



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

Genética poblacional del calamar gigante  
(*Dosidicus gigas*)

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

**Edson Sandoval Castellanos**

DIRECTOR DE TESIS: **Dr. Manuel Uribe Alcocer**

MÉXICO, D.F.

Febrero, 2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

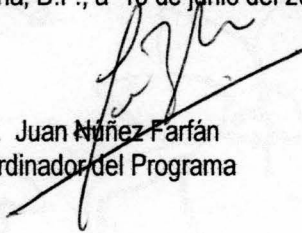
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

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 12 de febrero del 2007, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de DOCTOR EN CIENCIAS del alumno **EDSON SANDOVAL CASTELLANOS** con número de cuenta **93293334**, con la tesis titulada: "**Genética poblacional de calamar gigante ( Dosidicus gigas)**", bajo la dirección del **Dr. Manuel Uribe Alcocer**.

Presidente:	Dr. Juan Núñez Farfán
Vocal:	Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns
Vocal:	Dr. Daniel I. Piñero Dalmau
Vocal:	Dra. Ella Vázquez Domínguez
Secretario:	Dr. Manuel Uribe Alcocer
Suplente:	Dr. Píndaro Díaz Jaimes
Suplente:	Dr. Luis Medrano González

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 15 de junio del 2007.

  
Dr. Juan Núñez Farfán  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

## AGRADECIMIENTOS

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca completa que me otorgo de 2001 a 2005 para llevar a cabo mis estudios de doctorado.

Gracias a la Dirección General de estudios de Posgrado (DGEP) por la beca complementaria que me otorgo de 2001 a 2005 para llevar a cabo mis estudios de doctorado y por la beca otorgada para llevar a cabo una estancia de investigación durante el primer semestre del 2006.

Gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM que financió el proyecto IN215901 del cual formó parte este trabajo.

Dedico mi más sincero agradecimiento y admiración a mi director de tesis, el Dr. Manuel Uribe Alcocer, no solo por el invaluable apoyo académico, profesional y personal que hicieron posible este trabajo, sino por su apertura, paciencia y la amistad que me dispensó durante este tiempo.

Agradezco el inmenso apoyo académico y personal que recibí del resto de mi comité tutorial: el Dr. Luis Medrano González y el Dr. Juan Núñez Farfán, quienes siempre estuvieron dispuestos para brindarme ayuda, orientación y el trato amigable, sencillo y personal que los caracteriza.

También agradezco al resto de los sinodales: la Dra. Ella Vázquez Domínguez, el Dr. Píndaro Díaz Jaimes, el Dr. Daniel I. Piñero Dalmau y el Dr. Luis E. Eguiarte Fruns, por sus dedicadas revisiones y atinados comentarios, mismos que permitieron cristalizar el objetivo de este trabajo.

A la Mra. Carmen Yamashiro, al Biólogo Ricardo Tafur, al Dr. Vicente Anislado y a la Mra. Evangelina Castillo por la ayuda y muestras proporcionadas, sin los cuales, no hubiera sido posible cumplir cabalmente con los objetivos de este trabajo.

A todos los compañeros del Laboratorio de Genética de Organismos Acuáticos del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM les agradezco por su amistad y por haberme permitido durante más de cinco años compartir mucho mas que el espacio.

A todo el personal del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología cuyo esfuerzo permite la correcta realización de los proyectos del instituto, incluido el que aquí se presenta.

Agradezco de manera emotiva y especial a mi familia, por el apoyo incondicional que he tenido de ellos desde que tengo memoria. A mis hermanos Hugo y Jair por ese tipo de apoyo

que trasciende la amistad. Pero sobre todo a mis padres Hugo Sandoval y Maria Yolanda Castellanos, y a mi abuela materna Elodia Escandón, por haberme dado todo en esta vida.

Agradezco a mis amigos por todo su apoyo y ayuda desinteresada y afectuosa. En especial a Abraham, José Ángel, Hugo, Victor, Orieta (madre), Orieta (hija), Joana, Mrinalini y Nick.

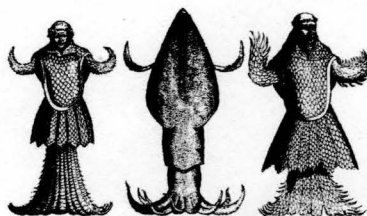
Agradezco a esa persona especial que inesperadamente vino a iluminar mi existencia en las etapas finales de este trabajo.

Finalmente agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por haberse convertido en mi hogar durante tantos años, por haberme permitido ser parte de ella y a la vez haberse convertido en parte esencial de mí ser.

**La Eternidad está enamorada de los frutos del tiempo**

William Blake

Proverbios del Infierno (1972)



## ÍNDICE

<i>i</i>	<b>Resumen</b>	9
<i>ii</i>	<b>Abstract</b>	10
<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	11
	1.1 CALAMARES GIGANTES Y PESQUERÍAS	12
	1.2 IMPORTANCIA PESQUERA DE LOS CEFALÓPODOS	12
	1.3 JUSTIFICACIÓN	15
	1.4 LA PESQUERÍA DEL CALAMAR GIGANTE	16
	1.4.1 Historia de la pesquería	16
	1.4.2 Administración pesquera	17
	1.5 GENÉTICA Y PESQUERÍAS	19
<b>2</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	21
	2.1 EL CALAMAR GIGANTE <i>DOSIDICUS GIGAS</i>	22
	2.1.1 Taxonomía y Sistemática	22
	2.1.2 Distribución y aspectos evolutivos y ecológicos	22
	2.1.3 Poblaciones	26
	2.1.3.1 Crecimiento, migraciones, reproducción y alimentación	27
	2.2 GENÉTICA EVOLUTIVA DE CALAMARES	31
	2.2.1 Genética de poblaciones de calamares oceánicos	31
	2.2.2 Técnicas moleculares	32
	2.2.3 Avances teóricos	33
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	35
	3.1 OBJETIVO GENERAL	36
	3.2 METAS	36
<b>4</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	37
	4.1 MUESTREO	38
	4.2 TÉCNICAS DE LABORATORIO	39
	4.2.1 RAPDs	39
	4.2.2 Técnicas para analizar mtDNA	40
	4.3 ANÁLISIS DE DATOS	41
	4.3.1 Generales	41
	4.3.2 Diversidad genética y molecular	42

4.3.3	Variación temporal, tamaño efectivo de la población y deriva génica	44
4.3.4	Diferenciación intrapoblacional	46
4.3.5	Variación interpoblacional	47
4.3.5.1	Estructura genética, aislamiento por distancia y barreras al flujo génico	47
4.3.6	Información histórica de las poblaciones	48
4.3.6.1	Distribución de desigualdades	48
4.3.6.2	Análisis de relaciones genealógicas	49
4.3.7	Software empleado	50
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>52</b>
5.1	RAPDS	53
5.1.1	Diversidad genética	53
5.1.2	Variación temporal, tamaño efectivo de la población y deriva génica	53
5.1.3	Diferenciación intrapoblacional	55
5.1.4	Diferenciación interpoblacional y estructura genética	55
5.2	ANÁLISIS DE DNA MITOCONDRIAL	59
5.2.1	Diversidad genética y molecular	59
5.2.2	Variación temporal, tamaño efectivo de la población y deriva génica	60
5.2.3	Diferenciación intrapoblacional	61
5.2.4	Diferenciación interpoblacional y estructura genética	62
5.2.5	Información histórica de las poblaciones	66
<b>6</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>70</b>
6.1	VARIACIÓN GENÉTICA Y MOLECULAR	71
6.2	VARIACIÓN TEMPORAL, TAMAÑO EFECTIVO DE LA POBLACIÓN Y DERIVA GÉNICA	73
6.3	VARIACIÓN INTRAPOBLACIONAL	75
6.4	VARIACIÓN INTERPOBLACIONAL Y ESTRUCTURA GENÉTICA	76
6.5	INFORMACIÓN HISTÓRICA DE LAS POBLACIONES	79
6.6	PERSPECTIVAS	82
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>83</b>
	<b>Referencias</b>	<b>86</b>
	<b>Apéndices</b>	<b>96</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

### FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ilustración antigua de un calamar gigante hundiendo un navío	13
<b>Figura 2.</b> Diferentes especies de calamares gigantes a escala	14
<b>Figura 3.</b> Producción de cefalópodos a nivel mundial en los últimos 40 años	15
<b>Figura 4.</b> Producción de <i>D. gigas</i> de 1975 a 2004 en toda su área de distribución	16
<b>Figura 5.</b> Producción de <i>D. gigas</i> de 1975 a 2004 en México, Perú y Chile y eventos El Niño/La Niña	17
<b>Figura 6.</b> Calamares ommastreífinos	23
<b>Figura 7.</b> Distribución de <i>D. gigas</i>	24
<b>Figura 8.</b> Límite de las aguas altamente productivas	24
<b>Figura 9.</b> Trama alimenticia del ecosistema pelágico del Océano Pacífico Oriental tropical	25
<b>Figura 10.</b> Zonas de abundancia de <i>D. gigas</i> en el Pacífico Oriental	26
<b>Figura 11.</b> Esquema de migración de <i>D. gigas</i> en el Golfo de California y aguas adyacentes	28
<b>Figura 12.</b> Esquema de migración de <i>D. gigas</i> en aguas peruanas y adyacentes	29
<b>Figura 13.</b> Localidades de colecta	39
<b>Figura 14.</b> Bandas amplificadas con los iniciadores OPF-14	53
<b>Figura 15.</b> Probabilidades obtenidas con tres pruebas estadísticas aplicadas a las frecuencias alélicas de 74 loci de RAPDs tomadas en dos años consecutivos	54
<b>Figura 16.</b> Dendrograma entre poblaciones (RAPDs)	56
<b>Figura 17.</b> Gráfica de la correlación entre distancias geográficas y distancias genéticas	57
<b>Figura 18.</b> Autocorrelograma obtenido mediante RAPDs	58
<b>Figura 19.</b> Frecuencias de los principales haplotipos de citocromo b encontrados en las localidades muestreadas	63
<b>Figura 20.</b> Dendrograma entre poblaciones (mtDNA)	64
<b>Figura 21.</b> Dendrograma entre poblaciones con las muestras de Perú agrupadas como una sola (mtDNA)	64
<b>Figura 22.</b> Autocorrelograma obtenido mediante mtDNA	65
<b>Figura 23.</b> Distribución de desigualdades de todo el conjunto de muestras y de los muestreos agrupados en Hemisferio Norte y Hemisferio Sur	66-67
<b>Figura 24.</b> Árbol filogenético de los haplotipos detectados en el fragmento de citocromo b analizado	67
<b>Figura 25.</b> Árbol de conexiones mínimas	68
<b>Figura 26.</b> Fenograma de todos los genotipos analizados con RAPDs y secuencias de mtDNA considerando a cada individuo como una OTU	69
<b>Figura 27.</b> Corrientes marinas del Pacífico Oriental	78

## TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Colectas realizadas	<b>38</b>
<b>Tabla 2.</b> Iniciadores empleados y número de loci analizados por cada uno	<b>53</b>
<b>Tabla 3.</b> Estimaciones de variación genética con RAPDs	<b>53</b>
<b>Tabla 4.</b> Estimaciones de $\theta$ entre grupos de talla y probabilidad obtenida con la prueba exacta (RAPDs)	<b>55</b>
<b>Tabla 5.</b> Estimaciones de $\theta$ y probabilidad obtenida con la prueba exacta entre pares de muestras (RAPDs)	<b>56</b>
<b>Tabla 6.</b> Número efectivo de migrantes por generación, $M$ y distancias genéticas basadas en coeficientes de coancestría entre pares de muestras (RAPDs)	<b>56</b>
<b>Tabla 7.</b> Detalles del AMOVA. El agrupamiento probado es el de muestras del Hemisferio Norte contra muestras del Hemisferio Sur (RAPDs)	<b>57</b>
<b>Tabla 8.</b> Estimaciones de diversidad genética y molecular obtenidas con el fragmento de citocromo b mitocondrial analizado y pruebas de neutralidad	<b>60</b>
<b>Tabla 9.</b> Estimaciones de $\theta$ y $F_{STT}$ entre muestras espaciadas temporalmente y probabilidades de tres pruebas estadísticas (mtDNA)	<b>61</b>
<b>Tabla 10.</b> Estimaciones del tamaño efectivo de la población con mtDNA	<b>61</b>
<b>Tabla 11.</b> Estimación de $\theta$ entre grupos de talla y probabilidad obtenida con la prueba exacta (mtDNA)	<b>62</b>
<b>Tabla 12.</b> Estimaciones de $\theta$ y probabilidad obtenida con la prueba exacta entre pares de muestras (mtDNA)	<b>62</b>
<b>Tabla 13.</b> Número efectivo de migrantes por generación, $M$ y distancias genéticas basadas en coeficientes de coancestría entre pares de muestras (mtDNA)	<b>63</b>
<b>Tabla 14.</b> Detalles del AMOVA. El agrupamiento probado es el de muestras del Hemisferio Norte contra muestras del Hemisferio Sur (mtDNA)	<b>65</b>
<b>Tabla 15.</b> Heterocigosis esperada encontrada en diferentes calamares con distintos marcadores moleculares	<b>72</b>

## RESUMEN

La pesquería de *Dosidicus gigas* es la pesquería de invertebrados más importante del Pacífico Oriental. No obstante, su manejo como el de otras pesquerías de cefalópodos presenta dificultades en su manejo debido a que su ciclo de vida es muy corto, sus poblaciones presentan grandes fluctuaciones y se tiene un conocimiento muy precario de ellos. Por lo anterior, la estimación de variabilidad genética, así como la definición de la estructura genética poblacional son de vital importancia para el manejo de la pesquería.

Utilizando muestras de nueve localidades del Pacífico Oriental (cinco del Hemisferio Norte y cuatro del Hemisferio Sur), se ensayaron dos técnicas moleculares, análisis de Polimorfismos de DNA Amplificados Aleatoriamente (*Random Amplified Polymorphic DNAs*, RAPDs) y análisis de secuencias de mtDNA, para obtener información acerca de la variación genética, de su distribución geográfica y de los cambios temporales en las frecuencias alélicas así como de algunos de los procesos que moldean dicha variación.

Se detectó variabilidad genética moderada ( $h = 0.238$  RAPDs;  $H = 0.377$  mtDNA), misma que se encuentra homogéneamente distribuida en la mayoría de las localidades muestreadas. Se descartó la existencia de diferencias significativas entre las frecuencias alélicas de muestras tomadas de la misma localidad en diferentes fechas ( $p = 0.122$  a  $1.000$ ) y se realizaron estimaciones de tamaño efectivo de la población que resultaron en cifras elevadas. Tampoco se encontraron evidencias de diferenciación genética entre grupos formados de acuerdo al tamaño de los organismos. La estructura genética detectada divide a las poblaciones en dos grupos bien definidos: el grupo del Hemisferio Sur y el del Hemisferio Norte cuya separación explica entre 2% y 6% de la variación genética detectada (de acuerdo al AMOVA). Dichos grupos mostraron algún grado de diferenciación interna. Una barrera entre hemisferios, los patrones de corrientes marinas y la ubicación de las zonas de desove podrían explicar la diferenciación observada. También se encontraron evidencias que apoyan una expansión espacial y una divergencia reciente entre las poblaciones del Hemisferio Sur y del Hemisferio Norte.

## ABSTRACT

The fishery of *Dosidicus gigas* is the most important invertebrate fishery of the Eastern Pacific. However, its management, like that of other cephalopod fisheries, encounters difficulties derived from their short life cycles, the high demographic fluctuations of the populations and the lack of information of the species. Due to this, the estimation of the genetic variability as well as the determination of population genetic structure can provide elements to improve the fishery management.

Two molecular techniques applied to samples from nine locations of the Eastern Pacific (five in the Northern Hemisphere and four in the Southern Hemisphere), Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs) and analysis of sequences of mtDNA, were used to obtain information about genetic variability, its geographic distribution and temporal changes in allele frequencies as well as some processes that mold such variation.

Moderate genetic variation was detected ( $h = 0.238$  RAPDs;  $H = 0.377$  mtDNA) homogeneously distributed among the sampling localities. Significant changes between the allele frequencies of samples taken from the same locality at different times were rejected ( $p = 0.122$  a  $1.000$ ) and estimations of effective population sizes were high. Genetic differentiation among groups created according to the size of the organisms was rejected too. Detected genetic structure splits the populations in two well defined groups: Southern Hemisphere group and Northern Hemisphere group whose separation accounts for 2% to 6% of the detected genetic variation (according to the AMOVA). Within the groups it was found some population differentiation. Barriers between hemispheres, marine currents patterns, and the location of spawning grounds could explain the differentiation detected. Also, evidence supports an historical spatial expansion and a recent origin of the divergence between Southern Hemisphere and Northern Hemisphere populations.

## **1. INTRODUCCIÓN ,**

## 1.1 CALAMARES GIGANTES Y PESQUERÍAS

En la antigüedad, la aparición de calamares gigantes en alguna red pesquera o playa daba pie a que la imaginación popular ubicara en las inexorables profundidades del océano a gigantescos monstruos marinos responsables de numerosos naufragios (figura 1). Hoy en día este tipo de organismos siguen despertando interés, ya que son de los pocos “monstruos” marinos míticos cuya existencia es real y aunque los calamares gigantes reales no poseen las características más exageradas que se les atribuyó, si alcanzan un tamaño considerable.

Los calamares más grandes pertenecen al suborden Oegopsida que está constituido por todos los calamares oceánicos (Roper et al., 1984). La especie aparentemente más grande pertenece al género *Architeuthis* y alcanza más de cuatro metros de longitud de manto (LM) y hasta 20 metros de longitud total. Existen además otros géneros con especies de gran tamaño como *Moroteuthis* (2 m de LM), *Mesonychoteuthis* (2.5 m de LM) y *Taningia* (1.4 m de LM), (Roper et al., 1984) (figura 2).

Sin embargo, el principal interés por estos organismos proviene de la actividad pesquera pues los calamares oceánicos poseen un potencial de explotación que podría ser superior al de casi cualquier otra especie marina (Caddy, 1983). A pesar de ello, la única especie de calamar gigante que en la actualidad sustenta una pesquería con un grado de desarrollo importante es *Dosidicus gigas*. Su pesquería es considerada como masiva en México y Perú, en donde las capturas han registrado un crecimiento considerable acompañado de una también considerable inestabilidad.

La existencia de este tipo de recursos resulta relevante en un contexto internacional en el que la creciente demanda de alimentos ha llevado a la actividad pesquera a sobrepasar los límites de sustentabilidad de la mayoría de las especies.

## 1.2 IMPORTANCIA PESQUERA DE LOS CEFALÓPODOS

La actividad pesquera en el mundo es una gran generadora de divisas y empleos pero sobre todo, de alimentos ricos en proteínas. Es una alternativa a la agricultura y la ganadería para satisfacer la demanda mundial de alimentos. Sin embargo, la problemática de la actividad pesquera a nivel mundial es compleja.

La sustentabilidad es el problema más importante que debe de resolver una pesquería. Si una pesquería es sustentable, podrá mantenerse la explotación de manera indefinida pero si no, la pesquería se colapsará tarde o temprano. Aunque el colapso de una pesquería no necesariamente significa la desaparición de una población o especie, sí tiene múltiples repercusiones ecológicas, económicas y sociales.

