rizocéfalos son organismos altamente especializados al parasitismo de crustáceos, principalmente decápodos. Cuentan con un cuerpo dividido en una región interna y un saco llamado externa. *Loxothylacus texanus* es parásito de las jaibas *Callinectes rathbunae* y *C. sapidus* en la zona costera del Golfo de México. Con el propósito de estudiar la variación entre poblaciones de *L. texanus*, se analizó el gen ITS1 que forma parte del DNA ribosomal, y es una región altamente variable. *Loxothylacus texanus* presenta larvas de tipo lecitotrófico y su ciclo de vida se lleva a cabo dentro de los sistemas estuarinos, por lo que se esperaría un alto grado de diferenciación genética entre las poblaciones. El objetivo de este trabajo fue estimar las diferencias a nivel genético de diferentes poblaciones de *L. texanus* en el Golfo de México. Se capturaron jaibas parasitadas de las lagunas de Tamiahua, Alvarado y Sontecomapan, Veracruz; El Carmen, Tabasco; Atasta, Campeche; y Apalache, Florida y se obtuvo la secuencia del gen ITS1 para calcular la variación inter e intrapoblacional, así como un análisis filogenético de los tipos de secuencias encontrados. La variación dentro de cada población fue de 0 nucleótidos, y entre las poblaciones fue de 0 a 4 inserciones/delecciones. Además se encontró una secuencia divergente del ITS1 en organismos de Alvarado. No existe relación entre diferencia genética en el ITS1 y distancia geográfica. El análisis sugiere que pudo existir en el pasado un polimorfismo en el ITS1 de *L. texanus* en el Golfo de México gracias al flujo génico. Se puede considerar también que las poblaciones de *L. texanus* pudieron haber pasado por un cuello de botella que redujo la diversidad en el ITS1. Este escenario permite suponer que la región ITS1 de *L. texanus* en las lagunas de Alvarado, Sontecomapan y El Carmen se encuentran en un proceso de diferenciación del resto de las poblaciones.

## ABSTRACT

Rhizocephalan barnacles are highly specialized organisms, parasites of other crustaceans, mainly decapods. Their body is divided into an internal region and an external sac named externa. In the coastal zone of the Gulf of Mexico *Loxothylacus texanus* parasitizes the crabs *Callinectes rathbunae* and *C. sapidus*. With the objective of studying the variation among populations of *L. texanus*, we analyzed the highly variable ITS1 region, that is part of the ribosomal DNA. *Loxothylacus texanus* presents lecithotrophic larvae and its entire life cycle takes place inside estuarine systems, suggesting that there could be a high degree of genetic differentiation among populations. The objective of this work was to estimate the differences at the genetic level of different populations of *L. texanus* in the Gulf of Mexico. We sampled parasitized crabs in the coastal lagoons of Tamiahua, Alvarado and Sontecomapan, Veracruz; El Carmen, Tabasco; Atasta, Campeche; and Apalache, Florida. The nucleotide sequence of the ITS1 gene was obtained for every population. We estimated the variation within and among populations, and conducted a phylogenetic analysis using the different types of sequences found. The within-population variation was of zero nucleotides, while among populations it ranged between zero and four insertion/deletions. There is a divergent sequence in some organisms from Alvarado lagoon. We found that there is no relation between genetic difference in the ITS1 and geographic distance. The analysis suggests that there could have been a certain degree of polymorphism in the ITS1 in the past for *L. texanus* in the Gulf of Mexico due to genetic flow. It can also be considered that *L. texanus* might have undergone through a bottleneck that reduced genetic diversity in the ITS1. In this scenario, the ITS1 of *L. texanus* for Alvarado, Sontecomapan and El Carmen lagoons may be in the middle of a differentiation process that will separate them from the other populations.



# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
<i>Loxothylacus texanus</i>	1
Marcadores moleculares	4
ANTECEDENTES	6
HIPÓTESIS	8
OBJETIVOS	8
ÁREA DE ESTUDIO	9
MATERIALES Y MÉTODOS	16
RESULTADOS	
Variación intragenómica	20

Variación intrapoblacional	21
Variación interpoblacional	21
Análisis filogenético	26
DISCUSIÓN	28
Variación intragenómica	28
Variación intrapoblacional	29
Variación interpoblacional	30
Flujo génico en el pasado	33
Cuello de botella	35
Divergencia reciente	36
CONCLUSIONES	37
LITERATURA CITADA	38

# INTRODUCCIÓN

## *Loxothylacus texanus*

Los balanos rizocéfalos son organismos principalmente marinos altamente especializados al parasitismo de crustáceos, principalmente decápodos (De la Fuente, 1994; Walker, 2001) (Figura 1). Entre estas adaptaciones se encuentran la ausencia de tubo digestivo, de apéndices y de segmentación en el estado adulto (Ruppert y Barnes, 1996). Los miembros de la familia Sacculinidae cuentan con un cuerpo dividido en dos regiones; un saco externo o “externa”, de forma ovalada situado en el abdomen del hospedero y un sistema radicular que se extiende al interior de los tejidos de éste para obtener los nutrimentos necesarios para su desarrollo (Walker, 2001). Con el fin de propagarse, el organismo adulto produce larvas planctónicas en estado nauplio de ambos sexos, que tras cuatro estadios dan lugar a larvas cipris con un caparazón bivalvo y anténulas con glándulas de cemento con las que la hembra se fija a las setas de un hospedero (De la Fuente, 1994; Walker, 2001). El parásito pierde el caparazón y la región toraco-abdominal, manteniéndose fijado por un pedúnculo y envuelto en un dardo o kentrogón, de donde toma su nombre este tipo de larva, y que sirve para inyectar el paquete celular que pasa al sistema circulatorio e intestino del hospedero, donde se empieza a formar el sistema radicular (Glenner, 2001). Tras esta fase endoparasitaria, la externa ya diferenciada en gónada perfora la cutícula tras la muda del hospedero, emergiendo a través del abdomen. Después el saco externo incrementa su tamaño y aloja a una larva cipris macho, que luego de sufrir una metamorfosis produce células espermáticas. Entonces la hembra se convierte en hermafrodita funcional (Glenner, 2001) (Figura 2).

Debido a que este parásito se introduce generalmente en decápodos inmaduros, impide que se desarrolle la gónada del organismo infectado, lo que ocasiona el fenómeno conocido como “castración parasítica” (Charniaux-Cotton, 1960). Además de perder su capacidad reproductiva, las neuroenzimas secretadas por el rizocéfalo provocan en los hospederos machos deficiencias en el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios, haciendo que presenten características externas propias de la hembra (feminización), adquiriendo un abdomen de forma triangular y quelas más pequeñas que los machos normales, además las

hembras maduran sexualmente a una talla menor de lo normal (Hartnoll, 1982). Los hospederos son significativamente más pequeños que los adultos no parasitados (Álvarez y Calderón, 1996), y tienen periodos de intermuda más largos en la fase endoparasitaria; deteniéndose el crecimiento y la muda en la fase de “externa” (Hartnoll, 1982).

La captura de la jaiba prieta *C. rathbunae* y de la jaiba azul *C. sapidus*, representa un importante medio de supervivencia para numerosas familias que habitan en la zona costera de la parte mexicana del Golfo de México al consumirla directamente o al vender su pulpa (Alvarado y Granados, 1991). Uno de los factores que más afecta a las poblaciones de estas jaibas es el parasitismo de *L. texanus*, al competir con los individuos normales por espacio y alimento (Álvarez y Calderón, 1996). Este balano rizocéfalo se distribuye a lo largo de todo el Golfo de México, parasitando hasta al 23% de *C. sapidus* de Tamaulipas a Campeche y al 11% de *C. rathbunae* de la parte central de Veracruz a Campeche (Álvarez y Calderón, 1996). Aunque recientemente ha sido introducido al mediterráneo junto con *C. sapidus* (Øksnebjerg, 2000).

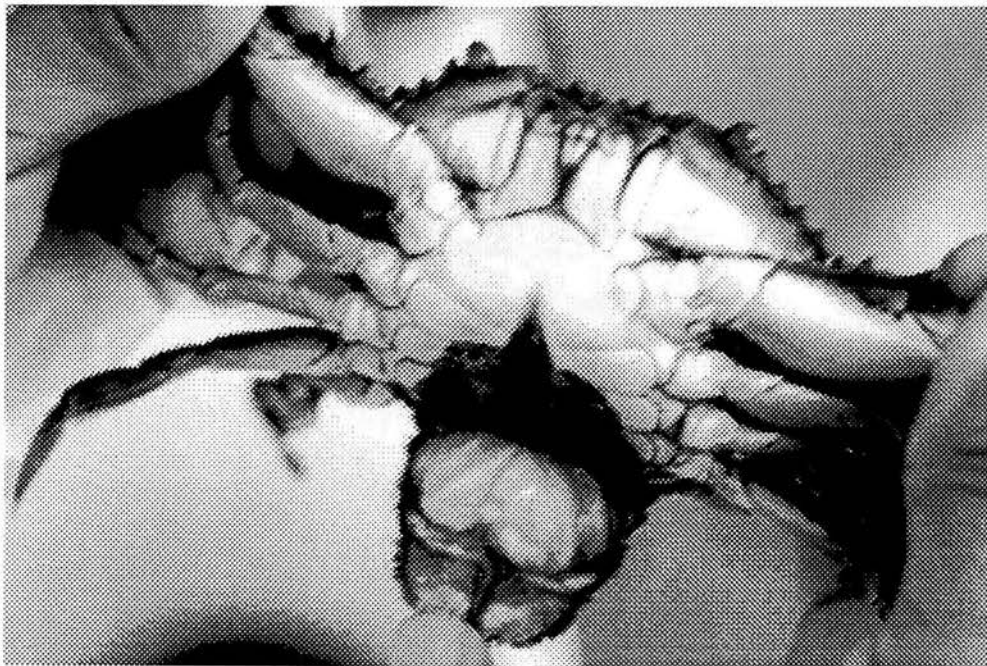


Figura 1. *Callinectes sapidus* (jaiba azul), con una externa de *Loxothylacus texanus*.

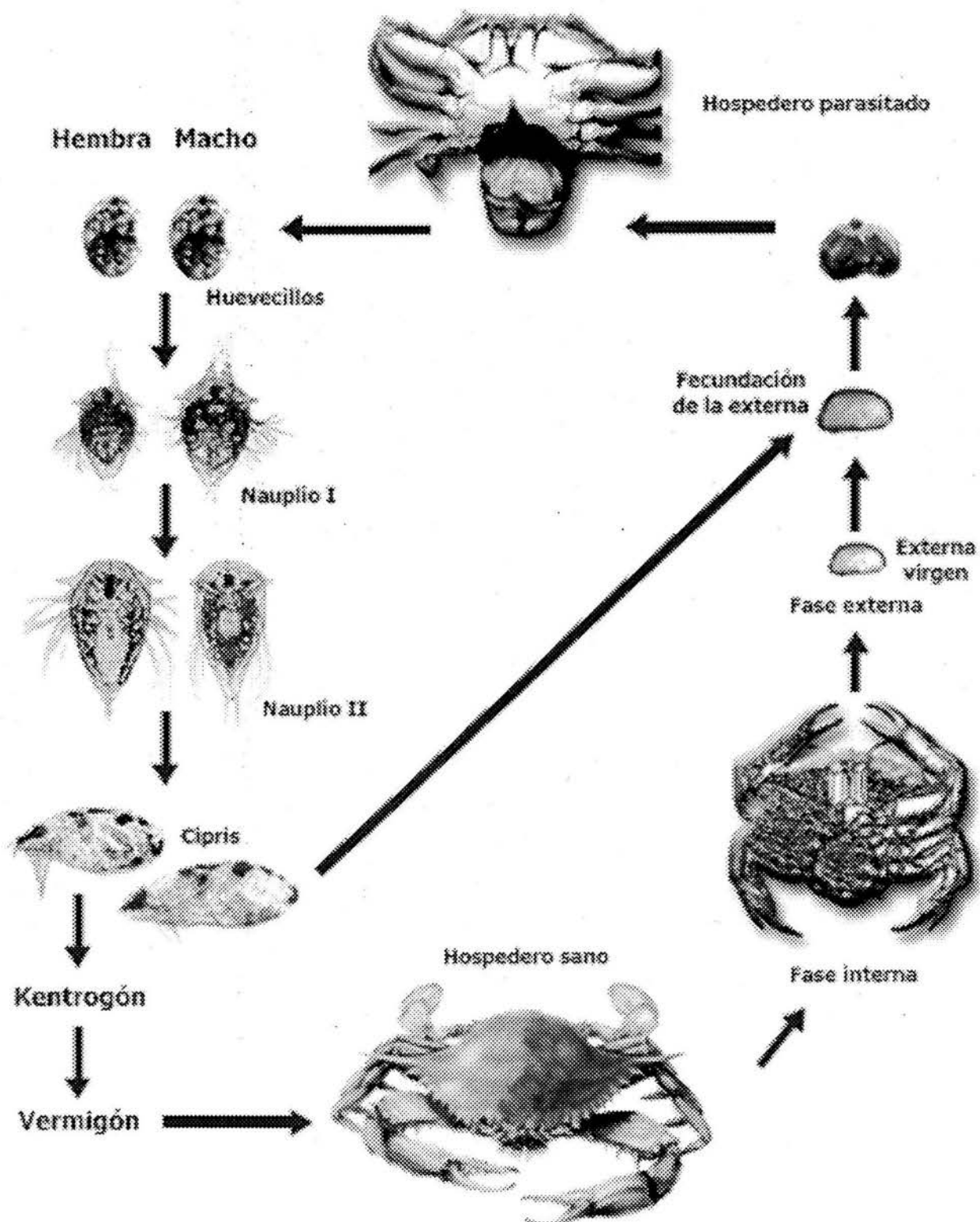


Figura 2. Ciclo de vida del rizocéfalo *Loxothylacus texanus*, teniendo como hospedero al decápodo *Callinectes* sp.