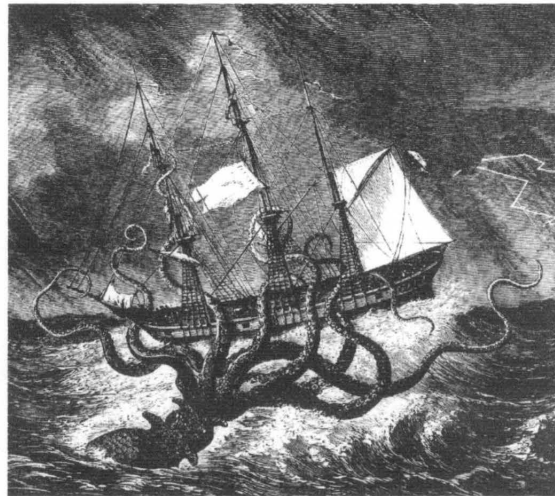
Una referencia para clasificar a una pesquería de acuerdo a su sustentabilidad es el Rendimiento Máximo Sostenible o RMS que es la capacidad máxima que se puede explotar sin que la pesquería deje de ser viable. Tomando esto en cuenta, la FAO clasifica a las pesquerías en tres categorías (FAO, 2001a):

- Pesquerías con potencial de desarrollo, es decir, que están por debajo de su RMS.
- Pesquerías que han alcanzado ya su RMS y son aprovechadas al máximo.
- Pesquerías que han sobrepasado ya su RMS y están en situación de deterioro, colapso o recuperación.

En la actualidad, el número de pesquerías pertenecientes al primer apartado (subexplotadas) representa alrededor del 25% del total, el de explotados al máximo representa alrededor del 47% mientras que el 18% pertenece a la última categoría.

No obstante, el estudio de la problemática pesquera a nivel mundial no debe reducirse a una mera clasificación de las pesquerías sino al análisis de las causas y los factores que podrían minar la sustentabilidad a mediano y largo plazo. Ello incluye el estudio de factores de índole biológica, ecológica, ambiental, social, económica e incluso política. Uno de estos factores es la presencia a nivel mundial, de una flota pesquera excesivamente grande (FSED, 2001).

En la búsqueda de recursos marinos capaces de soportar una explotación intensiva, los cefalópodos resultan doblemente relevantes pues muchas especies tienen un potencial pesquero enorme y nula o escasa explotación. Además presentan características ventajosas como su abundancia, rápido crecimiento y calidad nutricional (Caddy, 1983; Worms 1983). Dicha



**Figura 1. Ilustración antigua de un calamar gigante hundiendo un navío.**

alternativa también permitiría aliviar la presión sobre otros recursos al emplear una flota pesquera originalmente destinada a otras especies.

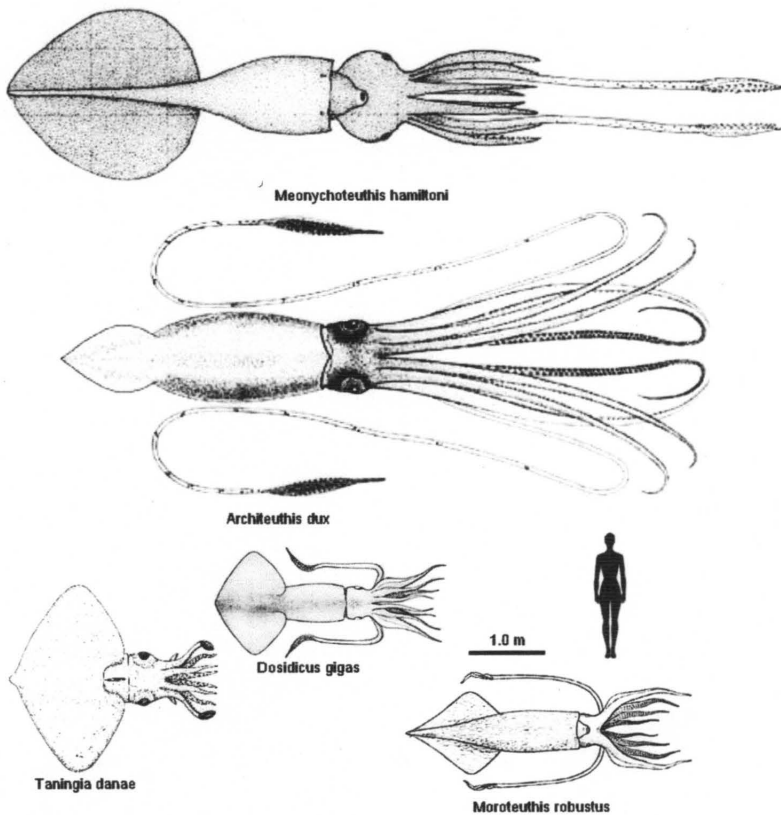
De más de 650 especies de cefalópodos identificadas en el mundo, las más importantes en aspectos pesqueros son los calamares (orden Theutoidea) con las mayores capturas en especies de las familias Loliginidae (suborden Myopsida) y Ommastrephidae (suborden Oegopsida) (Amaratunga, 1983) de la cual se obtiene más de la mitad de las capturas mundiales de calamar (Roper et al., 1984; FAO 2001a).

Según algunas estimaciones, las especies neríticas y demersales de cefalópodos podrían proporcionar una biomasa explotable de 8 a 12 millones de toneladas mientras que en las especies oceánicas habría de 64 a 720 millones de toneladas (Voss, 1974; FAO, 2001b).

Solamente en el Pacífico Occidental se estimó una biomasa explotable de 5.5 a 7.5 millones de toneladas (Dong, 1981).

Estas estimaciones son inmensas aún considerando que la alta tasa de productividad/biomasa de estos organismos derivada de su alta mortandad natural, puede significar que la biomasa explotable sea inferior a la de los peces de similar productividad. Esto implicaría un esfuerzo de pesca mayor y mayores costos de producción (FSED, 2001).

Por otro lado, la producción de cefalópodos en el mundo se ha incrementado en los últimos años (figura 3) siendo bien recibida y rápidamente absorbida por el mercado internacional, debido al fuerte interés de Japón y España, y de los mercados internos, aún en aquellos países



**Figura 2.** *Mesonychoteuthis hamiltoni* (>2.5 m de LM); *Architeuthis dux* (>4 m de LM); *Moroteuthis robustus* (2 m de LM); *Taningia danae* (1.4 m de LM); *Dosidicus gigas* (1.5 m de LM). Tomado de Roper et al. (1984).



que no son consumidores tradicionales de cefalópodos, en donde el consumo de calamar se ha incrementado especialmente en el sector de la comida rápida (FAO, 2001a).

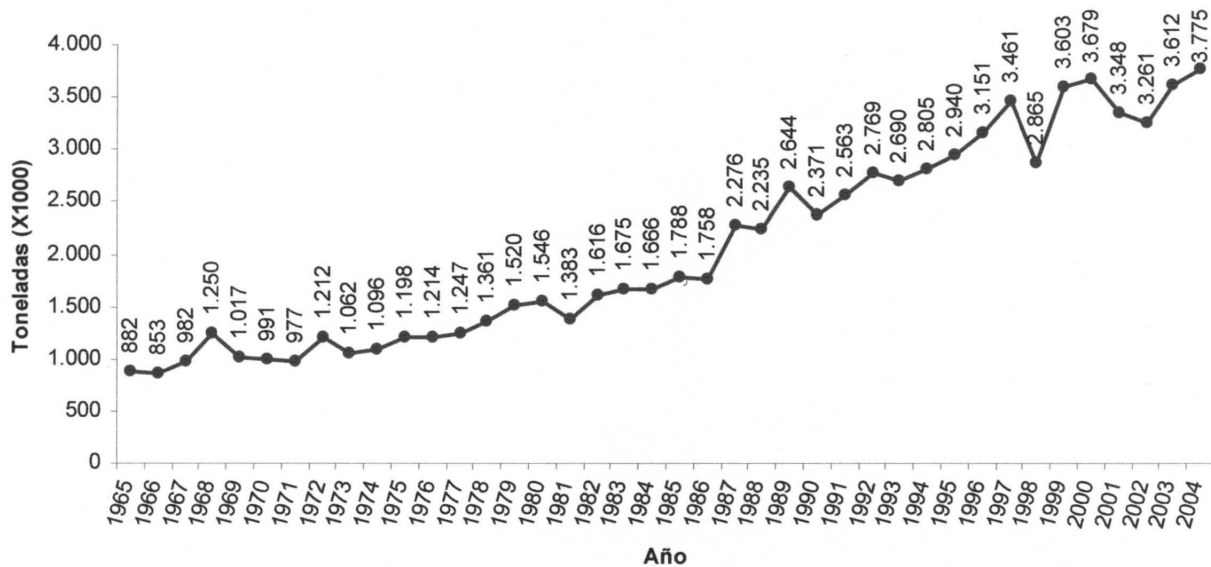


Figura 3. Producción de cefalópodos a nivel mundial en los últimos 40 años (FAO 2001b; FSED, 2001).

### 1.3 JUSTIFICACIÓN

Contar con estudios integrales sobre las poblaciones de *D. gigas*, se convirtió en un asunto relevante para diversas instituciones de México, Perú y de talla internacional como la FAO que impulsaron varios estudios realizados en los años 1980s y 1990s. Dichos estudios obtuvieron información muy útil sobre abundancia, crecimiento, reproducción, migraciones y estructura poblacional aunque pronto se hizo evidente la presencia de una estructura poblacional compleja que incrementó la necesidad de contar con información más profunda y precisa sobre los aspectos ya estudiados e información sobre aspectos no tratados como los genético-poblacionales.

La genética de poblaciones es uno de los rubros que recientemente han cobrado mayor relevancia e influencia en el ámbito de la administración pesquera (Carvalho y Hauser, 1994), y que son considerados como parte de los llamados campos “primarios” de información biológica para la administración de las pesquerías.

El número de puntos no resueltos en la biología de *D. gigas* es grande pero, en opinión de Nigmatullin et al. (2001), los estudios genéticos constituyen uno de los tres puntos más

importantes y urgentes que se necesitan para obtener un conocimiento adecuado para lograr el manejo racional de la pesquería de este organismo.

No obstante lo anterior, este es el primer estudio con marcadores moleculares que incluye muestras de las dos regiones más productivas: la zona del Mar de Perú y el Golfo de California.

## 1.4 LA PESQUERÍA DEL CALAMAR GIGANTE

### 1.4.1 Historia de la pesquería

*D. gigas*, comúnmente llamado calamar de Humboldt o calamar gigante en México, jibia gigante en Chile, pota en Perú y jumbo squid en EUA, es la especie de cefalópodo de mayor importancia pesquera en todo el Pacífico Oriental (Nigmatullin et al., 2001; FAO, 2006). Tan solo en 2004 tuvo un desembarco anual que alcanzó casi 800 mil toneladas (FAO, 2006) (figura 4). Esto la consolidó como una de las pesquerías de cefalópodos más importantes en el mundo, solamente rivalizada por las pesquerías de la pota (nombre dado a los calamares grandes) argentina *Illex argentinus* y la pota japonesa *Todarodes pacificus*.

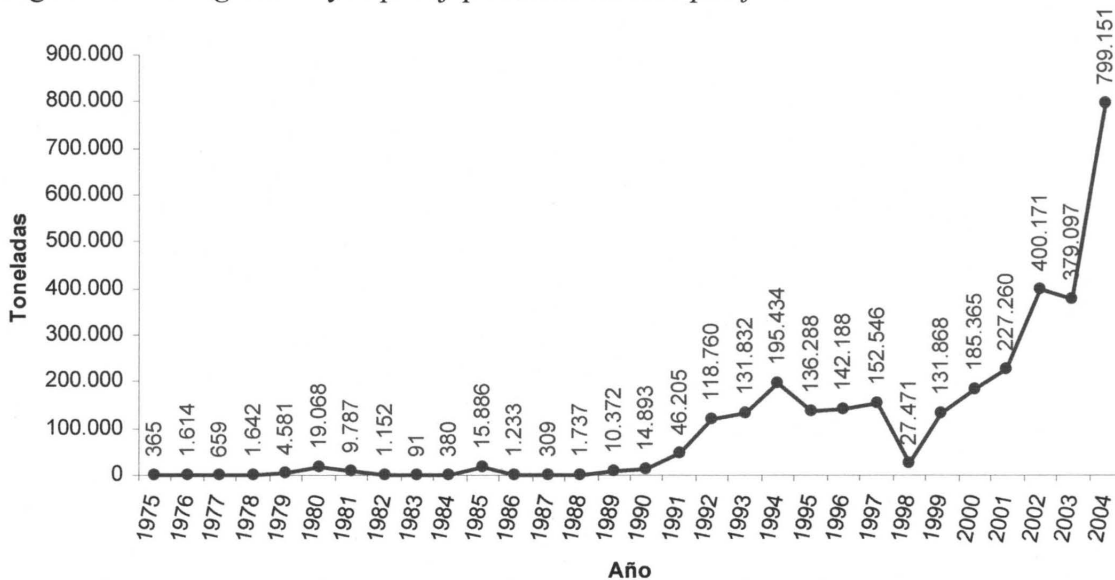


Figura 4. Producción de *D. gigas* de 1975 a 2004 en toda su área de distribución (FAO 2001b; FSED, 2001).

La pesca del calamar gigante comenzó en México en 1974 con una modesta flota artesanal en el Golfo de California. En años posteriores recibió un fuerte impulso con la incorporación de una flota camaronera, cinco buques calamareros japoneses y políticas estatales de

comercialización que llevaron a una producción de 22,464 toneladas en 1980, misma que fue seguida de un colapso en los años 1981 y 1982, paralizando la extracción masiva hasta 1988 (Ehrhardt et al., 1982a; De la Rosa et al., 1996). Posteriormente, la producción aumentó hasta alcanzar capturas record de 108,079 y 121,016 toneladas en 1996 y 1997 continuando con una elevada producción de más de 100 mil toneladas entre 2002 y 2004 (figura 5).

En Perú, la extracción del calamar gigante fue marginal desde 1956 hasta 1989 con volúmenes anuales fluctuando entre 1 y 1,249 toneladas. La pesquería industrial comenzó a operar oficialmente en 1991, después de 21 años de exploración y prospección científica. De 1991 a 1995 las capturas anuales fluctuaron entre 57,707 toneladas y 164,713 toneladas para luego sufrir un colapso en 1998, el cual fue seguido de una producción creciente que alcanzó la cifra récord de 270,368 toneladas en 2004 (figura 5).

Las causas de los colapsos presumiblemente involucran anomalías térmicas debidas a los eventos El Niño/La Niña (figura 5) que impulsan al calamar hacia aguas de otras regiones como Centroamérica.

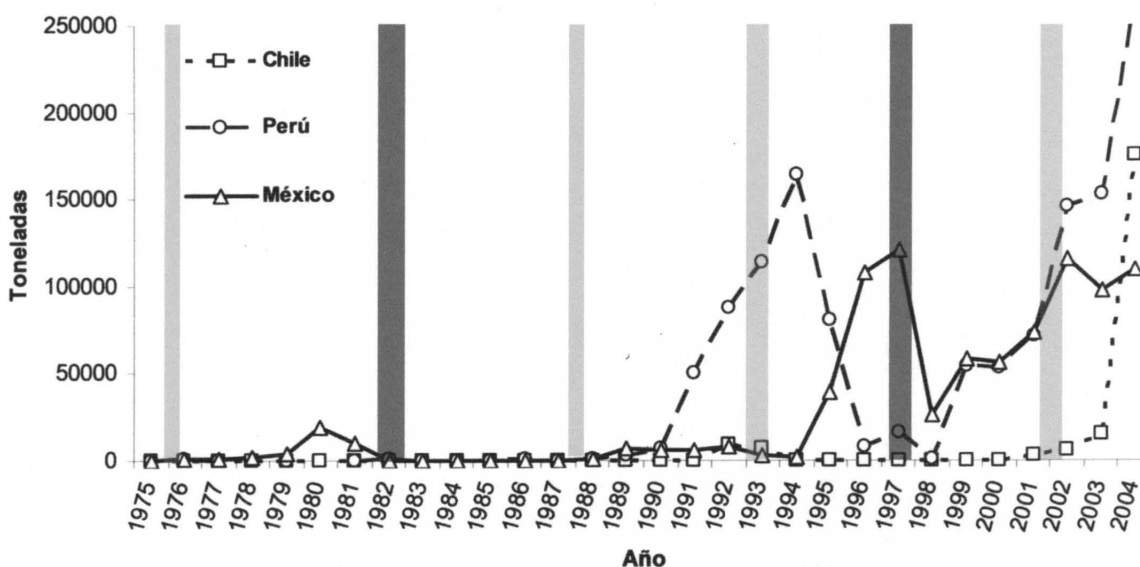


Figura 5. Producción de *D. gigas* de 1975 a 2004 en México, Perú y Chile. Los eventos El Niño/La Niña están mostrados con barras verticales: el gris claro indica un evento poco intenso, el gris oscuro un evento muy intenso (FAO 2001b; FSED, 2001; IMARPE, 2006).

#### 1.4.2 Administración pesquera

El manejo de una pesquería se define como el proceso integrado de recopilación de información, análisis, planeación, consulta, toma de decisiones y formulación e implementación

de reglas que gobiernen la actividad pesquera para asegurar la productividad continua de los recursos y otros objetivos complementarios (FAO, 2002).

Factores como la biología, distribución, movimientos migratorios y comportamiento de las poblaciones determinan la abundancia de un recurso en un determinado tiempo y espacio (FAO, 1975). En los cefalópodos, cuyo tiempo de vida puede ser tan corto como un año, la pesca es estacional y se considera natural la presencia de grandes fluctuaciones (FAO, 1975) por lo que es necesario aplicar medidas con capacidad de respuesta efectiva en períodos muy cortos así como de un monitoreo constante, aunque también deben aplicarse medidas a largo plazo (Caddy, 1983). Entre las medidas de corto plazo se encuentran la expedición temporal de licencias a flotas adicionales de acuerdo a la abundancia temporal del recurso, el establecimiento de cuotas de esfuerzo para cada temporada dependiendo de las embarcaciones, el establecimiento de una fecha de terminación de la temporada o la limitación de la biomasa reproductora que se puede extraer en una temporada. Entre las medidas de largo plazo están el establecimiento de tallas comerciales y tallas mínimas, las vedas sobre períodos y áreas determinados y el establecimiento de límites de tonelaje para evitar sobrepesca en años de baja producción.

La pesquería del calamar gigante se lleva al cabo en embarcaciones de índole muy diversa que pueden clasificarse en cinco categorías que van desde las pangas con motor fuera de borda, 2-3 tripulantes y 6-8 m de eslora (categoría I), hasta los buques calamareros japoneses de 48-52 m de eslora, 15-20 tripulantes y 24-30 máquinas extractoras de calamar automáticas (categoría V).

En México y Perú se han implementado medidas que incluyen un seguimiento semanal e incluso diario del esfuerzo y de los volúmenes de captura a fin de valorar el rendimiento biológico pero también económico de la producción de acuerdo al comportamiento de los precios (Mariátegui et al., 1998). Para la pesquería del Golfo de California se emplea el punto de referencia biológico  $F_{\%BR}$  (escape proporcional de adultos maduros sexualmente) para conseguir un escape de reproductores del 50% (Nevárez-Martínez y Morales-Bojórquez, 1997). La estrategia de manejo considera que la pesquería está sustentada por una sola cohorte reclutada en mayo y generada en invierno (Hernández-Herrera et al., 1998).

Para lograr un mejor aprovechamiento del recurso, en México fue instaurado el Programa Nacional del Calamar coordinado por la Secretaría de Pesca, mientras que en Perú la Dirección de Evaluación de Invertebrados Marinos del Instituto del Mar de Perú, se encargan de llevar al cabo los estudios y seguimiento de las poblaciones de calamar gigante (Mariátegui et al., 1998).

La administración de este recurso y principalmente los métodos de estimación del esfuerzo necesario aún están en proceso de mejorar toda vez que la información “primaria” sigue siendo incompleta y susceptible de recibir mejoras y aportaciones sustanciales.

## 1.5 GENÉTICA Y PESQUERÍAS

Las aplicaciones más relevantes que tienen los estudios genéticos en pesquerías inciden sobre aspectos poblacionales, de acuicultura y de taxonomía/sistemática (Ward y Grewe, 1994). Dentro de los poblacionales, los análisis moleculares se han empleado principalmente para:

1. El discernimiento de la estructura geográfica poblacional.
2. La identificación de *stocks* y unidades para conservación.
3. El análisis de poblaciones híbridas (compuestas por organismos provenientes de diferentes poblaciones).
4. La identificación de las bases genéticas de características importantes como el crecimiento, la supervivencia, la resistencia a enfermedades o a condiciones ambientales, etc.
5. El desarrollo de líneas genéticas de organismos que presenten determinadas características para entrecruzamiento en cautiverio con fines de cultivo.