## Marcadores moleculares

El uso de técnicas moleculares se ha convertido en una herramienta muy eficiente en el estudio de las diferencias genéticas entre poblaciones naturales, ya que mediante éstas, es posible detectar la mayoría de los cambios en nucleótidos debido a diferentes eventos evolutivos como la deriva génica y la selección. Una de las alternativas más utilizadas recientemente es el uso de alozimas, con el fin de cuantificar el grado de polimorfismo en los alelos de un gen (Silva y Russo, 2000; Weber y Levy, 2000). Gracias al desarrollo de la “reacción en cadena de la polimerasa” (PCR) (Saiki *et al.*, 1988), han ganado terreno aquellas técnicas que permiten conocer directamente la secuencia de nucleótidos de un gen, siendo además muy útiles en trabajos de índole filogenético (Spears *et al.*, 1994; Silva y Russo, 2000). En el caso de estudios poblacionales es necesario obtener la secuencia de una región como el espaciador transcrito interno 1 (ITS1) del DNA ribosomal (rDNA), que además de ser altamente variable, se encuentra entre dos regiones muy conservadas, la subunidad pequeña 18S (SSU) y el rDNA 5.8S (Hillis y Dixon, 1991; Palumbi, 1996; Schulenburg y Wägele, 1998).

El gen ITS1, tiene una longitud de entre 237 y 289 pares de bases en el caso de la familia Sacculinidae (Murphy y Goggin, 2000) y forma parte del DNA ribosomal (rDNA), región que contiene los DNAs ribosomales que al combinarse con proteínas ribosomales forman los ribosomas, que son los organelos donde se lleva a cabo la traducción del RNA mensajero (Hillis y Dixon, 1991; Palumbi, 1996). Los genes de DNA ribosomal en los eucariontes, se encuentran organizados en grupos que se repiten varias veces en el genoma nuclear; estos grupos incluyen una subunidad pequeña (16S a 18S, donde la S son unidades Svedburg, que es una medida de sedimentación), un gen 5.8S, y una subunidad grande (26S a 28S); intercalados entre éstos, se encuentran dos espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2); en el extremo 5' de la subunidad pequeña hay un espaciador transcrito externo (ETS) y entre cada grupo hay un espaciador no transcrito (NTS); (Hillis y Dixon, 1991; Palumbi, 1996); (Figura 3).

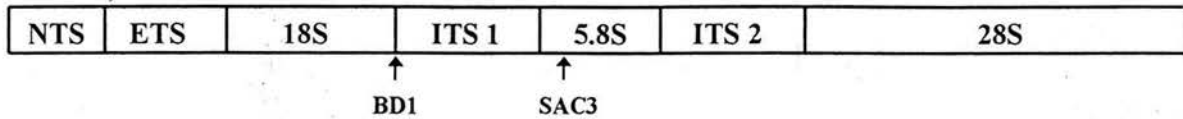


Figura 3. Representación de la ubicación del ITS1 dentro del ADN ribosomal, y de los precursores utilizados en la PCR ( Modificado de Palumbi, 1996).

Asumiendo que el crecimiento, maduración y apareamiento de *C. rathbunae* y de *C. sapidus* se llevan a cabo en el interior de los sistemas estuarinos (Reyes, 1989; Weber y Levy, 2000), es de esperarse que no haya un importante flujo de genes entre las poblaciones de *Loxothylacus texanus* que se encuentren en estuarios o lagunas costeras diferentes.

## ANTECEDENTES

*Loxothylacus texanus* ha sido estudiado entre otros por Lorán *et al.* (1992) quienes determinaron diferentes parámetros poblacionales para *C. sapidus* y *C. rathbunae*, como el porcentaje de jaibas parasitadas en la laguna de Alvarado, Veracruz. Posteriormente Álvarez y Calderón (1996) observaron la distribución de este rizocéfalo para cada una de las dos especies de hospedero, la variación promedio del tamaño de la jaiba, la distribución del número de “externas” por hospedero, y las modificaciones morfológicas del abdomen del mismo, en 14 sistemas costeros en el Golfo de México. Álvarez *et al.* (1999) establecieron los niveles de prevalencia del parásito, selectividad específica de huésped y distribución del número de parásitos por huésped.

Entre los trabajos recientes que utilizan como herramienta las alozimas para conocer la divergencia genética entre poblaciones de crustáceos están los de Vanoverbeke y De Meester (1997) sobre ocho poblaciones de *Daphnia magna* (Anomopoda) en lagos de Bélgica y Alemania, Weber *et al.* (2000) estudiando *Inachus dorsettensis* e *Hyas coarctatus* (Decapoda) en Irlanda, Brendonck *et al.* (2000) con *Branchipodopsis wolffi* (Anostraca) en Botswana y el de Weber y Levy (2000), donde no se encontró flujo génico entre diferentes poblaciones de *Callinectes danae* y *C. sapidus* (Decapoda) en Brasil. En todos los trabajos anteriores se encontró una relación directa entre diferenciación genética y distancia geográfica.

Otra alternativa en poblaciones de crustáceos ha sido la utilización de genes mitocondriales como marcadores moleculares, en especial la subunidad 16S rDNA. France y Kocher (1996) encontraron divergencias geográficas y batimétricas en el anfípodo *Eurythenes gryllus* (Lysianassioidea) en el Ártico y Bucklin y Wiebe (1998) que hallaron una baja diversidad mitocondrial en diferentes poblaciones de los copépodos *Calanus finmarchicus* y *Nannocalanus minor* (Calanoida). Meyran y Taberlet (1998) con el gen mitocondrial citocromo c oxidasa I, descubrieron que hay diferentes linajes entre poblaciones de *Gammarus lacustris* (Amphipoda) separadas geográficamente en lagos alpinos.



La utilidad del gen nuclear ITS1 en estudios poblacionales ha sido probada en diferentes estudios, como el de Boyer *et al.* (2001) con cuatro especies de cianobacterias, el realizado por Andreasen y Baldwin (2001) con 20 especies de angiospermas del género *Sidalcea*, el de Tang *et al.* (1996) con la mosca negra africana *Simulium damnosum*, y el de Presa *et al.* (2002) con 86 poblaciones de trucha café *Salmo trutta* europea, entre otros trabajos. En crustáceos este gen ha sido utilizado en siete poblaciones del copépodo *Microarthridion littorale* por Schizas *et al.* (1999) en diferentes especies de cambáridos del género *Orconectes* (Harris y Crandall, 2000) y en dos poblaciones del camarón *Penaeus japonicus* (Chu *et al.*, 2001).

En rizocéfalos destaca el trabajo de Murphy y Goggin (2000) quienes utilizando el marcador molecular ITS1, estudiaron las diferencias genéticas entre diferentes poblaciones de *Sacculina carcini*, que parasita cuatro diferentes especies de jaibas en Europa, y de otras especies de saculínidos como *S. oblonga* de Japón, *S. granifera* y *Sacculina* sp., ambos de Australia. Estos autores encontraron una divergencia de entre 23% a 56% en la secuencia de nucleótidos del ITS1 de las diferentes especies.

## **HIPÓTESIS**

Ya que el ciclo de vida de *Loxothylacus texanus* presenta larvas de tipo lecitotrófico con poca capacidad de dispersión y a que todo el ciclo de vida del hospedero se lleva a cabo dentro de los sistemas estuarinos, la posibilidad de flujo génico entre poblaciones se encuentra reducida por lo que se esperaría un alto grado de diferenciación genética entre poblaciones de diferentes cuerpos lagunares debido a aislamiento por distancia.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la estructura genética de seis poblaciones del cirripedio parásito *Loxothylacus texanus* en diferentes lagunas costeras del Golfo de México mediante la utilización del espaciador transcrito interno 1 (ITS1) del DNA ribosomal.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

Calcular la variación genética del ITS1 dentro de cada población de *Loxothylacus texanus* en el Golfo de México.

Estimar la variación entre el ITS1 de las diferentes poblaciones de *Loxothylacus texanus* en el Golfo de México.

Determinar la existencia de migración o aislamiento entre las poblaciones de *Loxothylacus texanus*.

# ÁREA DE ESTUDIO

## Laguna de Tamiahua

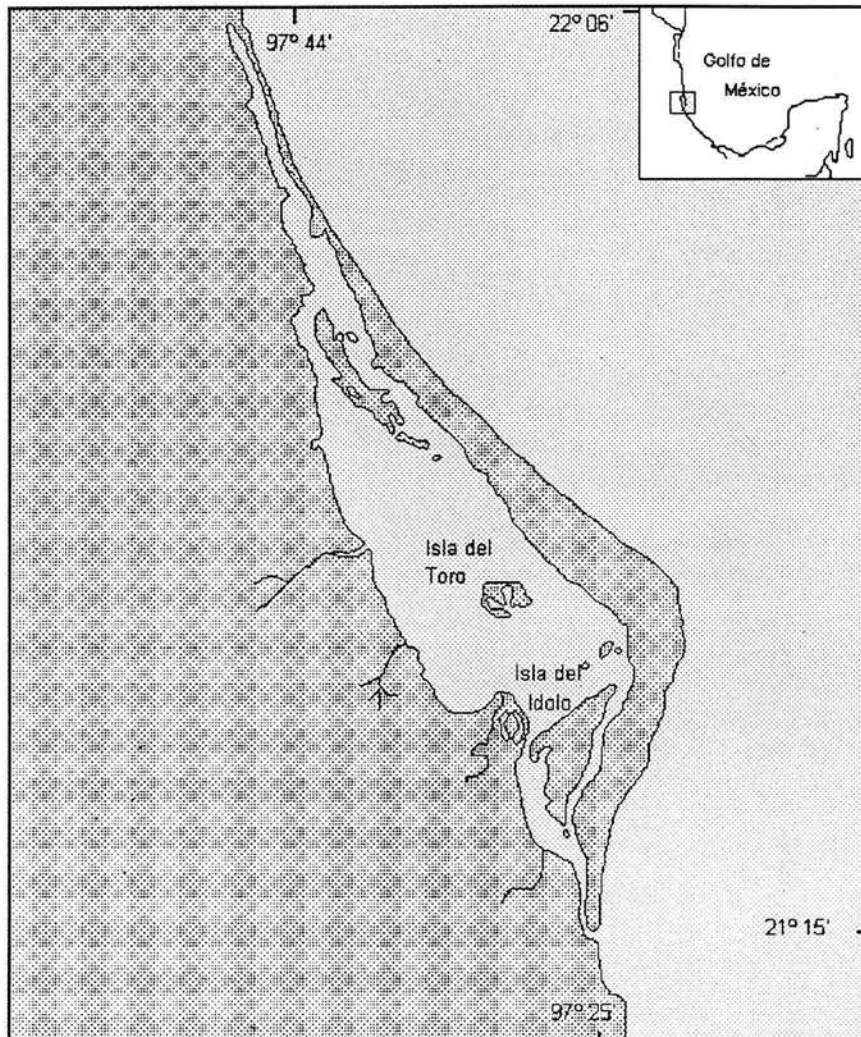


Figura 4. Laguna de Tamiahua, Veracruz (modificado de Castañeda y Contreras, 1995).

La Laguna de Tamiahua se encuentra en el estado de Veracruz, México, entre las coordenadas 21° 15' y 22° 06' N y los 97° 23' y 97° 46' W; la limitan al norte el río Pánuco y al sur el río Tuxpan y cuenta con una extensión de 88,000 ha (Castañeda y Contreras, 1994a). El clima del lugar es de tipo  $Aw''_2$  (e), caliente subhúmedo con lluvias en verano (García, 1973).

## Laguna de Alvarado

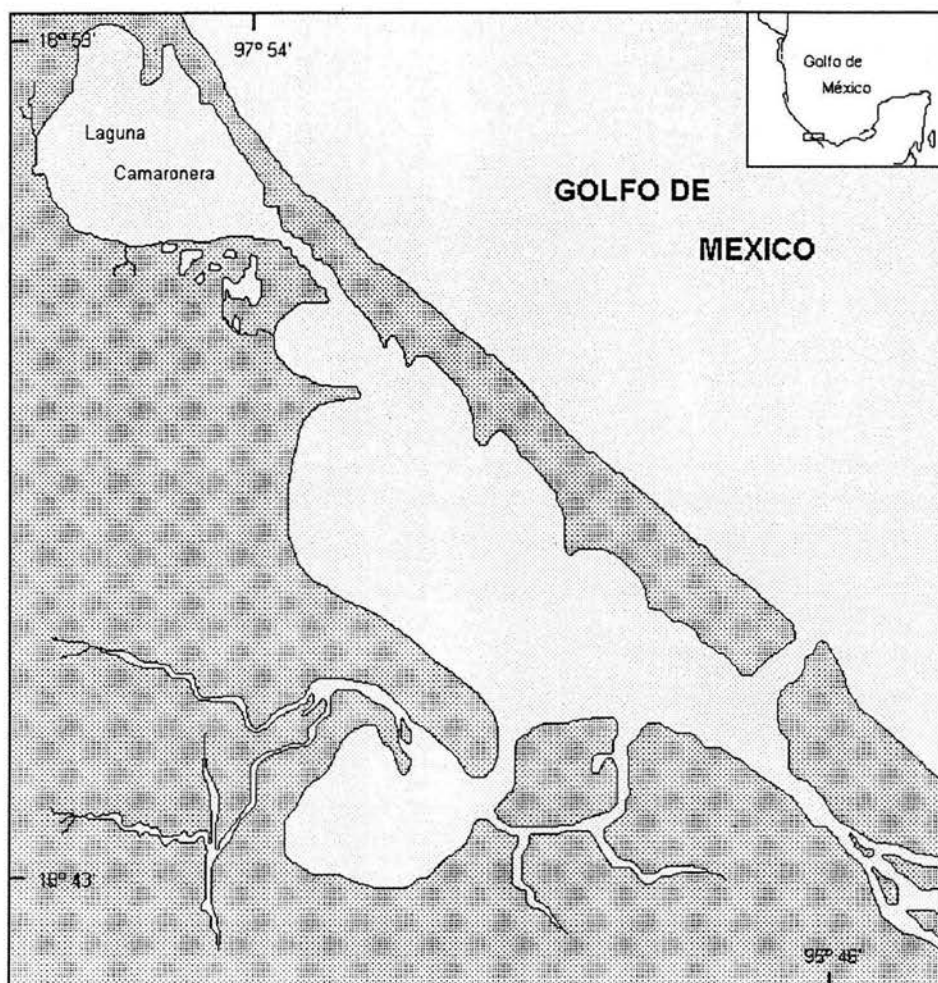


Figura 5. Laguna de Alvarado, Veracruz (modificado de Castañeda y Contreras, 1995).

Se encuentra entre los 18° 43' y 18° 53' N y los 95° 42' y 95° 57' W, dentro del estado mexicano de Veracruz. Está formada por la laguna de Alvarado, propiamente dicha, Buen País, Camaronera y Tlalixcoyan, principalmente, aunque presenta un gran número de otros pequeños cuerpos acuáticos y zonas inundables. El sistema lagunar está asociado con el río Papaloapan, cuya cuenca cubre una extensión aproximada de 39, 189 km<sup>2</sup>, pasando por los estados de Oaxaca, Puebla y Veracruz, recorriendo un total de 445 km. Las lagunas cuentan con una extensión de: Alvarado 6,200 ha, Camaronera 3,900 ha, y Tlalixcoyan 1,700 ha (Castañeda y Contreras, 1994a). El tipo de clima es Aw<sup>2</sup> (i'), caliente subhúmedo con lluvias en verano (García, 1973).

## Laguna de Sontecomapan

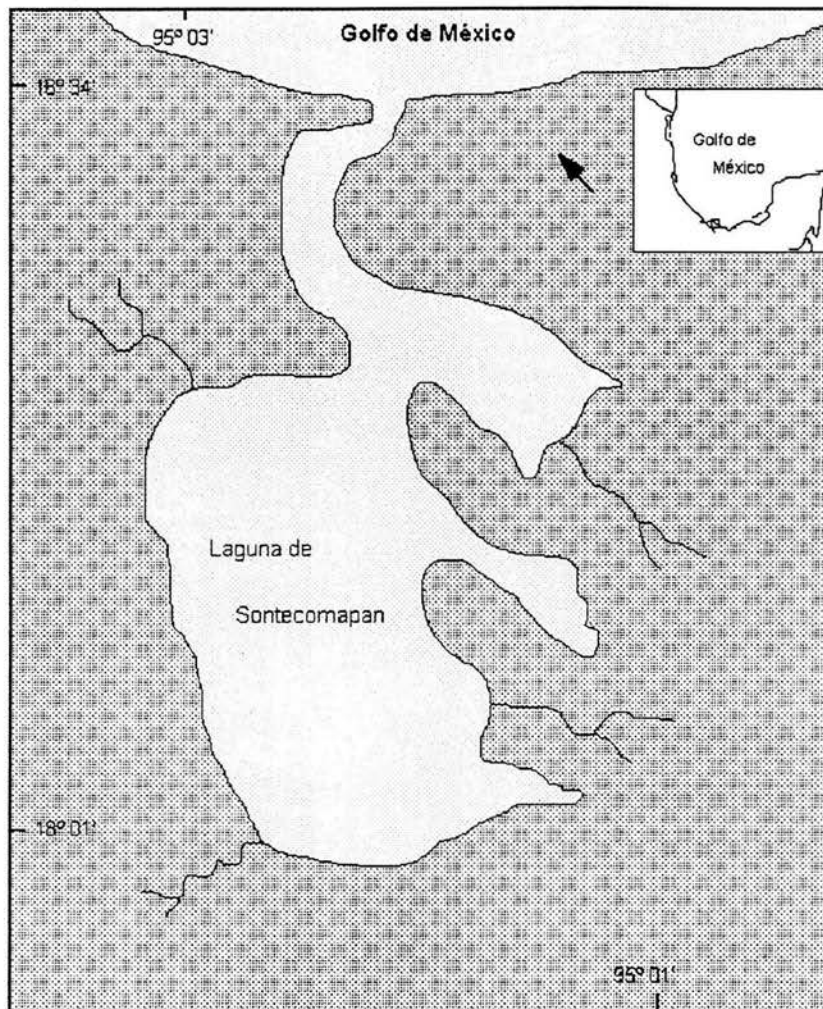


Figura 6. Laguna de Sontecomapan, Veracruz (modificado de Castañeda y Contreras, 1995).

Se encuentra dentro del estado de Veracruz, México, entre los 18° 01' y 18° 34' N, 95° 00' y 95° 04' W. El sistema lagunar se divide en varias zonas: la barra que va desde la playa a Roca Morro; el canal "El Real", que abarca la zona del río La Palma y termina en un canal que se abre para conformar la laguna propiamente dicha, que se divide en tres zonas, debido a dos deltas formados por el río Coscoapan. El sistema cuenta con una extensión de 891 ha, y la laguna principal tiene una profundidad promedio de 1.50 m (Castañeda y Contreras, 1994a). El clima es de tipo: Am (f) (i), caliente húmedo con lluvias en verano (García, 1973).

## Laguna Carmen-Machona

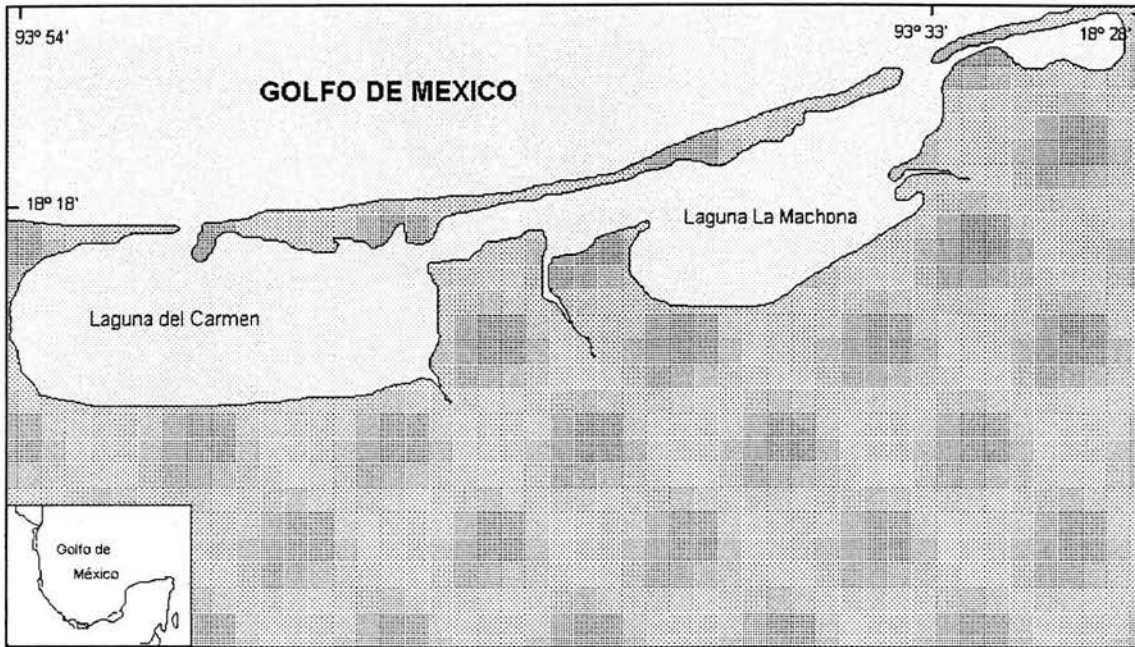


Figura 7. Sistema lagunar Carmen-Machona, Tabasco (modificado de Castañeda y Contreras, 1995).

Se localiza en el estado de Tabasco entre los paralelos  $18^{\circ} 14'$  y  $18^{\circ} 24'$  N y los meridianos  $93^{\circ} 33'$  y  $93^{\circ} 55'$  W. El sistema estuarino – lagunar, se forma de las lagunas Carmen y Machona, cuerpos de agua que se comunican entre sí por el canal llamado Pajonal; además cuenta con un par de lagunas asociadas y de menor tamaño, La Palma con  $11 \text{ km}^2$  y La Redonda con  $6 \text{ km}^2$ . El sistema tiene una extensión total de  $8,800 \text{ ha}$  (Castañeda y Contreras, 1994b). El clima es de tipo Am (f) (i) gw", caliente húmedo con lluvias en verano (García, 1973).

## Laguna de Atasta-Pom

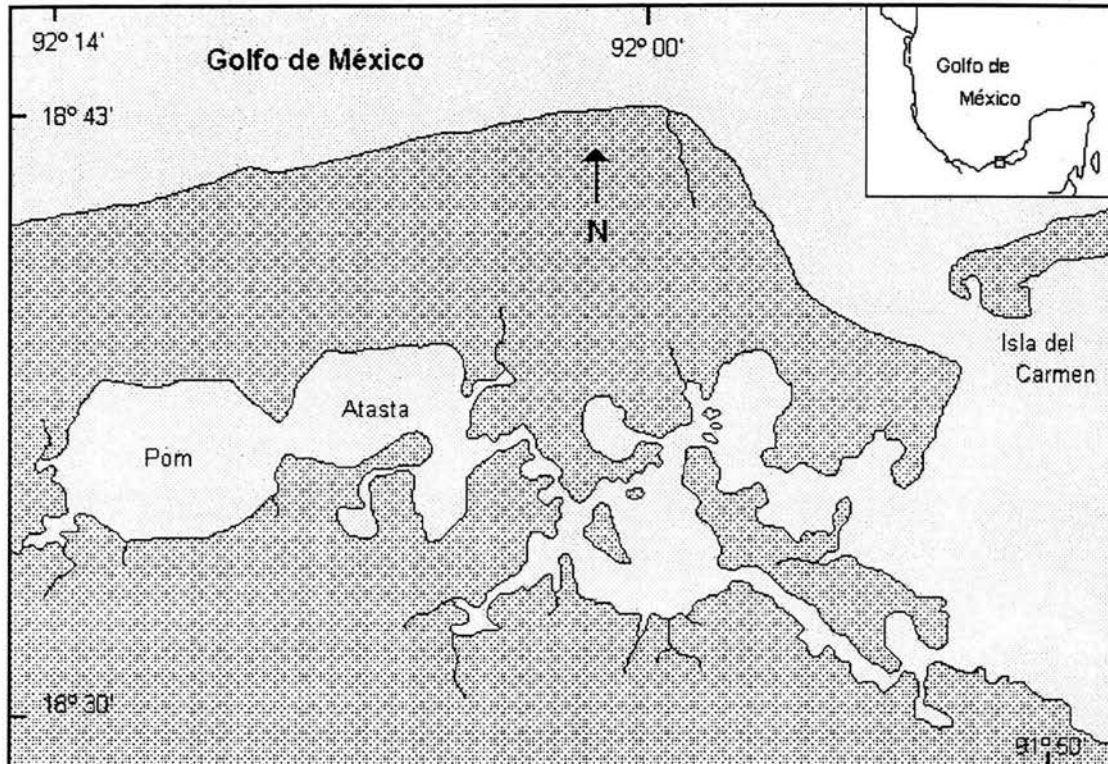


Figura 8. Sistema lagunar Atasta-Pom, Campeche (modificado de Castañeda y Contreras, 1995).

Se encuentra ubicada dentro del estado mexicano de Campeche; entre los 18° 33' y 18° 40' N y los 92° 01' con 92° 14' W. El sistema tiene una superficie aproximada de 30,000 ha, incluyendo a las Coloradas, Río Muerto, Palancares, laguneta San Ignacio y los esteros de San Ignacio y Torno Largo. Las lagunas de Atasta y Pom se comunican a través de un canal angosto denominado Boca del Pom (Castañeda y Contreras, 1994b). El clima de la zona es de tipo Am (w), caliente húmedo con lluvias en verano (García, 1973).