Sin embargo, el objetivo principal que han tratado los estudios genéticos es la identificación de *stocks* (Thorpe et al., 2000; Ward, 2000).

Un stock es una entidad discreta con integridad espacial y temporal, y con parámetros biológicos propios como el crecimiento, la abundancia, la fecundación y la diversidad genética entre otros (Carvalho y Hauser, 1994), y debe ser adecuadamente identificado para poder ajustar las medidas de regulación de manera específica, con el fin de preservar éstas unidades, así como su potencial de repoblación, el que, a su vez, depende de factores como la abundancia, la fecundidad y la adaptabilidad, que también dependen estrechamente de la variación genética (Smith, 1996). El desconocimiento acerca de los stocks es uno de los obstáculos más frecuentes para su conservación (Allendorf et al., 1987; Ward y Grewe, 1994).

La variabilidad genética de una población es una característica que le da la posibilidad de afrontar diferentes entornos al dotarla de variantes genéticas cuya eficacia biológica podría ser superior a la del promedio. La presencia de dichas variantes proporciona a la población una provisión de organismos con alta eficacia biológica que pueden aumentar la adecuación de toda

la población (Hedrick, 2000a). Por otro lado, la pérdida de la variabilidad genética en especies explotadas se ha asociado a los efectos selectivos que tiene la pesca sobre características como la talla, la edad y talla a la madurez sexual y el crecimiento, pero también a los efectos de la deriva génica en especies que han sufrido una reducción drástica en su tamaño poblacional (Smith, 1996).

Como la mortandad natural de los cefalópodos es elevada, la mortandad por pesca debe ser cuidadosamente controlada para evitar acabar con la variabilidad genética de una población. También es importante considerar que los calamares presentan contados eventos de desove, jugando la preservación de la población a un único evento de reclutamiento (Caddy, 1983; Smith et al., 1981), lo que los hace sumamente vulnerables al colapso e incluso a la extinción merced a factores ambientales, así como a la sobrepesca (Thorpe et al., 2000). La acción conjunta de estos factores puede colapsar una población en tiempos tan cortos como un ciclo generacional, es decir, de un año a otro.

Hasta la fecha la extensa literatura sobre aplicaciones de la genética en pesquerías marinas está enfocada primordialmente a los vertebrados (Thorpe et al., 2000). En el caso de los cefalópodos las dificultades que se presentan se deben principalmente al deficiente conocimiento que se tiene de ellos y a su corto período de vida, lo que hace prácticamente impredecible el comportamiento de las poblaciones en un mediano e incluso corto plazo (Caddy, 1983). Adicionalmente, la alta incidencia de eventos de especiación críptica encontrada en invertebrados y particularmente en calamares, son razones adicionales para considerar que para las pesquerías de invertebrados, los estudios genéticos resultan tanto o más importantes que para las de peces (Thorpe et al., 2000).

## **2. ANTECEDENTES**

## 2.1 EL CALAMAR GIGANTE: *DOSIDICUS GIGAS*

### 2.1.1 Taxonomía y sistemática

La primera descripción de la especie (*D. gigas*) fue hecha por d'Orbigny en 1835 quien la denominó *Ommastrephes gigas*. Streenstrup introdujo el género en 1857 al describir a la especie *Dosidicus eschrichtii*, que Pfeffer (1912) sinonimizó más tarde con *D. gigas*. Hasta el momento sólo se reconoce a una especie viva del género (*Dosidicus gigas* d'Orbigny, 1835 = *Ommastrephes giganteus* Gray, 1849 = *Dosidicus eschrichtii* Streenstrup, 1857 = *Dosidicus streenstrupi* Pfeffer, 1884) (Wormuth, 1976 y 1998; Nesis, 1987) y una especie extinta: *D. lomita* Clarke y Fitch 1979 (Clarke y Fitch, 1979).

El género es considerado como el más primitivo de la subfamilia Ommastrephinae debido a la ausencia de fotóforos en la piel, a su área de distribución y otras características. Sin embargo, esta subfamilia se considera la más evolucionada de la familia Ommastrephidae (Nigmatullin, 1988).

Su posición taxonómica es la siguiente:

Phylum Mollusca

Clase Cephalopoda

Subclase Coleoidea

Orden Teuthoida

Suborden Oegopsida

Familia Ommastrephidae

Subfamilia Ommastrephinae

Género *Dosidicus*

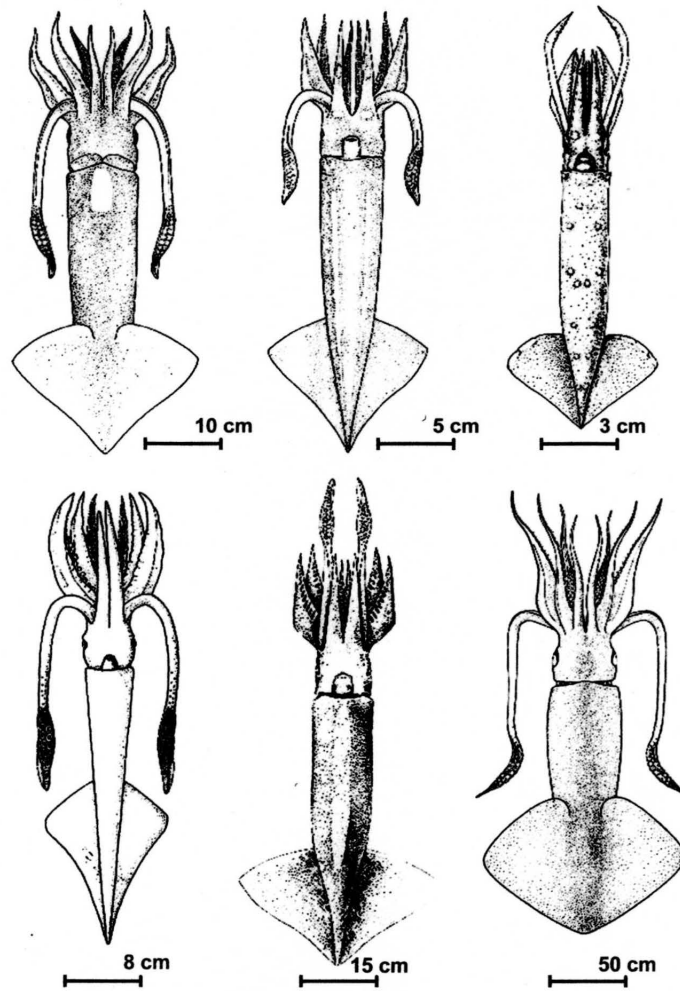
sp. *D. gigas*

La figura 6 muestra a *D. gigas* y a una especie de cada género de la misma subfamilia.

### 2.1.2 Distribución y aspectos evolutivos y ecológicos

*D. gigas* se distribuye en aguas del Pacífico Oriental desde Monterey, California (37-40° N) hasta Tierra del Fuego, Chile (45-47° S) y hasta los 125-140° W sobre la línea del Ecuador (Nesis, 1970; Sato, 1976; Nigmatullin et al., 2001) (figura 7). En la columna de agua abarca un intervalo que va desde la superficie hasta más de 1,500 metros de profundidad (Nesis, 1970).





**Figura 6. Calamares ommastréfinos. *Sthenoteuthis ovalaniensis* (arriba izq.), *Eucleoteuthis luminosa* (arriba medio), *Hyaloteuthis pelagica* (arriba der.), *Ornitoteuthis volatilis* (abajo izq.), *Ommastrephes bartrami* (abajo medio), y *Dosidicus gigas* (abajo der.). Debajo de cada uno se muestra una escala.**

Su hábitat es oceánico y parcialmente nerítico con una fuerte tendencia a asociarse a las zonas de surgencias (Ehrhardt et al., 1983). Su distribución horizontal coincide ampliamente con la isolínea de fósforo con promedio anual de  $0.8 \text{ mg-at P-PO}_4^{-3}/\text{m}^2$  en la capa vertical de 0-100 m de profundidad la cual delimita a las aguas altamente productivas (Nigmatullin et al., 2001) (figura 8). Esta especialización a zonas de alta productividad, así como su tamaño y enorme fecundidad contrastan con los de los demás miembros de la subfamilia que son especialistas del hábitat exclusivamente oceánico y han perdido toda conexión con la plataforma continental, y cuya distribución abarca el océano de costa a costa (Nigmatullin et al., 2001).

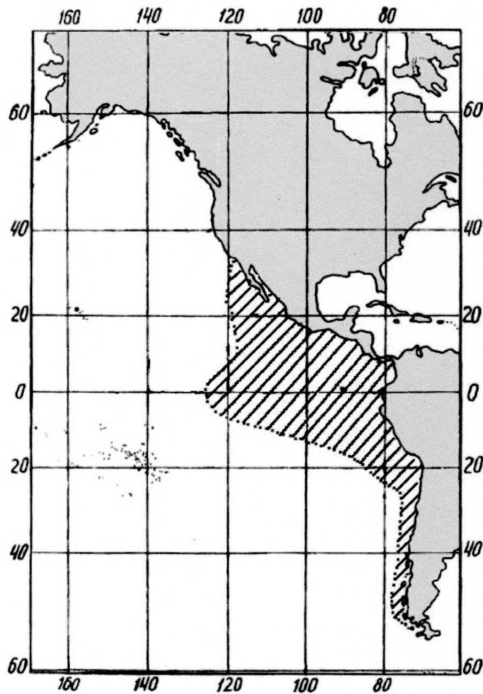


Figura 7. Distribución de *D. gigas*.

Los géneros *Dosidicus*, *Ommastrephes* y *Sthenoteuthis* evolucionaron bajo un esquema de competencia por el dominio ecológico de la capa epipelágica del océano (Nigmatullin et al., 2001). El espectro alimentario y la distribución de *D. gigas* se sobrelapan con los de otras especies como *Ommastrephes bartrami*, *Todarodes filipovae*, *Eucloteuthis luminosa* y *Sthenoteuthis ovalaniensis*, pero sólo *S. ovalaniensis* llega a cohabitar con *D. gigas* llegando a formar escuelas mixtas (grupos de juveniles que se alimentan y migran juntos). Aunque *S. ovalaniensis* depreda activamente a los juveniles de *D. gigas*, aparentemente no se encuentra en las áreas de los grupos de mayor tamaño de *D. gigas* (Nigmatullin et al., 2001).