## Bahía Apalache

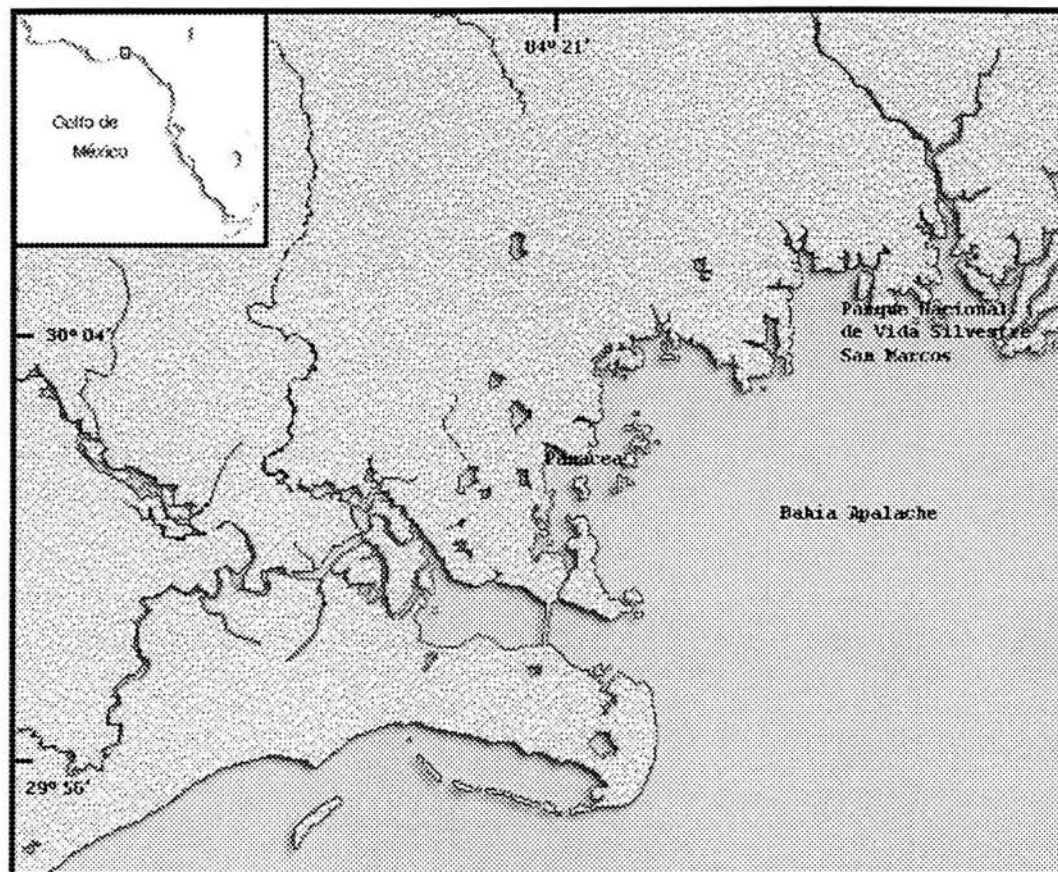


Figura 9. Bahía Apalache, Florida.

La Bahía Apalache está localizada al noroeste de la península de Florida, al sur del Refugio Nacional de Vida Silvestre San Marcos; va de los 29° 56' N y 84° 21' W, a los 30° 4' N y 83° 59' W, extendiéndose por 37 km de oeste a este. La bahía recibe la descarga de varios ríos, principalmente el Ochlockonee y el Aucilla; y a lo largo de la costa la vegetación es de pastos sumergidos (Fernald y Purdum, 1992). La temperatura media anual es de 20.5 °C, y el clima es de tipo Bm, templado húmedo (Britton y Morton, 1989).



## Distancia sobre la costa

La distancia sobre la costa existente entre las diferentes lagunas costeras estudiadas, fluctúa entre 90 km de Alvarado a Sontecomapan, ambas en Veracruz, hasta 3250 km entre la bahía Apalache en Florida y la laguna de Atasta en Campeche (Cuadro 1).

	<b>Apalache</b>	<b>Tamiahua</b>	<b>Alvarado</b>	<b>Sontecomapan</b>	<b>Carmen</b>	<b>Atasta</b>
<b>Apalache</b>						
<b>Tamiahua</b>	2440					
<b>Alvarado</b>	2750	350				
<b>Sontecomapan</b>	2840	440	90			
<b>Carmen</b>	2990	590	240	150		
<b>Atasta</b>	3250	850	500	410	260	

Cuadro 1. Distancia en kilómetros sobre la costa de diferentes lagunas costeras del Golfo de México (Calculado con ayuda del Atlas Mundial Microsoft Encarta, 1996-2000).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención de tejido de *Loxothylacus texanus*

Se colectaron 17 jaibas pertenecientes a la especie *Callinectes rathbunae* parasitadas por el rizocéfalo *Loxothylacus texanus*, con el fin de conocer la variación genética intrapoblacional del gen ribosomal ITS1 (Baverstock y Moritz, 1996) en la laguna de Alvarado, Veracruz. En la laguna costera de Atasta, en el estado de Campeche, la muestra fue de cinco parásitos, en las poblaciones de Sontecomapan, Veracruz y El Carmen, Tabasco, se tomaron cuatro externas, mientras que en Tamiahua, Veracruz, el número de individuos del rizocéfalo fue de tres. En todos los casos el hospedero pertenecía a la especie *Callinectes rathbunae*, excepto en Atasta, donde las jaibas parasitadas eran de la especie *C. sapidus*. En el sitio de muestreo, el saco externo del rizocéfalo fue separado del cuerpo de su hospedero (Murphy y Goggin, 2000) y preservado en alcohol al 96% (Dessauer *et al.*, 1984; Dessauer *et al.*, 1996). Adicionalmente se utilizaron dos externas de *Loxothylacus texanus*, de jaibas de la especie *Callinectes sapidus* preservadas en alcohol al 100%, provenientes de la Bahía Apalache en el estado de Florida, Estados Unidos.

### Extracción, amplificación y secuenciación del DNA

El DNA total se extrajo del saco externo de *Loxothylacus texanus* mediante el método estándar de extracción fenol-cloroformo (Hillis *et al.*, 1996a). Con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se amplificó la región 3' de la subunidad pequeña 18S (SSU), el espaciador transcrito interno 1 (ITS1), y la región 5' del gen 5.8S; lo anterior, utilizando el promotor delantero BD1: (5' – GTC GTA ACA AGG TTT CCG TA – 3') localizado en la región 3' de 18S, y el promotor reverso SAC3: (5' – GTT TGT GTC CTG CAA TTC GC – 3') en la región 5' de 5.8S (Murphy y Goggin, 2000). El programa de amplificación consistió en: desnaturalización del DNA a 92°C por 60 segundos, alineación de los precursores a 60°C por 30 segundos, y extensión de las cadenas a 72°C por 90 segundos

durante 35 ciclos. La purificación de los amplificadores se llevó a cabo mediante la utilización del QIAGEN Purification Kit (QIAGEN, 2003). Los productos así obtenidos fueron enviados al Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología de la UNAM, donde fueron secuenciados de manera directa en un secuenciador automático de ADN (ABI Prism 310), en ambas direcciones.

### Variación intrapoblacional

Las secuencias de nucleótidos del espaciador transcrito interno 1 (ITS1) de *Loxothylacus texanus* de la laguna de Alvarado, Veracruz, fueron alineadas visualmente con la ayuda del programa BioEdit (Hall, 1999) y delimitadas por comparación con las publicadas por Murphy y Goggin (2000). Se observaron los cambios entre las diferentes secuencias de nucleótidos dentro de la población para calcular dos parámetros: la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) (Nei, 1987),

$$\pi = \sum p_i p_j \pi_{ij} \quad \text{donde: } p_i = \text{frecuencia de la secuencia } i$$

$$p_j = \text{frecuencia de la secuencia } j$$

$$\pi_{ij} = \text{proporción de nucleótidos diferentes entre la secuencia } i \text{ y } j,$$

y el número promedio de diferencias pareadas Wakeley (1996b),

$$k = \frac{2}{n(n-1)} \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{i'=i+1}^n k_{ii'}$$

donde:  $n$  = número de secuencias muestreadas

$k_{ii'}$  = número de diferencias observadas entre la secuencia  $i$  e  $i'$ ,

## Variación interpoblacional

Conocida la variación intrapoblacional se tomaron las secuencias de la región ITS1 de *L. texanus* y se alinearon visualmente con la ayuda del programa BioEdit, con el fin de calcular el número promedio de diferencias pareadas entre cada población ( $d_{xy}$ ) (Wakeley, 1996a)

$$d_{xy} = \frac{1}{n_x n_y} \sum_{i=1}^{n_x} \sum_{j=1}^{n_y} k_{ij}$$

$n_x$  = número de secuencias de la población x  
 $n_y$  = número de secuencias de la población x  
 $k_{ij}$  = número de diferencias observadas entre la secuencia i de la población X y la secuencia j de la población Y,

Posteriormente se tomo una secuencia perteneciente a cada cuerpo lagunar y se calculó la distancia p, que consiste en la proporción de sitios variables (Hedrick, 2000), con el programa MEGA versión 2.1 (Kumar *et al.*, 2001),

$$p = \frac{S}{N} \quad \text{donde: } S = \text{número de sitios diferentes}$$
$$N = \text{número total de nucleótidos.}$$

y se relaciono la distancia genética (p), con la distancia geográfica en kilómetros sobre la costa.

## **Análisis filogenético**

Tras identificar cada una de los diferentes tipos de secuencias de nucleótidos del ITS1 encontradas en las seis poblaciones de *L. texanus*, se realizó una reconstrucción filogenética utilizando el criterio de máxima parsimonia mediante una búsqueda exhaustiva con el programa PAUP Versión 4.0b8 (Swofford, 1993), utilizando las inserciones/delecciones como un quinto estado de carácter. Para esto se utilizó, como grupo externo la misma región del rizocéfalo *Saculina carcini* (GenBank, número de acceso AF109346); (Murphy y Goggin, 2000). Por último se hizo un mapeo de las poblaciones dentro del cladograma obtenido a partir de los tipos de secuencias encontrados (Avice, 2000).

## RESULTADOS

### Variación intragenómica

Dentro de los 17 fragmentos correspondientes al gen ITS1 de la laguna de Alvarado, cuatro presentaron una serie diferente de nucleótidos al ser leídos en dirección 5'– 3'. Esta secuencia divergente tiene una longitud de 238 pares de bases, de los cuales 37 son variables, presentando una proporción de nucleótidos variables de  $p = 0.1548$ . De estos 17 son transiciones, 19 transversiones, y una inserción/delección (Figura 10).

ITS1	CAGTGTATGA	CACATGTGCA	TGTAAGTGTG	CGTGTGATT	ATCTGTATTT
SEC. DIVERGENTE	.....	.....	.....	.....	.....
ITS1	TGTCATAAAT	CATTCGTTTC	GCTGTTATAG	GGCGATCGAA	GTTTACGCAA
SEC. DIVERGENTE	.....	.....	.....	.....	.....
ITS1	TAAACCGATG	CGTGTGTGTG	TGTGTGCGTG	CTTGCGCGTG	CACCTACACG
SEC. DIVERGENTE	.....	.....	....C...C.	.GC.....C.	.C..C.....
ITS1	TCATTGGTGA	TCTGTTTGTG	TTTGCTATGC	TTTCATATAC	AACTACATAG
SEC. DIVERGENTE	AT.GG..A..	.G...G....	.GC...GC..	.CAT...C..	C..C....GA
ITS1	GACTGTCTGC	TCTGGCGGTC	CTATCAAAAC	AAAACCTCTA	
SEC. DIVERGENTE	..G...G...	.GG..G..CT	...AA.....	..C.....-	

Figura 10. Alineamiento de una secuencia del gen ITS1 de *Loxothylacus texanus*, correspondiente a Alvarado, y la secuencia divergente de ITS1 de la misma población. Notación: ( . ) misma base que ITS1, ( - ) delección o inserción.

### **Variación intrapoblacional**

Se obtuvieron un total de 17 secuencias de la región 3' de la subunidad pequeña 18S, el espaciador transcrito interno 1 (ITS1), y la región 5' del gen 5.8S, pertenecientes a la población de Alvarado, de *L. texanus*; con una longitud total de 334 pares de bases, de las cuales 23 nucleótidos corresponden al 18S, 239 al ITS1, y 72 al gen 5.8S. Las 17 muestras de esta población presentaron la misma secuencia de nucleótidos, por lo que la diversidad nucleotídica fue de  $\pi = 0$ , por la misma razón el número promedio de diferencias pareadas fue de  $k = 0$ .

Las secuencias de cada una de las otras cinco poblaciones de *L. texanus* en el Golfo de México, tuvieron el mismo valor de  $\pi = 0$  y de  $k = 0$ , al tener la misma secuencia de nucleótidos dentro de cada población.

### **Variación interpoblacional**

De las poblaciones de *L. texanus* correspondientes a Alvarado, Sontecomapan, y El Carmen el amplificado total tuvo una longitud de 334 pares de bases (23 pb de 18S, 239 pb de ITS1, 72 pb de 5.8S). En el caso de Tamiahua y Atasta la longitud total fue de 332 pares de bases (23 pb de 18S, 237 pb de ITS1, 72 pb de 5.8S); mientras que el amplificado de Apalache fue de 330 pares de bases (23 pb de 18S, 235 pb de ITS1, 72 pb de 5.8S) (Cuadro 2).

<b>Población</b>	<b>Número de secuencias</b>	<b>N (pb)</b>	<b>ITS1 (pb)</b>
Alvarado	17	334	239
Sontecomapan	4	334	239
El Carmen	4	334	239
Tamiahua	3	332	237
Atasta	5	332	237
Apalache	2	330	235

Cuadro 2. Número de individuos por población muestreada, longitud del amplificado y del ITS1 (en pares de bases).

Las regiones correspondientes al gen ITS1 de las lagunas de Alvarado, Sontecomapan y El Carmen presentaron la misma secuencia de nucleótidos, las de Tamiahua y Atasta presentaron dos deleciones cada una en los sitios 124 y 125 del gen, y el ITS1 de la población de la Bahía Apalache en Florida, tuvo cuatro deleciones en los sitios 103, 104, 124 y 125 del ITS1 (Figura 11). Por lo tanto hay tres tipos de secuencias presentes en las seis poblaciones, uno correspondiente a Apalache, otro a Tamiahua y Atasta y otro presente en Alvarado, Sontecomapan y El Carmen.



18S

APALACHEE BAY, FL	GGTGACCTGC	GAAGGATCATTAA	CAGTGTA	TGACACATGT	GCATGTAAGT
TAMIAHUA, VER	.....	.....	.....	.....	.....
ALVARADO, VER	.....	.....	.....	.....	.....
SONTECOMAPAN, VER	.....	.....	.....	.....	.....
EL CARMEN, TAB	.....	.....	.....	.....	.....
ATASTA, CAMP	.....	.....	.....	.....	.....
APALACHEE BAY, FL	GTGCGTGTTG	ATTATCTGTA	TTTTGTCATA	AATCATTCGT	TTCGCTGTTA
TAMIAHUA, VER	.....	.....	.....	.....	.....
ALVARADO, VER	.....	.....	.....	.....	.....
SONTECOMAPAN, VER	.....	.....	.....	.....	.....
EL CARMEN, TAB	.....	.....	.....	.....	.....
ATASTA, CAMP	.....	.....	.....	.....	.....
APALACHEE BAY, FL	TAGGGCGATC	GAAGTTTACG	CAATA--CCG	ATGCGTGTGT	GTGTGT--GC
TAMIAHUA, VER	.....	.....	.....AA.....	.....	.....--..
ALVARADO, VER	.....	.....	.....AA.....	.....	.....GT..
SONTECOMAPAN, VER	.....	.....	.....AA.....	.....	.....GT..
EL CARMEN, TAB	.....	.....	.....AA.....	.....	.....GT..
ATASTA, CAMP	.....	.....	.....AA.....	.....	.....--..
APALACHEE BAY, FL	GTGCTTGCGC	GTGCACCTAC	ACGTCATTGG	TGATCTGTTT	GTGTTTGCTA
TAMIAHUA, VER	.....	.....	.....	.....	.....
ALVARADO, VER	.....	.....	.....	.....	.....
SONTECOMAPAN, VER	.....	.....	.....	.....	.....
EL CARMEN, TAB	.....	.....	.....	.....	.....
ATASTA, CAMP	.....	.....	.....	.....	.....
APALACHEE BAY, FL	TGCTTTCATA	TACAACCTACA	TAGGACTGTC	TGCTCTGGCG	GTCCTATCAA
TAMIAHUA, VER	.....	.....	.....	.....	.....
ALVARADO, VER	.....	.....	.....	.....	.....
SONTECOMAPAN, VER	.....	.....	.....	.....	.....
EL CARMEN, TAB	.....	.....	.....	.....	.....
ATASTA, CAMP	.....	.....	.....	.....	.....
APALACHEE BAY, FL	AACAAAACCTC	TA	ACCAAGAGCTCCCATGGC	AGCGGATCAC	TCGGCTTGTC
TAMIAHUA, VER	.....	.....	.....	.....	.....
ALVARADO, VER	.....	.....	.....	.....	.....
SONTECOMAPAN, VER	.....	.....	.....	.....	.....
EL CARMEN, TAB	.....	.....	.....	.....	.....
ATASTA, CAMP	.....	.....	.....	.....	.....
APALACHEE BAY, FL	GGTCGATGAA	GACCGGGGTA	AAACCCGAGA	ACGT	
TAMIAHUA, VER	.....	.....	.....	.....	
ALVARADO, VER	.....	.....	.....	.....	
SONTECOMAPAN, VER	.....	.....	.....	.....	
EL CARMEN, TAB	.....	.....	.....	.....	
ATASTA, CAMP	.....	.....	.....	.....	

5.8S

Figura 11. Alineamiento de la región 3' de 18S, ITS1, y la región 5' de 5.8S, de *Loxothylacus texanus* de la Bahía Apalache, Fl., y las lagunas de Tamiahua, Alvarado, y Sontecomapan, Ver., El Carmen, Tab. y Atasta, Camp. Notación: (.) misma base que Apalache, (-) delección o inserción.

El número promedio de diferencias pareadas entre las secuencias de las diferentes poblaciones, fue de  $d_{xy} = 0$  entre aquellas poblaciones que comparten todos los nucleótidos, de  $d_{xy} = 2$  cuando la diferencia fue de dos nucleótidos, y de  $d_{xy} = 4$ , cuando éste fue el número de deleciones (Cuadro 3).

	<b>Alvarado</b>	<b>Sontecomapan</b>	<b>Carmen</b>	<b>Tamiahua</b>	<b>Atasta</b>	<b>Apalache</b>
<b>Alvarado</b>						
<b>Sontecomapan</b>	0					
<b>Carmen</b>	0	0				
<b>Tamiahua</b>	1.999	1.999	1.999			
<b>Atasta</b>	1.999	2	2	0		
<b>Apalache</b>	3.999	4	4	1.999	2	

Cuadro 3. Número promedio de diferencias pareadas ( $d_{xy}$ ) entre las secuencias del gen ITS1 de las diferentes poblaciones de *Loxothylacus texamus*, en el Golfo de México.

La proporción de nucleótidos variables fue de  $p = 0$  entre las poblaciones de Alvarado, Sontecomapan y El Carmen, y entre Tamiahua y Atasta. Mientras que fue de  $p = 0.0084$  cuando la diferencia fue de dos nucleótidos, lo que se presentó entre Tamiahua y Atasta con respecto a Alvarado, Sontecomapan, El Carmen y Apalache; y de  $p = 0.0167$  cuando las secuencias difirieron en cuatro nucleótidos, como entre Apalache y las poblaciones de Alvarado, Sontecomapan y El Carmen (Cuadro 4). En cuanto a la distancia genética y la geográfica no existe una relación entre ellas (Figura 12).

	Alvarado	Sontecomapan	Carmen	Tamiahua	Atasta	Apalache
Alvarado		90	240	350	500	2750
Sontecomapan	0		150	440	410	2840
Carmen	0	0		590	260	2290
Tamiahua	0.0084	0.0084	0.0084		850	2440
Atasta	0.0084	0.0084	0.0084	0		3250
Apalache	0.0167	0.0167	0.0167	0.0084	0.0084	

Cuadro 4. Proporción de nucleótidos variables (p) del ITS1 (parte inferior) y distancia en kilómetros sobre la costa entre las diferentes poblaciones de *Loxothylacus texanus* en el Golfo de México (parte superior).

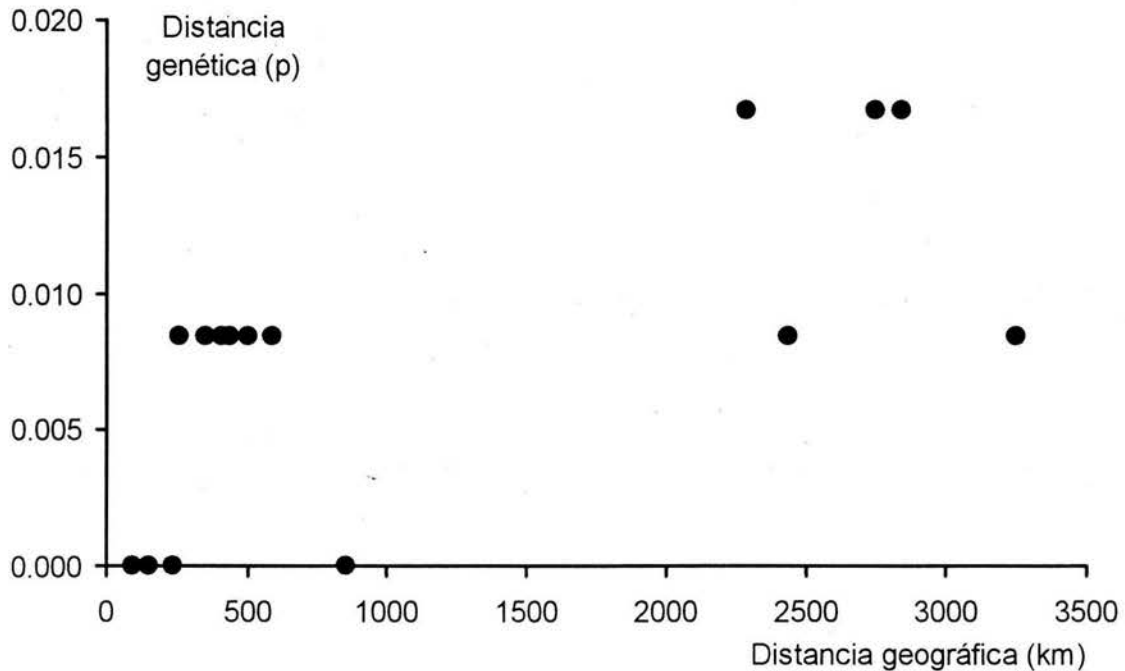


Figura 12. Relación entre distancia genética (p) y distancia geográfica en kilómetros sobre la costa de las poblaciones de *Loxothylacus texanus* en el Golfo de México.

## Análisis filogenético

Los tipos de secuencias encontradas en las poblaciones de *L. texanus* fueron tres. El tipo A encontrado en Apalache, el B en Atasta y Tamiahua y el C de Alvarado, El Carmen y Sontecomapan. Además de la secuencia divergente X encontrada en Alvarado (Figura 13).

A	CAGTGTA---	---TGA-CAC	ATGTGCATGT	AAGTGTG---	---CGTGT--
B	.....----	-----	.....	.....----	-----
C	.....----	-----	.....	.....----	-----
X	.....----	-----	.....	.....----	-----
S. <i>carcini</i>	....-.GTGT	GTT..TG.G.	.A.C....TC	.CA-T.TCTG	ACG.A...CA
A	TGAT--TA-T	CTG---TATT	TT--GTCATA	AATCATTCGT	TTCG-CT-GT
B	.....----	-----	.....	.....	.....----
C	.....----	-----	.....	.....	.....----
X	.....----	-----	.....	.....	.....----
S. <i>carcini</i>	..TCATG.C.	...TCTG..G	.CAT.....G	.C.....	..-..A..C.C
A	TATAGGGCGA	TCGAAGTTTA	CG----CAAT	A---CCGATG	CGTGTGTGTG
B	.....	.....	.....	.A-A.....	.....
C	.....	.....	.....	.A-A.....	.....
X	.....	.....	.....	.A-A.....	.....
S. <i>carcini</i>	.T.TC...AG	...T-TCGA.	GTTTAC..TA	TTGG.AACA-	---C.....
A	TGT--GCGTG	-CTTGCGCGT	GCACCTACAC	GTCATTGGTG	ATCT--GTTT
B	...--.....	-.....	.....	.....	.....--.....
C	...GT.....	-.....	.....	.....	.....--.....
X	...GC...C.	-.GC.....C	..C..C....	.AT.GG..A.	..G.--..G.
S. <i>carcini</i>	C..GCAAAC.	CTA.T.A--.	A...AC.TT.	A.GCACAA.C	GCAGTT....
A	GTGTTTGCTA	TGCTTTC-A-	TATA-----C	AACTA-----	CAT--AGGAC
B	.....	.....	.....	.....	.....
C	.....	.....	.....	.....	.....
X	...GC...G	C.....	.....	.C.ACCA---	...--GA..G
S. <i>carcini</i>	.CC-G.CA.T	.TTC.GTCTA	...GCCTGA.	..TATACAAA	...GC.....
A	T-GTCTGCTC	TGGCGGTCCT	ATC--AAAAC	AAAACCTCTA	
B	.....	.....	.....	.....	
C	.....	.....	.....	.....	
X	..-..G...G	G..G..CT..	.AA--.....	..C.....-	
S. <i>carcini</i>	CG...G-...	.AC.....	G.-TG...-	.....-	

Figura 13. Alineamiento de los tres diferentes tipos de secuencias (A, B y C) del ITS1 de *Loxothylacus texanus* en el Golfo de México, la secuencia divergente (X) y de *Saculina carcini*. Notación: ( . ) misma base que A, ( - ) deleción o inserción.

El cladograma obtenido a partir de la reconstrucción filogenética de las diferentes poblaciones de *L. texamus* en base al ITS1 resultó en el agrupamiento de las secuencias A y B presentes en la población de Apalache, Atasta y Tamiahua, estando este clado relacionado a la secuencia C, que se presenta en Alvarado, Carmen y Sontecomapan. El análisis se realizó en base a 11 sitios informativos y el cladograma tuvo un índice de consistencia de  $CI = 0.995$  (Figura 14).