El rápido crecimiento, la elevada mortalidad y el enorme tamaño de sus poblaciones, hacen de *D. gigas* y en general de los calamares oceánicos, un eslabón importante en las cadenas tróficas de los ecosistemas oceánicos pues proveen una transferencia eficaz de biomasa de un nivel trófico a otro (Amaratunga, 1983), desde el nivel planctónico en el que *D. gigas* ocupa

La adaptación de *D. gigas* a un modo de vida oceánico-nerítico en vez de uno totalmente oceánico, evolutivamente podría estar relacionada con la competencia entre calamares ommastrephidos y con la adquisición de su gran tamaño y su rápido crecimiento, condiciones que requieren de un suministro sustancial y constante de nutrientes, solamente posible en aguas de elevada productividad (Nigmatullin et al., 2001).

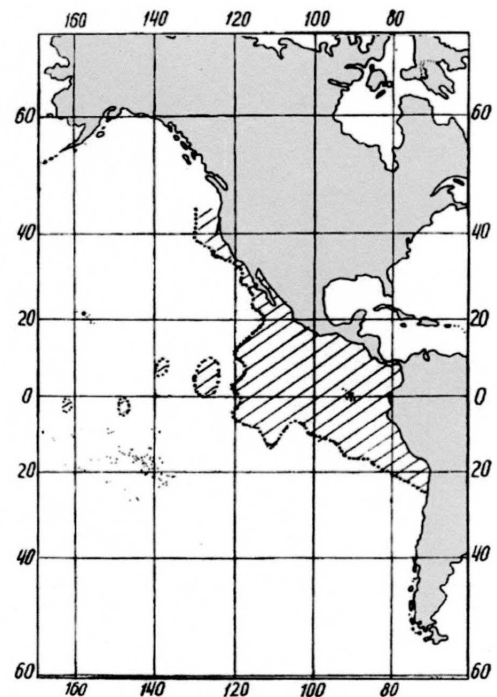


Figura 8. Límite de las aguas altamente productivas (isolínea de fósforo con promedio anual de  $0.8 \text{ mg-at P-PO}_4^{-3}/\text{m}^2$  en la capa vertical de 0-100 m de profundidad). Modificado de Nigmatullin et al. (2001).

sub-nichos de planctófago micronectónico (consumidores de niveles II-III en la cadena alimenticia) hasta los depredadores pelágicos más grandes (consumidores de niveles V-VII de la cadena alimenticia) (Nigmatullin et al., 2001). *D. gigas* es un depredador voraz y constituye a la vez una parte esencial de la dieta de organismos de diversos tamaños y características ecológicas; los juveniles son depredados por juveniles de peces carnívoros grandes, atunes pequeños, calamares (*S. ovalaniensis*), gaviotas, etc.; los subadultos (150-250 mm) por el dorado (*Coryphaena hipurus*), la macarela serpiente (*Gempylis serpens*), el atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*) y otros atunes grandes; los adultos por tiburones grandes (p.e. *Carcharinus falciformes*), pez espada (*Xiphias gladius*), marlín rayado (*Tetraptorus audax*), cachalote (*Physeter macrocephalus*) y otros cetáceos con dientes (figura 9).

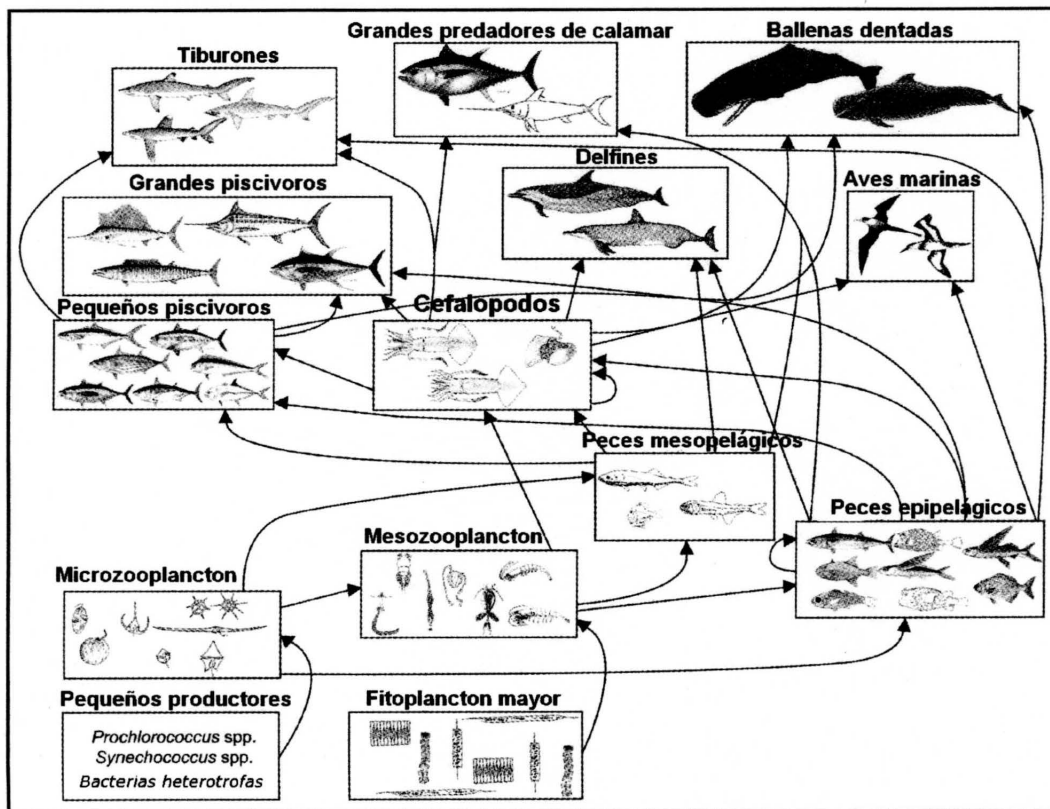
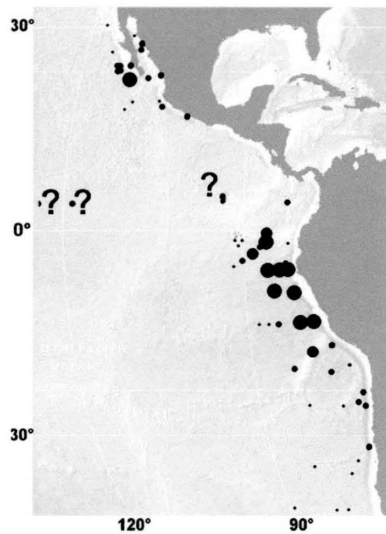


Figura 9. Trama alimenticia del ecosistema pelágico del Océano Pacífico Oriental tropical. Tomado de Olson et al. (2005).

### 2.1.3 Poblaciones

Existen dos regiones principales de abundancia: entre los 0 y 18° S en la zona económica exclusiva de Perú y Ecuador, y entre los 16 y 26° N en aguas interiores y adyacentes al Golfo



**Figura 10. Zonas de abundancia de *D. gigas* en el Pacífico Oriental. El diámetro de los círculos negros indica la abundancia en dicha zona.**

de California, México (Sato, 1976; Mariátegui et al., 1997) (figura 10). Dichas poblaciones tienen una estructura interna compleja y se consideran que están constituidas por múltiples cohortes aunque no se sabe a ciencia cierta cuántos stocks están presentes (Ehrhardt et al., 1983; Nigmatullin et al., 2001).

Diversos autores coinciden en que existen los tres principales grupos de tamaño propuestos por Nesis (1983): pequeños (S), medianos (M) y grandes (L) (Nigmatullin et al., 2001). Distintos reportes difieren en el número de cohortes detectadas, que van desde dos hasta cinco (Ehrhardt et al., 1982a y b, 1983; Argüelles, 1996; Argüelles et al., 2001), cada una con diferentes tasas de crecimiento y tiempos de maduración. Aparentemente cada grupo puede estar generado por más de una cohorte y presentar

diferencias en cuanto a crecimiento, madurez, longevidad e incluso distribución (Nesis, 1970 y 1983; Argüelles et al., 2001; Markaida et al., 2004).

En el grupo S los machos miden 130-260 mm (LM) y las hembras 140-340 mm (LM). Tienden a encontrarse en áreas cercanas al ecuador y maduran más rápidamente y a menores tallas que los mayores (Argüelles et al., 2001; Tafur et al., 2001). En el sur, este grupo se genera en otoño/invierno (austral) y es reclutado por la pesquería en primavera/verano (Argüelles et al., 2001), mientras que en el norte se generan en otoño/invierno para ser reclutados en primavera/verano (Ehrhardt et al., 1982a y b, 1983; Markaida y Sosa-Nishizaki, 2001). Este grupo podría ser generado por dos picos de desove anuales, y por dos cohortes distintas al igual que el grupo de tamaño mediano (Argüelles et al., 2001). Su período de vida sería mucho menor a un año (Argüelles et al., 2001; Markaida et al., 2004).

En el grupo M, los machos y las hembras miden 240-420 mm (LM) y 280-600 mm (LM) respectivamente. Este grupo se encuentra en toda el área de distribución de la especie, exceptuando las latitudes más altas (al norte y al sur), maduran y crecen más lentamente que el

grupo pequeño pero más rápido que el grupo grande (Argüelles et al., 2001; Markaida y Sosa-Nishizaki, 2001; Tafur et al., 2001). En el sur este grupo sería generado en primavera/verano y reclutado en otoño/invierno mientras que en el norte podría ser generado en distintos eventos a lo largo del año (Argüelles et al., 2001; Markaida et al., 2004). Su longevidad sería de 7-8 meses a un año (Argüelles et al., 2001; Markaida et al., 2004).