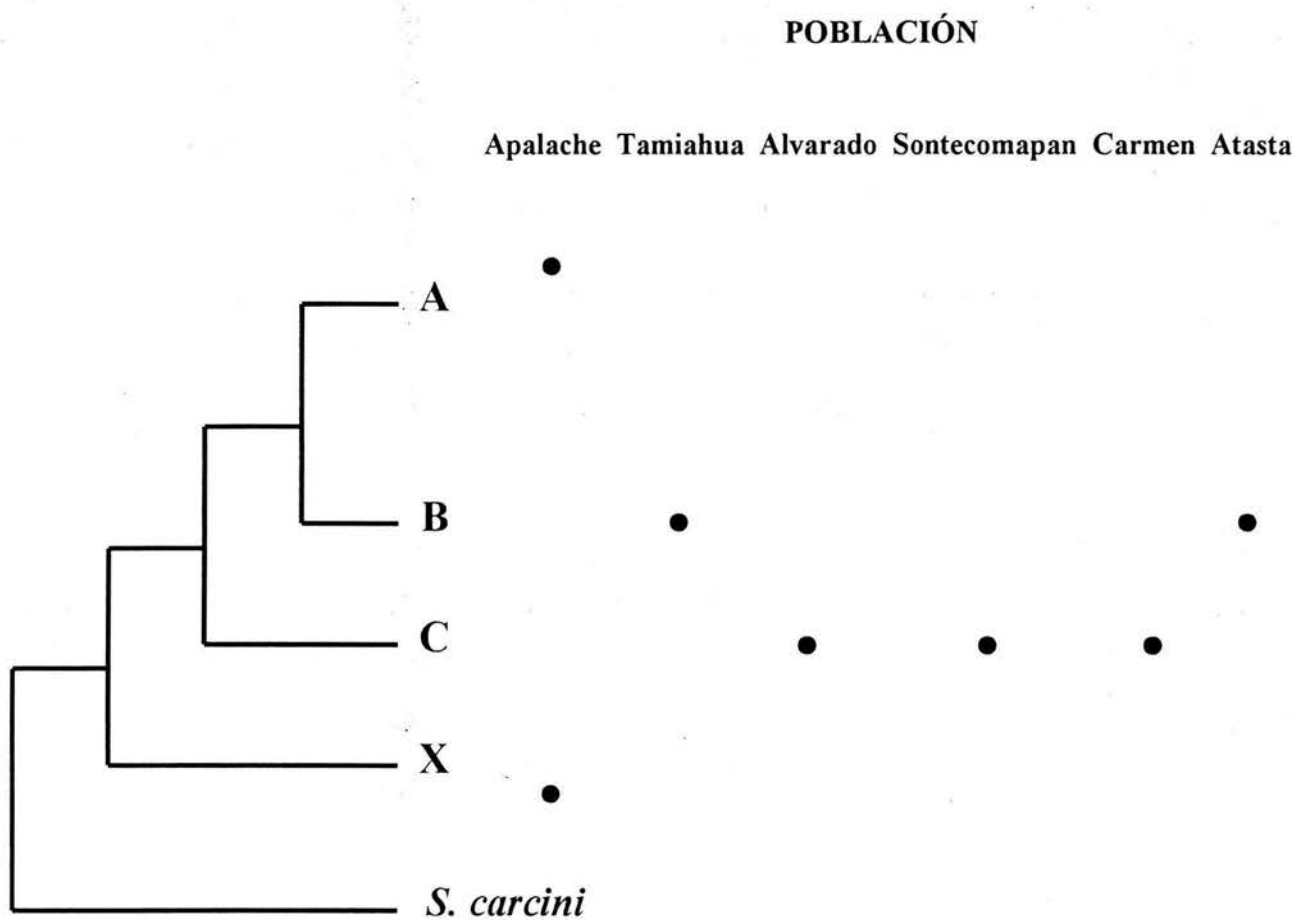


Figura 14. *Parte derecha*: Cladograma de los diferentes tipos de secuencias del ITS1 de *Loxothylacus texamus*. *Parte izquierda*: Mapeo de las poblaciones en el Golfo de México.

## DISCUSIÓN

En estudios de tipo poblacional o filogenético, donde se ha utilizado como marcador molecular el espaciador transcrito interno 1, el tamaño de la muestra fluctúa entre dos y cinco individuos por población (Tang *et al.*, 1996; Schizas *et al.*, 1999; Harris y Crandall, 2000; Murphy y Goggin, 2000; Boyer *et al.*, 2001; Chu *et al.*, 2001); en cambio, el tamaño de la muestra en el presente estudio fue mayor, si consideramos que el número de rizocéfalos de una sola laguna fue de 17, con un total de 35 organismos en seis poblaciones lagunares.

La longitud del ITS1 encontrada en *L. texanus*, que fue de entre 235 y 239 pares de bases, es menor que la reportada para especies de la misma familia del género *Sacculina*, que van de 274 a 289 pares de bases (Murphy y Goggin, 2000); pero mayor que lo encontrado por Chu *et al.* (2001) para otro miembro de la clase Cirripedia, ya que el balano *Balanus amphitrite* tiene 182 pares de bases. Sin embargo, tal variación no es rara si consideramos que en otros crustáceos la longitud del ITS1 va de los 182 pb en el balano antes mencionado, a 820 pb en el decápodo *Palimurus japonicus* (Chu *et al.*, 2001).

### Variación intragenómica

La presencia de diferentes copias de una misma región es común en familias multigénicas como las ribosomales (Liao, 1999) y ha sido encontrada en el espaciador transcrito interno 1 de otros crustáceos, como Chu *et al.* (2001), que en un solo individuo del decápodo *Eriocheir formosa*, encontraron tres secuencias diferentes del ITS1, con una  $p$  de entre  $p = 0.009$  y  $p = 0.023$ , equivalente a entre 3 y 8 nucleótidos. Otro ejemplo es el de *Orconectes luteus* (Harris y Crandall, 2000), donde la variación intragenómica de la región ITS1 es de

entre  $p = 0$  y  $p = 0.005$ , esta última equivalente a 4 sitios. La variación intragenómica encontrada en *L. texanus* es alta, pues el número de sitios diferentes entre el ITS1 y la secuencia divergente fue de 37 nucleótidos, con una distancia de  $p = 0.1548$ . Sin embargo, niveles altos de variación entre una región y copias de esta en genes ribosomales son comunes, y a menudo mayores a los encontrados entre genes de especies cercanas, ya que aunque la evolución concertada mantiene los niveles de variación bajos, esta actúa a una tasa mas lenta que la especiación (Awise, 1994; Liao, 1999).

Aunque la secuencia divergente solo se observó en cuatro secuencias de las 17 estudiadas en la población de Alvarado, al ser leídas en dirección 5'–3', es importante que en estudios de índole filogenética que utilicen como marcador genético al ITS1, se tome una muestra representativa de cada población, ya que existe el riesgo de realizar el análisis con la secuencia incorrecta. Pues si solo se tomara un individuo de *L. texanus*, se tendría una probabilidad del 30% de estar utilizando la secuencia del pseudogen, si solo se lee en dirección 5'–3', reduciéndose al 15% si se hace en ambas direcciones. Esto si se utilizan los mismos oligonucleótidos para la PCR.

### **Variación intrapoblacional**

La falta de variación en la secuencia de nucleótidos en el ITS1 entre individuos de la misma población de *Loxothylacus texanus* difiere de lo reportado para otros crustáceos en estudios con el mismo gen. Como el de Schizas *et al.* (1999), donde en el copépodo marino *Microarthridion littorale* se encontraron de dos a cinco haplotipos dentro de cada población, con una distancia de hasta  $p = 0.025$ , lo que equivale a 9 sitios, y una diversidad nucleotídica de entre  $\pi = 0.0005$  y  $0.0008$ . O lo reportado por Harris y Crandall (2000), donde la distancia genética promedio basada en el ITS1, entre individuos del decápodo *Orconectes luteus* es de  $p = 0.00443$ , lo que equivale a 3.4 sitios. Además Chu *et al.* (2001), mencionan que en crustáceos la proporción de sitios diferentes entre individuos de la misma población es de alrededor de  $p = 0.01$ .

## Variación interpoblacional

La variación genética encontrada en *L. texamus*, que fue de entre  $p = 0$  y  $p = 0.0167$ , es baja, ya que solo representa una diferencia entre secuencias de entre 0 y cuatro sitios, de los cuales ninguno es un cambio de nucleótido, sino inserciones o deleciones que solo tienen como consecuencia que la secuencia del ITS1 sea de mayor o menor longitud, ya que este gen no codifica para ninguna proteína (Hillis y Dixon, 1991).

Una variación alta en este gen se presenta entre diferentes poblaciones de otros invertebrados, como dinoflagelados (LaJeunesse, 2002) e insectos (Leo y Barker, 2002), y se ha utilizado en otros crustáceos para determinar la estructura de diferentes poblaciones, como lo hicieron Schizas *et al.* (1999) con siete poblaciones del copépodo estuarino *Microarthridion littorale*, en donde la distancia fue de entre  $p = 0.025$  y  $p = 0.112$ . Esto equivale a una variación de entre 9 y 40 nucleótidos, incluyendo inserciones /deleciones, transiciones y transversiones.

La dispersión en los puntos entre la distancia genética ( $p$ ) y la geográfica que separa a cada una de las lagunas costeras del Golfo de México indica que no existe una relación entre el aumento en la distancia sobre la costa y el número de cambios en la secuencia de nucleótidos (Avice, 2000).

Lo encontrado en el presente trabajo contradice lo propuesto por Chu *et al.* (2001) que al hacer un estudio del uso del ITS1 como marcador molecular en crustáceos, sugiere que este gen es una herramienta potencial en trabajos que busquen conocer la estructura poblacional de estos artrópodos; esto al encontrar una variación de 60 nucleótidos entre dos poblaciones del camarón *Penaeus japonicus*, lo que se traduce en una distancia de  $p = 0.181$ . La contradicción con la propuesta de Chu *et al.*, al menos para rizocéfalos, la respalda el trabajo de Murphy y Goggin (2000), en el que no encontraron ninguna diferencia en la secuencia de nucleótidos del ITS1 proveniente de tres poblaciones europeas y tres diferentes hospederos del rizocéfalo saculínido de la especie *Sacculina carcini*.



Existen varias razones biológicas para considerar que en cada cuerpo lagunar a lo largo del Golfo de México se encuentra una población totalmente aislada de *L. texamus*, que llevan a cabo todo su ciclo de vida dentro de estos sistemas:

- Los cuatro estadios como larva nauplio tienen una duración de alrededor de dos días a la temperatura de las aguas del Golfo (Høeg, 1995); y esta larva es lecitotrófica, lo que significa que es incapaz de alimentarse, por lo que tiene poca capacidad de desplazarse grandes distancias al emplear casi toda su energía en la metamorfosis (Høeg, 1995; Walker, 2001).
- La larva cipris, que es la que infecta al hospedero, también es lecitotrófica, y solo se mantiene en este estadio durante unas horas antes de fijarse al cuerpo del hospedero e inyectar el kentrogon con las células infectivas (Høeg, 1995).
- El desarrollo desde nauplio 1 hasta cipris, solo se lleva a cabo en un intervalo de salinidad que va de 10 a 30 ‰ (Vázquez, 2002; Walker y Clare, 1994), por lo que sería imposible su supervivencia en el mar.
- Cuando el rizocéfalo se encuentra en fase de externa virgen, muere en pocos días si una cipris macho no se introduce en ella, y la jaiba con externa madura solo abandona las zonas de baja salinidad cuando el parásito se dispone a ovopositar (Høeg, 1995).

Todo lo anterior haría suponer que las poblaciones de *L. texamus* han estado aisladas geográficamente, por lo que se esperaría una alta variación genética en el espaciador transcrito interno 1. La razón de esto consiste en la ubicación de los espaciadores internos dentro del genoma ribosomal, y su papel durante la traducción. Estos se localizan entre las regiones 18S, 5.8S y 28S, que se encuentran altamente conservadas y varían a una tasa muy lenta, ya que deben conservar su estructura y función. Las mutaciones en tales genes suelen ser letales, al contrario de los espaciadores internos que al ser transcritos pero no traducidos, no están sujetos a selección (Gerbi, 1985; Jorgensen y Cluster, 1988).

Así, la tasa de cambio de los espaciadores transcritos internos (ITS1, ITS2), va de  $0.4 \times 10^{-8}$  a  $1 \times 10^{-8}$  sustituciones por sitio por año en artrópodos, equivalentes a de 0.4 a 1% cada millón de años (Bargues *et al.*, 2000) y de  $0.79 \times 10^{-8}$  a  $1.57 \times 10^{-8}$  sustituciones por sitio por año en algunas plantas compuestas, lo que equivale a un cambio de 0.4 a 1% cada millón de años (Peter y Abbott, 2001; Sang *et al.*, 1994). Se debe considerar que el ITS1 varía un poco más rápido que el ITS2 (Bargues *et al.*, 2000), debido a que en el proceso de maduración de rRNA mensajero, primero se elimina la región correspondiente al ITS1, para después perder el segundo espaciador interno (Gerbi, 1985). Esta tasa es de 23 a 55 veces más alta si la comparamos con las regiones codificantes del ADN ribosomal, que cambia a razón de  $0.8 \times 10^{-10}$  a  $4 \times 10^{-10}$  sustituciones por sitio por año, equivalente a una variación de 0.8 a 4% cada 100 millones de años (Bargues *et al.*, 2000).

Tal variación es consistente con la encontrada entre las secuencias A, B y C, y la secuencia divergente, lo que sugiere que aun dentro de las poblaciones es posible una alta variación genética, ya que la secuencia C y la divergente se encontraron en *L. texamus* de la laguna de Alvarado. Sin embargo el análisis filogenético coloca en un mismo clado a las secuencias A de Apalache y B de Atasta y Tamiahua, a pesar de que estas últimas poblaciones están a 2240 y 3250 kilómetros de Apalache. Lo anterior sugiere que anteriormente había un gran polimorfismo en el ITS1, que se mantenía a lo largo de todo el Golfo de México.

## Flujo génico en el pasado

La existencia del flujo génico que mantenía cierta cohesión entre las poblaciones del rizocéfalo, es posible gracias a diferentes características biológicas del hospedero, así como a las corrientes de agua dulce presentes en el Golfo de México. Por lo que se propone un modelo que explica la migración de *L. texanus*.

Las jaibas son infectadas por *L. texanus* al encontrarse como megalopas, juveniles o adultos (Høeg, 1995; Walker *et al.*, 1992), lo cual sugiere que la migración de este parásito entre diferentes sistemas lagunares debió llevarse a cabo durante la fase de interna; al no ser posible durante cualquier estadio planctónico, o después del surgimiento de la externa.