El grupo L presenta organismos machos de >400-500 mm y hembras de >550-650 mm alcanzando hasta 1000-1200 mm (LM). Tienden a habitar las periferias más sureñas y norteñas del área de distribución, a mayores latitudes de los 10-15° N y S (Markaida y Sosa-Nishizaki, 2001). Maduran tardíamente (1 año aprox.) y a mayores tamaños (Argüelles et al., 2001; Tafur et al., 2001). Es el grupo más longevo y alcanza 1.5-2 años de vida en los ejemplares más grandes. No está muy claro cuándo ocurre la eclosión de este grupo, que podría ser generado de manera casi continua durante el año (Argüelles et al., 2001; Markaida et al., 2004).

#### **2.1.3.1 Crecimiento, migraciones, reproducción y alimentación**

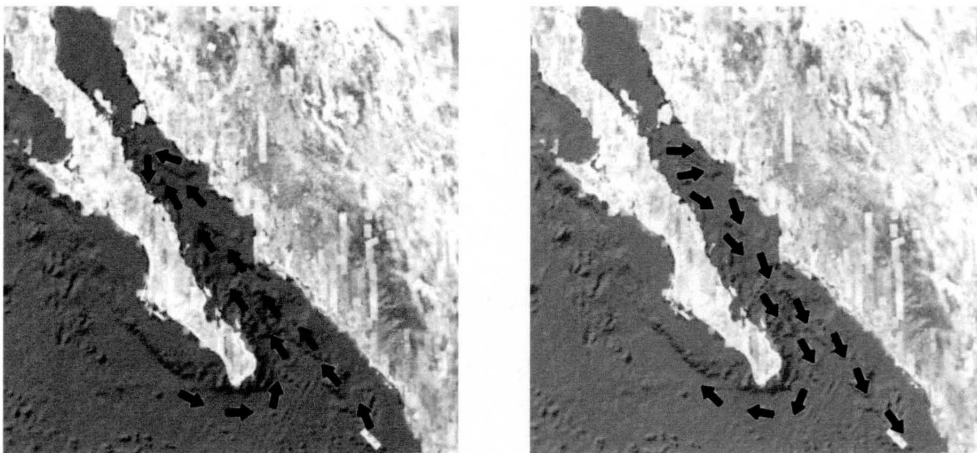
*D. gigas* presenta un crecimiento relativo muy acelerado en los primeros meses de vida, aunque en su etapa adulta no es muy distinto al del resto de la familia Ommastrephidae (Nigmatullin et al., 2001). En las fases ontogenéticas paralarval y juvenil crece de 5 a 8% de LM diarios, alcanzando 100-110 mm de LM a los 45-55 días de edad. Los adultos inmaduros crecen alrededor de 0.8-1.5% de LM diarios mientras que los adultos maduros solamente crecen 0.2-0.4% al día (Masuda et al., 1998). Las tasas de crecimiento absoluto alcanzan hasta 110 mm por mes aunque los trabajos más recientes informan de tasas de 65 a 83 mm por mes durante los primeros cuatro meses de vida, mismas que decrecen a 36-56 mm mensuales en calamares de 8 a 10 meses de vida (Erhardt et al., 1986; Nigmatullin et al., 2001). Los estudios realizados principalmente mediante el análisis de cohortes, han determinado un crecimiento isométrico con tasas de 20 a 100 mm por mes dependiendo de la cohorte pues éstas presentan sus propias curvas de crecimiento, las cuales se han ajustado por la función lineal y la función de Von Bertalanffy (Erhardt et al., 1982b; Ramírez y Klett, 1985; Nigmatullin et al., 2001).

La tasa de mortalidad en *D. gigas* es muy elevada y se debe a factores como el efímero tiempo de vida y la alta tasa de depredación (Galván-Magaña et al., 1985). La mortalidad promedio mensual estimada por Erhardt et al. (1983) es de 0.05-0.08 (0.6-0.96 anual).

Las masas de huevecillos, larvas y juveniles de *D. gigas* migran pasivamente debido a su limitada o inexistente locomoción. Los calamares mayores emprenden activamente extensas migraciones anuales desde sus áreas de alimentación hacia las de desove formando escuelas que pueden contener a miles de organismos que se mueven a velocidades de 5-25 Km/h (Nesis, 1970). Estas migraciones se atribuyen normalmente a factores de índole reproductiva y alimentaria pero sobre todo a cambios en la temperatura del agua, de tal manera que los calamares aprovechan las cálidas aguas costeras en verano y regresan al océano abierto en otoño (Sato, 1976). La temperatura óptima para la captura de *D. gigas* es de  $14.5^{\circ} \text{C} \pm 2.0^{\circ} \text{C}$  (Brito-Castillo et al., 2000).

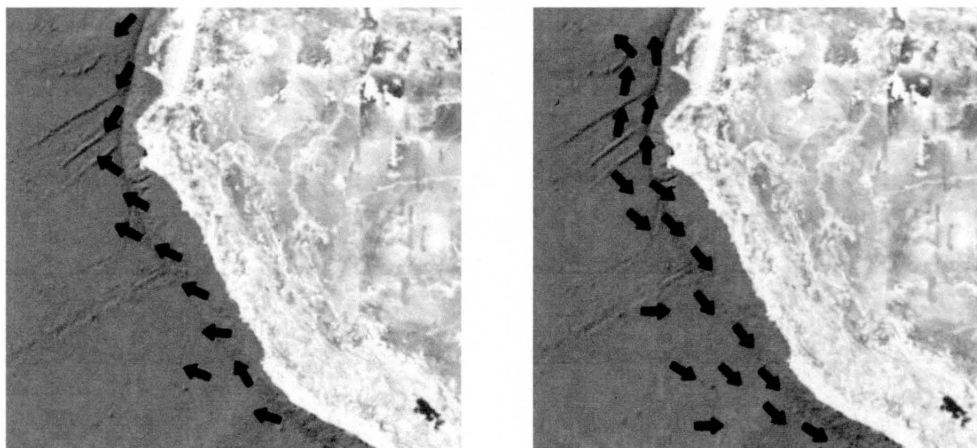
Los patrones detallados de migración aún son un problema sin resolver aunque se han establecido los principales esquemas en el Mar de Perú y en el Golfo de California.

En el norte, los primeros movimientos parecen comenzar en invierno llevando a los calamares del Pacífico al interior del Golfo de California con los juveniles ocupando las zonas superficiales y costeras mientras los adultos ocupan la zona central y más profunda del Golfo (Hernández-Herrera et al., 1996). Allí permanecen de mayo a septiembre (Ehrhardt et al., 1983), estratificándose por tallas de acuerdo a la latitud (Hernández-Herrera et al., 1996), para comenzar la migración de regreso en agosto, hacia aguas del Pacífico, dejando unos pocos adultos de mayor edad en el interior del Golfo. En aguas del Pacífico la población se divide en dos componentes que se dirigen uno hacia el norte y el otro hacia el sur (Sato, 1976; Ehrhardt et al., 1983 y 1986) (figura 11).



**Figura 11. Esquema de migración de *D. gigas* en el Golfo de California y aguas adyacentes (tomado de Ehrhardt et al., 1986). Izquierda: movimientos realizados de diciembre a abril. Derecha: movimientos realizados de agosto a noviembre.**

En aguas peruanas los organismos migran desde las zonas de eclosión en el límite de la plataforma continental entre los 3 y 8° S y entre los 12 y 17° S, hacia áreas más productivas como las aguas de la Corriente Peruana (hacia el sur y este), la zona ecuatorial y el Hemisferio Norte (hacia el norte y este) (Yamashiro et al., 1997). Las principales migraciones ocurren en el verano y otoño austral llevando a los organismos más cerca de la costa, sobre el talud continental, durante el otoño e invierno austral (Nesis, 1983; Taipe et al., 2001) (figura 12).



**Figura 12. Esquema de migración de *D. gigas* en aguas peruanas y aguas adyacentes (tomado de Nesis, 1983 y Taipe et al., 2001). Izquierda: movimientos realizados de enero a mayo. Derecha: movimientos de agosto a diciembre.**

*D. gigas* es un organismo dióico y semélparo, es decir, que presenta un período reproductivo único en su vida (como la mayoría de los cefalópodos). Tiene una fecundidad de 0.3 a 13 millones de oocitos por hembra (Nigmatullin et al., 1999) aunque se han reportado hasta 32 millones (Ehrhardt et al., 1983; Tafur et al., 2001; Markaida y Sosa-Nishizaki, 2001).

El apareamiento de *D. gigas* es similar al de otros ommatréfidis, en la posición conocida como cabeza-con-cabeza que permite transferir los espermatozoides del macho a la membrana bucal de la hembra donde existen receptáculos seminales. El número de espermatozoides difiere con la edad y van de 300 a 1,200 de unos 27 a 35 mm de longitud (Ehrhardt et al., 1982b).

El desarrollo embrionario dura de 6 a 9 días a 18° C. Las larvas tienen una LM de 1.1 mm al momento de la eclosión (Yatsu et al., 1999). La paralarva es un rincoteutión que habita las capas superficiales (0-100 m) del mar (Nigmatullin et al., 2001). La ontogénesis presenta cuatro etapas: paralarva (1-10 mm LM), juvenil (15-100 mm LM), subadulto (150-300/350 mm LM) y adulto (400-1000 mm LM) con tres períodos de transición entre estas etapas (Nigmatullin et al., 2001).

La proporción de sexos encontrada en adultos varía de un autor a otro aunque por lo general dominan las hembras en proporciones de 2:1 o mayores (Ramírez y Klett, 1985; Ehrhardt et al., 1986; Hernández-Herrera et al., 1996; Tafur et al., 2001).