La dispersión en jaibas de la especie *C. sapidus*, se ha observado principalmente en hembras, ya que éstas tienen la capacidad de efectuar migraciones de hasta 800 km, que es lo que se ha registrado a lo largo de la costa de Florida (McMillen-Jackson *et al.*, 1994). El flujo génico de tales jaibas en el Golfo de México fue comprobado mediante alozimas por McMillen-Jackson *et al.* (1994), al encontrar una gran homogeneidad genética, y una falta de estructura poblacional. Aunque esto lo atribuyen principalmente al flujo génico causado por la dispersión de las jaibas en estado larval, fue posible detectar que cierta parte de la transferencia de genes se debe a la migración realizada por los adultos a lo largo de grandes distancias. Lo mismo encontraron Schubart *et al.* (2001), en la jaiba de la especie *Callinectes bocourti*, que es ecológica y genéticamente cercana a *C. sapidus*, al no descubrir divergencia en el gen mitocondrial 16S, entre diferentes haplotipos de dos poblaciones separadas 350 km, en Venezuela.

Ya que la fase interna del rizocéfalo, tiene una duración de entre 25 y 27 días (Walker *et al.*, 1992), las jaibas infectadas no podrían realizar migraciones muy largas. Sin embargo, solo se necesita un migrante por generación para que no exista divergencia genética entre dos poblaciones con un número efectivo alto (Silva y Russo, 2000). Esto es posible debido a que el tiempo generacional del parásito es de alrededor de 50 días (Høeg, 1995). No obstante el tamaño efectivo no ha sido determinado en poblaciones de *L. texanus*.

Tal migración debió darse de una laguna a la más próxima adyacente, pues en poblaciones panmixicas o metapoblaciones, la variación es menor si se da entre aquellas que están más cercanas, mientras que las diferencias se incrementan si el intercambio de migrantes se efectúa entre todas las poblaciones al mismo tiempo (Butlin y Menozzi, 2000; Silva y Russo, 2000; Waples, 1998). Por lo tanto, lo observado para *L. texanus* en el Golfo de México se ajusta a un modelo de poblaciones abiertas con una gran cantidad de migrantes entre poblaciones con un número efectivo alto (Hellberg *et al.*, 2002).

La migración de jaibas infectadas debió ser alta debido al efecto causado por las regiones de influencia de agua dulce (ROFI por sus siglas en inglés); que de manera general, tienden a formar un flujo de agua dulce proveniente de los esteros, que en el Hemisferio Norte va en dirección a la derecha con respecto a la boca del sistema; debido al efecto de Coriolis. En ciertas condiciones de mezcla y en temporada de lluvia, este flujo puede ser estable y extenderse por varios kilómetros (Simpson, 1997). Esto se ha estudiado en el Golfo de México, en la pluma del río Mississippi, donde durante todo el año, agua con salinidades de entre 10 y 25 ‰ baña la costa del estado de Louisiana, 10 km mar adentro (Hitchcock *et al.*, 1997; Wiseman *et al.*, 1997). Esto incrementa la migración de las larvas del pez *Brevoortia patronus*, que dependen de los sistemas estuarinos para su supervivencia (Govoni, 1997). Además, las regiones de influencia del agua dulce tienen un mayor rango de alcance en temporadas en las que se presentan cambios climáticos drásticos como los ocasionados por los fenómenos de El Niño/La Niña, al provocar un incremento en la cantidad de lluvia (Yungkul y Powell, 1998).

Un ejemplo de este tipo de migración se puede observar en el saculínido *Heterosaccus dollfusi*, que es parásito del portúnido *Charibdis longicollis*. Este cangrejo se distribuye en el Mediterráneo a lo largo de la costa norte de África, Israel, Turquía y Chipre, además del Mar Rojo. Sin embargo, tras más de 10 años de colecta, no se había reportado la presencia del parásito en el mar Mediterráneo, sino hasta 1994. Entre 1994 y 1995 Øksnebjerg *et al.* (1997) registraron una gran cantidad de cangrejos parasitados en diferentes poblaciones de Turquía. *Heterosaccus dollfusi* habita en sistemas estuarinos, por lo que estos autores proponen que el parásito pudo ser transportado por el hospedero desde el Golfo de Suez.

### **Cuello de botella**

La variación encontrada en el presente es baja si se toma en cuenta la variación entre las secuencias A, B y C y que la secuencia divergente solo se encontró en una población. Lo anterior sugiere que las poblaciones pasaron por un cuello de botella que ocasionaron que el polimorfismo existente anteriormente fuera eliminado quedando solo una forma del ITS1. Esto ocurre en poblaciones donde existiendo un alto polimorfismo, disminuye drásticamente el número de individuos y de los alelos restante, alguno incrementa su frecuencia debido a la deriva génica y al efecto de fundador (Hedrick, 2000).

En el caso de *L. texanus* esto podría deberse a lo efímero de las lagunas costeras en el tiempo geológico, ya que los sistemas lagunares mexicanos tienen una antigüedad de apenas 5 mil años que fue cuando el nivel del mar llegó a su nivel actual y se formaron la mayoría de las barreras y depresiones hoy existentes (Castañeda y Contreras, 1994a; 1994b). La ausencia de diversidad genética es común en organismos que invaden un nuevo lugar con un pequeño número de colonizadores (Sakai *et al.*, 2001).

La secuencia divergente encontrada en algunos individuos de Alvarado, aparece en el cladograma como un polimorfismo ancestral del que se originan el clado AB y la secuencia C. Esta variedad del ITS1 podría encontrarse en las otras poblaciones si se tomara una muestra mas amplia, ya que es posible que sea un remanente de la antigua diversidad genética de esta región ribosomal. El que se conserven restos de un anterior polimorfismo, ocurre en poblaciones que han cambiado drásticamente su tamaño poblacional en el tiempo, ya mas una variedad pudo haber pasado por el cuello de botella aunque esta se encuentre en una frecuencia baja (Arbogast *et al.*, 2002).

### **Divergencia reciente**

A pesar de la falta de relación entre la diferencia genética y la distancia geográfica y a que poblaciones tan distantes como Apalache y Atasta cuenten con tipos de secuencias muy relacionadas, el mismo ITS1 se encuentra en todos los organismos de *L. texanus* de las lagunas de Alvarado, El Carmen y Sontecomapan, lo que parece indicar que las poblaciones de esta zona del Golfo de México están teniendo una diferenciación del resto. Pues aunque se ubican muy cerca la una de la otra (entre 90 y 240 km), El Carmen está a solo 260 km de Atasta y Alvarado a 350 km de Tamiahua. Estando la secuencia de última y Atasta más relacionadas al ITS1 encontrado en Apalache.

Sin embargo es necesario utilizar otros marcadores moleculares que tengan una mayor resolución. Una opción son los genes mitocondriales, como el 16S (Bucklin y Wiebe, 1998; France y Kocher, 1996; Schubart *et al.*, 2000; Schubart *et al.*, 2001), o la subunidad I de la citocromo oxidasa (Chu *et al.*, 1999; Meyran y Taberlet, 1998; Mokady *et al.*, 2000), que ya han sido probados en crustáceos, o el análisis combinado de datos (Chu *et al.*, 2003; Glenner *et al.*, 2003), ya que los resultados basados en marcadores mitocondriales suelen diferir de los obtenidos a partir de genes del núcleo, puesto que tienen un diferente origen, estructura y mecanismo hereditario (Avice, 1994; Hillis *et al.*, 1996b).

## CONCLUSIONES

La longitud del espaciador transcrito interno fue de entre 239 pares de bases en las poblaciones de Alvarado, Sontecomapan y El Carmen; de 237 en Tamiahua y Atasta; y de 235 en Apalache.

No se presentó variación alguna en la secuencia de nucleótidos del ITS1, dentro de cada población.

Se registró la presencia de una secuencia divergente del ITS1 dentro de la población de Alvarado, que difirió en el 15.5% de los nucleótidos.

La variación en el ITS1 de *L. texanus*, fue de 0 a 4 sitios, entre las diferentes poblaciones, consistiendo en inserciones/deleciones de nucleótidos.

No existe una relación entre diferencia genética en el ITS1 y distancia geográfica de las poblaciones de *L. texanus*.

Pudo existir en el pasado un polimorfismo en el ITS1 de *L. texanus* que era mantenido en todo el Golfo de México gracias al flujo génico.

Las poblaciones de *L. texanus* pasaron por un cuello de botella que redujo la diversidad en el ITS1.

El ITS1 de las poblaciones de *L. texanus* en las lagunas de Alvarado, Sontecomapan y El Carmen se encuentran en un proceso de diferenciación del resto.

Se sugiere utilizar otros marcadores moleculares, como los mitocondriales 16S y la subunidad I de la citocromo oxidasa (COI).

## LITERATURA CITADA

- Alvarado, A. C. J. y A. A. Granados. 1991. Las jaibas del género *Callinectes* de la laguna Mecoacán, Paraíso, Tabasco, México. *Resúmenes del XI Congreso Nacional de Zoología*. Cartel. 13.
- Álvarez, F. y J. Calderón. 1996. Distribution of *Loxothylacus texanus* (Cirripedia: Rhizocephala) parasitizing crabs of the genus *Callinectes* in the southwestern Gulf of Mexico. *Gulf Research Reports* 9 (3): 205-210.
- Álvarez, F., A. Gracia, R. Robles y J. Calderón. 1999. Parasitization of *Callinectes rathbunae* and *Callinectes sapidus* by the rhizocephalan barnacle *Loxothylacus texanus* in Alvarado Lagoon, Veracruz, Mexico. *Gulf Research Reports* 11: 15-21.
- Andreasen, K. y B. G. Baldwin. 2001. Unequal evolutionary rates between annual and perennial lineages of checker mallows (*Sidalcea*, Malvaceae): Evidence from 18S–26S rDNA internal and external transcribed spacers. *Molecular Biology and Evolution* 18 (6): 936–944.
- Arbogast, B. S., S. V. Edwards, J. Wakeley, P. Beerli y J. B. Slowinski. 2002. Estimating Divergence Times from Molecular Data on Phylogenetic and Population Genetic Timescales. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33:707-740.
- Avise, J.C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall, New York, 511 p.
- Avise, J.C. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Crambridge, Massachusetts, 447 p.
- Bargues, M. D., A. Mancilla, J. M. Ramsey, J. P. Dujardin, C. J. Schofield y S. Mas-Coma. 2000. Nuclear rDNA-based molecular clock of the evolution of *Triatominae* (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 95 (4): 567-573.
- Baverstock, P. R. y C. Moritz 1996. Project Design. pp 17-27. En: *Molecular Systematics*. Hillis, D. M., C. Moritz y B. K. Mable (eds). Sinauer Associates, Inc. Massachusetts, U.S.A, 2ª ed, 655 p.
- Boyer, S. L., V R. Flechtner y J R. Johansen. 2001. Is the 16S–23S rRNA Internal Transcribed Spacer Region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in cyanobacteria. *Molecular Biology and Evolution* 18 (6): 1057–1069.



Brendonck, L., L. De Meester y B. J. Riddoch. 2000. Regional structuring of genetic variation in short-lived rock pool populations of *Branchipodopsis wolffi* (Crustacea: Anostraca). *Oecologia* 123: 506-515.

Britton, J. C. y B. Morton. 1989. *Shore Ecology of the Gulf of Mexico*. University of Texas Press. Austin, 387 p.

Bucklin, A. y P. H. Wiebe. 1998. Low mitochondrial diversity and small effective population sizes of the copepods *Calanus finmarchicus* and *Nannocalanus minor*: Possible impact of climatic variation during recent glaciation. *Journal of Heredity* 82 (5): 383-392.

Butlin, R. K. y P. Menozzi. 2000. Open questions in evolutionary ecology: do ostracods have the answers? *Hydrobiologia* 419: 1-14.

Castañeda, O. L. y F. E. Contreras. 1994a. Golfo de México I (De Tamaulipas a Veracruz). En: *Bibliografía comentada sobre Ecosistemas Costeros Mexicanos, Vol. III*. CONABIO/UAM/CDELM. México, 615 p.

Castañeda, O. L. y F. E. Contreras. 1994b. Golfo de México II (De Tabasco a Quintana Roo). En: *Bibliografía comentada sobre Ecosistemas Costeros Mexicanos, Vol. IV*. CONABIO/UAM/CDELM. México, 600 p.

Castañeda, O. L. y F. E. Contreras. 1995. *Ecosistemas Costeros Mexicanos*. CONABIO/UAM/ Publicaciones Electrónicas PEMSA. México.

Charniaux-Cotton, H. 1960. Sex Determination. pp 411-447. En: *The Physiology of Crustacea, Volume 1: Metabolism and Growth*. Waterman, T. H. (ed). Academic Press, Inc. New York, 670 p.

Chu, K. H., C. P. Li y H. Y. Ho. 2001. The first internal transcribed spacer (ITS-1) of ribosomal DNA as a molecular marker for phylogenetic and population analyses in Crustacea. *Marine Biotechnology* 3: 355-361.

Chu, K. H., H. Y. Ho, C. P. Li y T. Y. Chan. 2003. Molecular phylogenetics of the mitten crab species in *Eriocheir*, sensu *Lato* (Brachyura: Grapsidae). *Journal of Crustacean Biology* 23 (3): 738-746.

Chu, K. H., J. Tong y T-Y. Chan. 1999. Mitochondrial cytochrome oxidase I sequence divergence in some Chinese species of *Charybdis* (Crustacea: Decapoda: Portunidae). *Biochemical Systematics and Ecology* 27: 461-468.

De la Fuente, F. J. A. 1994. *Zoología de Artrópodos*. McGrawHill-Interamericana. Madrid, 805 p.

Dessauer, H. C., R. A. Menzies y D. E. Fairbrithers. 1984. Procedures for collecting and preserving tissues for molecular studies. pp 21-24. En: *Collections of Frozen Tissues: Value, Management, Field and Laboratory Procedures, and Directory of Existing*

*Collections*. Dessauer, H. C. y M. S. Hafner (eds). Association of Systematics Collection. Kansas, U. S. A, 74 p.

Dessauer, H. C., C. J. Cole y M. S. Hafner 1996. Collection and storage of tissues. pp 29-47. En: *Molecular Systematics*. Hillis, D. M., C. Moritz and B. K. Mable (eds). Sinauer Associates, Inc. Massachusetts, U.S.A, 2ª ed., 655 p.

Fernald, E. A. y E. D. Purdum (eds.). 1992. *Atlas of Florida*. University Press of Florida. Gainesville, 280 p.

France, S. C. y T. D. Kocher. 1996. Geographic and bathymetric patterns of mitochondrial 16S rRNA sequence divergence among deep-sea amphipods, *Eurythenes gryllus*. *Marine Biology* 126: 633-643.

García, E. 1973. *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana)*. 2ª ed. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 246 p.

Gerbi, S. A. 1985. Evolution of ribosomal DNA. pp 419-517. En: *Molecular Evolutionary Genetics*. McIntyre, R. J. (ed). Plenum Press, New York, 610 p.

Glenner, H. 2001. Cypris metamorphosis, injection and earliest internal development of the rhizocephalan *Loxothylacus panopaei* (Gissler). Crustacea: Cirripedia: Rhizocephala: Sacculinidae. *Journal of Morphology* 249: 43-75.

Glenner, H., J. Lützen y T. Takahashi. 2003. Molecular and morphological evidence for a monophyletic clade of asexually reproducing rhizocephala: *Polysacus*, new genus (Cirripedia). *Journal of Crustacean Biology* 23 (3): 548-557.

Govoni, J. J. 1997. The association of the population recruitment of gulf menhaden, *Brevoortia patronus*, with Mississippi River discharge. *Journal of Marine Systems* 12: 101-108.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.

Hartnoll, R. G. 1982. Growth. pp 111-196. En: *The Biology of Crustacea, Volume 2: Embryology, Morphology and Genetics*. Abele, L. G. (ed). Academic Press, Inc. London, 440 p.

Harris, D. J. et al. 2000. Intragenomic variation within ITS1 and ITS2 of freshwater crayfishes (Decapoda: Cambaridae): Implications for phylogenetic and microsatellite studies. *Molecular Biology and Evolution* 17 (2): 284-291.

Hedrick, P. W. 2000. *Genetics of Population*. Jones and Bartlett Publishers. Massachusetts, U.S.A, 2ª ed, 553 p.

- Hellberg, M. C., R. S. Burton, J. E. Neigel y S. R. Palumbi. 2002. Genetic assessment of connectivity among marine populations. *Bulletin of Marine Science* 70 (1): Suppl: 273-290.
- Hitchcock, G. L., W. J. Wiseman Jr., W. C. Boicourt, A. J. Mariano, N. Walker, T. A. Nelsen y E. Ryan. 1997. Property field in a effluent plume of the Mississippi river. *Journal of Marine Systems* 12: 109-126.
- Hillis, D. M., B. K. Mable, A. Larson, S. K. Davis y E. A. Zimmer. 1996a. Nucleic Acids IV: Sequencing and Cloning. pp 321-381. En: *Molecular Systematics*. Hillis, D. M., C. Moritz y B. K. Mable (eds). Sinauer Associates, Inc. Massachusetts, U.S.A, 2ª ed, 655 p.
- Hillis, D. M., B. K. Mable y C. Moritz. 1996b. Applications of molecular systematics: The state of the field and a look to the future. pp 515-543. En: *Molecular Systematics*. Hillis, D. M., C. Moritz y B. K. Mable (eds). Sinauer Associates, Inc. Massachusetts, U.S.A, 2ª ed, 655 p.
- Hillis, D. M. y M. T. Dixon. 1991. Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology* 66 (4): 411-453.
- Høeg, J. T. 1995. The biology and life cycle of the Rhizocephala (Cirripedia). *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom* 75: 517-550.
- Jorgensen, R. A. y P. D. Cluster. 1988. Modes and tempos in the evolution of nuclear ribosomal DNA: new characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 8: 189-191.
- Kumar, S., K. Tamura, I. B. Jakobsen y M. Nei. 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
- LaJeunesse, T. C. 2002. Diversity and community structure of symbiotic dinoflagellates from Caribbean coral reefs. *Marine Biology* 141: 387-400.
- Leo, N. P. y S. C. Barker. 2002. Intragenomic variation in ITS2 rDNA in the louse of humans, *Pediculus humanus*: ITS2 is not a suitable marker for population studies in this species. *Insect Molecular Biology* 11 (6):651-657.
- Liao, D. 1999. Concerted evolution: molecular mechanism and biological implications. *American Journal of Human Genetics* 64: 24-30.
- Lorán, R. M., A. J. Valdez, F. Escudero y M. Corro. 1992. Algunos aspectos poblacionales de las jaibas *Callinectes* sp. en la laguna de Alvarado, Veracruz. *Resúmenes del IX Congreso Nacional de Oceanografía*, 165 p.
- McMillen-Jackson, A, T. M. Bert y P. Steele. 1994. Population genetics of the crab *Callinectes sapidus*: modest population structuring in a background of high gene flow. *Marine Biology* 118 (1): 53-65.

Meyran, J. C. y P. Taberlet. 1998. Mitochondrial DNA polymorphism among alpine populations of *Gammarus lacustris* (Crustacea, Amphipoda). *Freshwater Biology* 39: 259-265.

Microsoft Corporation. 1996-2000. Atlas Mundial Microsoft Encarta. U. S. A.

Mokady, O., L. Mizrahi, R. Perl-Treves y Y. Achituv. 2000. The different morphs of *Chthamalus anisopoma*: a phenotypic response? Direct molecular evidence. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 243: 295-304.

Murphy, N. E. y C. L. Goggin. 2000. Genetic discrimination of sacculinid parasites (Cirripedia, Rhizocephala): Implication for control of introduced green crabs (*Carcinus maenas*). *Journal of Crustacean Biology* 20 (1): 153-157.

Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York, 512 p.

Nielsen, R. y J. Wakeley. 2001. Distinguishing migration from isolation: A Markov Chain Monte Carlo Approach. *Genetics* 158:885-896.

Øksnebjerg, B. 2000. The Rhizocephala (Crustacea: Cirripedia) of the Mediterranean and Black Seas: Taxonomy, Biogeography, and Ecology. *Israel Journal of Zoology* 46: 1-102.

Øksnebjerg, B., R. Enzenross y L. Enzenross. 1997. First record of rhizocephala (Crustacea: Cirripedia) from Turkish waters, with notes on Lessepsian migration. *Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde Serie A (Biologie)* 55: 1-7.

Palumbi, S. R. 1996. Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction. pp 205-247. En: *Molecular Systematics*. Hillis, D. M., C. Moritz y B. K. Mable (eds). Sinauer Associates, Inc. Massachusetts. U.S.A, 2<sup>a</sup> ed, 655 p.

Peter, C. H. y R. J. Abbott. 2001. Molecular phylogeography, reticulation and lineage sorting in Mediterranean *Senecio* Sect. *Senecio* (Asteraceae). *Evolution* 55 (10): 1943-1962.

Presa, P., B. G. Pardo, P. Martínez y L. Bernatchez. 2002. Phylogeographic congruence between mtDNA and rDNA ITS markers in brown trout. *Molecular Biology and Evolution* 19 (12): 2161-2175.

QIAGEN. 2003. QIAGEN Product Guide 2003. 481 p.

Reyes, R. R. 1989. Contribución al conocimiento de la biología de las jaibas *Callinectes sapidus* Rathbun y *C. rathbunae* Contreras, en la laguna de Pueblo Viejo, México. Tesis profesional. UABC, 82 p.

Ruppert, E. E. y R. D. Barnes. 1996. *Zoology of Invertebrates*. McGrawHill-Interamericana. New York, 6a ed, 1089 p.

Sakai, A. K., F. W. Allendorf, J. S. Holt, D. M. Lodge, J. Molofsky, K. A. With, S. Baughman, R. J. Cabin, J. E. Cohen, N. C. Ellstrand, D. E. McCauley, P. O'Neil, I. M. Parker, J. N. Thompson y S. G. Weller. 2001. The Population Biology of Invasive Species. *Annual Review of Ecology and Systematics* 32:305-332.

Saiki, R., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis y H. A. Erlich. 1988. Primer directed enzymatic amplifications of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.

Sang, T. C., D. J. Crawford, S. C. Kim y T. F. Stuessy. 1994. Radiation of the endemic genus *Dendroseris* (Asteraceae) on the Juan Fernandez Islands: evidence from sequences of the ITS regions of nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany* 81 (1): 1494-1501.

Schizas, N. V., G. T. Street, B. C. Coull, G. T. Chandler y J. M. Quattro. 1999. Molecular population structure of the marine benthic copepod *Microarthridion littorale* along the southeastern and gulf coast of the USA. *Marine Biology* 135: 399-405.

Schubart, C. D., J. E. Conde, C. Carmona-Suárez, R. Robles y D. L. Felder. 2001. Lack of divergence between 16S mtDNA sequences of the swimming crabs *Callinectes bocourti* and *C. maracaiboensis* (Brachyura: Portunidae) from Venezuela. *Fishery Bulletin* 99 (3): 475-481.

Schubart, C. D., J. Niegel y D. L. Felder. 2000. Use of the mitochondrial 16S rRNA gene for phylogenetic and population studies of Crustacea. *Crustacean Issues* 12: 817-830.

Schulenburg J. H. G. v. d. y J. W. Wägele. 1998. Molecular characterisation of digenetic trematodes associated with *Cyathura carinata* (Crustacea: Isopoda) with a note on the utility of 18S ribosomal DNA for phylogenetic analysis in the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). *International Journal of Parasitology* 28: 1425-1428.

Silva, E. P. y C. A. M. Russo. 2000. Techniques and statistical data analysis in molecular population genetics. *Hydrobiologia* 420: 119-135.

Simpson, J. H. 1997. Physical processes in the ROFI regime. *Journal of Marine Systems* 12: 3-15.

Spears, T., L. G. Abele y M. A. Applegate. 1994. Phylogenetic study of cirripedes and selected relatives (Thecostraca) based on 18S rDNA sequence analysis. *Journal of Crustacean Biology* 14: 641-656.

Swofford, D.L. y D.P. Begle. 1993. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony: User's manual*. Center for Diversity, Illinois Natural History Survey.

Tang, J., L. Toè, C. Back y T. R. Unnasch. 1996. Intra-specific heterogeneity of the rDNA internal transcribed spacer in the *Simulium damnosum* (Diptera: Simuliidae) complex. *Molecular Biology and Evolution* 13 (1): 244-252.

- Vanoverbeke, J., y L. De Meester. 1997. Among-population genetic differentiation in the cyclical parthenogen *Daphnia magna* (Crustacea, Anomopoda) and its relation to geographic distance and clonal diversity. *Hydrobiologia* 360: 135-142.
- Vázquez, L. H. 2002. Desarrollo larval del cirripedio parásito *Loxothylacus texanus* en condiciones de laboratorio. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, 69 p.
- Wakeley, J. 1996a. The variance of pairwise nucleotide differences in two population with migration. *Theoretical Population Biology* 49: 39-57.
- Wakeley, J. 1996b. Distinguishing migration from isolation using the variance of pairwise differences. *Theoretical Population Biology* 49: 369-386.
- Walker, G. 2001. Introduction to the Rhizocephala (Crustacea: Cirripedia). *Journal of Morphology* 249: 1-8.
- Walker, G. y A. S. Clare. 1994. The effect of salinity on the development of *Loxothylacus panopaei* larvae (Crustacea: Cirripedia: Rhizocephala). *Estuaries* 17(1B): 276-282.
- Walker, G., A. S. Clare, D. Rittschof y D. Mensching. 1992. Aspects of the life-cycle of *Loxothylacus panopaei* (Gissler), a sacculinid parasite of the mud crab *Rhithropanopeus harrisi* (Gould). *Journal of Experimental Marine Ecology* 157: 181-193.
- Waples, R. S. 1998. Separating the wheat from the chaff: Patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *Journal of Heredity* 89: 438-450.
- Weber, L. I. y J. A. Levy. 2000. Genetic structure of the swimming crab *Callinectes danae* (Crustacea: Decapoda) in southern Brazil. *Hydrobiologia* 420: 203-210.
- Weber, L. I., R. G. Hartnoll y J. P. Thorpe. 2000. Genetic divergence and larval dispersal in two spider crabs (Crustacea: Decapoda). *Hydrobiologia* 420: 211-219.
- Wiseman W. J., N. N. Rabalais, R. E. Turner, S. P. Dinnel y A. MacNaughton. 1997. Seasonal and interannual variability within the Louisiana coastal current: stratification and hypoxia. *Journal of Marine Systems* 12: 237-248.
- Yungkul, K. y E. N. Powell. 1998. Influence of climate change on interannual variation in population attributes of gulf of Mexico oysters. *Journal of Shellfish Research* 17 (1): 265-274.