El período reproductivo de *D. gigas* puede ser prolongado, posiblemente con diversos eventos de apareamiento (Markaida y Sosa-Nishizaki, 2001; Masuda et al., 1998; Argüelles et al., 2001). En el norte, los picos de máxima actividad de desove no se encuentran bien definidos pero posiblemente existe un período prolongado fuera de las pendientes de la porción central del Golfo de California (Markaida y Sosa-Nishizaki, 2001). Es posible que durante el invierno el desove ocurra principalmente en aguas del Pacífico en el borde de la plataforma continental de la península de Baja California, mientras otro grupo menor desova en el interior del Golfo (Ehrhardt et al., 1986; Hernández-Herrera et al., 1996). En el sur, el desove ocurre a lo largo de la costa peruana con una mayor intensidad entre los 3 y 8° y entre los 12 y 17° S, en el borde de la plataforma continental y en las áreas oceánicas adyacentes como las pendientes de la cordillera submarina de Nazca (Tafur et al., 2001). Los picos de desove ocurren en primavera-verano (octubre a enero) y en invierno (julio a agosto) aunque en ciertos años se pueden presentar desfasados.

*D. gigas* es un depredador activo durante toda su vida recurriendo incluso al canibalismo que, aparentemente, es una actividad exclusiva de los organismos más grandes (y viejos) asociada a condiciones de escasez de alimento y a actividad pesquera intensiva (Ehrhardt et al., 1983, 1986, 1991). El contenido estomacal de organismos pequeños muestra una predominancia de crustáceos mientras que los de tamaño mediano prefieren los peces pelágicos. Los calamares de mayor tamaño optan más por calamares (incluidos los de su propia especie). Algunos estudios han encontrado en los calamares de las costas de Perú y Chile una dieta compuesta principalmente de peces mictófidios (también llamados peces linterna) y calamares con cantidades menores de plancton y organismos diversos (Nesis, 1970). En el Golfo de California y aguas adyacentes los calamares mostraron predilección por mictófidios, sardinas, macarela, cangrejo rojo (*Pleuronides planipes*), larvas de crustáceos y calamares de su propia especie cambiando la proporción de éstos en su dieta a lo largo del año (Sato, 1976; Ehrhardt et al., 1983, 1991). Los adultos de *D. gigas* se asocian más comúnmente a los grandes cardúmenes de pelágicos: la anchoveta peruana en el caso de los calamares del Hemisferio Sur, y sardinas, anchovetas y macarelas en los calamares del Hemisferio Norte causando un impacto considerable en estos (Ehrhardt et al., 1991). En aquellos lugares donde las surgencias no son



suficientes para mantener grandes cardúmenes de peces, los calamares pueden optar por alimentarse de peces batipelágicos.

## 2.2 GENÉTICA EVOLUTIVA DE CALAMARES

### 2.2.1 Genética de poblaciones de calamares oceánicos

En una población natural, la variación genética es el resultado de la acción de fuerzas evolutivas que actúan sobre la población y que, en esencia, son variantes o combinaciones de cuatro fuerzas fundamentales: la selección natural, la deriva génica, la migración y la mutación (Ayala y Kiger, 1989; Hedrick, 2000a).

La interacción de estas fuerzas moldea el perfil genético de toda la población y adicionalmente puede actuar con una intensidad y eficacia diferente en distintas porciones o sectores de la población. *D. gigas*, al presentar un solo evento reproductivo al final de su vida, puede permitir que diferentes componentes de la población, por ejemplo los grupos de talla, puedan tener un perfil genético diferente cuando el flujo génico entre estas porciones no sea suficientemente intenso como para homogeneizar a la variación genética. Cuando los diferentes componentes de una población presentan un perfil genético particular, se dice que la población tiene estructura genética.

La estructura genética puede deberse a varias causas. La presencia de barreras físicas y la distancia geográfica son dos de ellas. Si la magnitud de la diferenciación se correlaciona con la distancia geográfica entre las poblaciones se dice que existe *aislamiento por distancia*. La estructura genética al interior de una población también puede ser generado por factores biológicos o conductuales que implican aislamiento reproductivo, lo que depende del sistema de apareamiento.

Los calamares oceánicos normalmente presentan extensas áreas de distribución y una notable capacidad de dispersión. No obstante, los niveles de subdivisión poblacional detectados en estos organismos son notablemente elevados. En la pota japonesa (el calamar ommastréfido de mayor importancia pesquera del Pacífico Occidental), *Todarodes pacificus*, se ha identificado la presencia sucesiva de áreas de desove independientes (llamados *substocks* o *stocklets*) a lo largo del margen continental, con algún grado de diferenciación genética entre sí (Osako y Murata, 1983), mismos que podrían presentarse también en las especies *Illex argentinus* e *Illex illecebrosus* (Caddy, 1983), y que funcionarían como estrategia de

recolonización lateral en caso de que el reclutamiento fallase por alguna causa, permitiendo a un “substock” sobreviviente colonizar las áreas de desove adyacentes.

### 2.2.2 Técnicas moleculares

Los estudios sobre organismos marinos sujetos a explotación dan prioridad a la detección de estructura poblacional y al discernimiento de especies y subespecies, pues en el mar las barreras naturales a la dispersión son menos restrictivas que en tierra y la estructura genética tiende a ser menos tangible.

A lo largo del tiempo se han empleado diversas técnicas y procedimientos para estos propósitos. Los primeros métodos fueron los análisis morfométricos y merísticos pero la incertidumbre sobre la naturaleza de la herencia de los caracteres observados dificultó notoriamente la interpretación de los resultados. A partir de los años 1930s se emplearon grupos sanguíneos de peces para discriminar stocks (De Ligny, 1969). En los años 1950s y 1960s se extendieron los análisis de variabilidad serológica (Ward, 2000). Al mismo tiempo se llevaron a cabo estudios citogenéticos que presentaron poca variabilidad y desventajas prácticas. Más tarde se probó el análisis de variantes electroforéticas de hemoglobina (Sick, 1961). La extensión y estandarización de protocolos para analizar más proteínas, especialmente enzimas, empleando tinciones histoquímicas tuvo un impacto sin precedentes. No obstante, la variación detectada en las isoenzimas fue escasa y los resultados controvertidos (Ward y Grewe, 1994). Después aparecieron técnicas costosas que sin embargo, permitieron analizar la variación presente en el DNA. Primero mediante enzimas secuencia-específica llamadas enzimas de restricción (Restriction Fragment Length Polymorphisms o RFLPs) y después con la secuenciación directa del DNA. El siguiente paso vino con el advenimiento de tecnologías que permitieron el análisis masivo y barato de muestras a partir de cantidades pequeñas de tejido con la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la secuenciación automática. Este tipo de estudios se enfocaron fuertemente en el DNA mitocondrial (mtDNA) debido a la mayor capacidad de discernir estructura poblacional que se le atribuye y a ciertas ventajas teóricas por su modo de herencia (Park y Moran, 1994; Ward y Grewe, 1994; Silva y Russo, 2000).

Al mismo tiempo se desarrollaron otras técnicas alternativas que ofrecieron ventajas interesantes como los RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNAs) y los AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism) que son técnicas de bajo costo basadas en el PCR y que permiten obtener información de numerosos loci aleatoriamente distribuidos en el

genoma. Sus desventajas principales son su carácter dominante que implica una pérdida de información, limitaciones en los análisis y una subestimación de la variación genética. Otras técnicas como los SSCPs (Single Strand Conformation Polymorphisms), la hibridación del DNA y el DGGE (Denaturalized Gradient Gel Electrophoresis) se enfocan en la detección de las variantes en el DNA con un máximo de sensibilidad. Una desventaja de estas técnicas así como de los RAPDs y AFLPs se encuentra en la necesidad de estandarizar estrictamente todas las condiciones de laboratorio debido a su tendencia a presentar variación “falsa” debida a artefactos (Dowling et al., 1996).

Las dos técnicas empleadas en este estudio presentan un balance adecuado entre costo y eficiencia pues permiten detectar variación genética nuclear aleatoriamente (RAPDs) así como refinar la estructura genética detectada (en caso de estar presente) con la mayor sensibilidad que se le atribuye al mtDNA evitando el elevado costo de secuenciar todas las muestras individualmente (mediante la detección de alelos por la técnica de SSCPs).

### **2.2.3 Avances teóricos**

Las bases de la genética de poblaciones se dieron en los años 1920s y 1930s cuando Ronald A. Fisher, J. B. S. Haldane y Sewall Wright establecieron toda la teoría matemática que constituyó el paradigma usado hasta nuestros días. Ellos cubrieron casi todos los tópicos de la genética de poblaciones dejando poco lugar para los avances teóricos hasta que la aparición de los primeros datos moleculares (en los años 1960s) y de DNA (en los años 1980s), produjo una gran cantidad de preguntas que revitalizaron el área.

Esto generó una intensa actividad teórica en los años 1980s y 1990s en la que se explotó exhaustivamente la teoría estadística clásica de manera que prácticamente todos los métodos de estimación y pruebas de hipótesis útiles fueron adaptados a estudios con datos moleculares. Mientras tanto, el uso de herramientas computacionales para realizar estimaciones y pruebas de hipótesis fue creciendo lentamente hasta que a finales de los años 1990s y en la década del 2000, con el advenimiento de computadoras de alto poder de procesamiento, se volvieron los análisis dominantes pues para muchos tipos de análisis resultaban no sólo la forma más conveniente, sino la única forma de realizarlos. En la actualidad se considera que los métodos computacionales van a terminar por desplazar a los métodos analíticos en los análisis estadísticos de genética de poblaciones (Nei y Kumar, 2000).

El escenario anterior abrió las puertas a la estadística bayesiana que, una vez que superó ciertos desacuerdos conceptuales y su principal limitación práctica gracias a la implementación del método de integración numérica (es decir, basado en computadora) conocido como Cadena de Markov por el algoritmo de Monte Carlo (MCMC), ofreció muchas ventajas prácticas que le valieron una gran atención. Se considera que el futuro de la estadística y de aquellas áreas dependientes de ésta (como la genética de poblaciones), se encuentra en la estadística bayesiana (Gelman et al., 2006).

Pero la gran revolución de la genética de poblaciones vino con la llamada Teoría Coalescente. Ésta, representa una conceptualización completamente nueva y diferente al paradigma clásico, con un carácter retrospectivo, opuesto al carácter prospectivo de la teoría clásica (Fu y Li, 1999). En la Teoría Coalescente se analizan las relaciones de las secuencias observadas partiendo de la base de que todas las secuencias en algún momento del pasado fueron copias descendientes de un ancestro común, es decir *coalescen* en algún punto del pasado evolutivo. Esta teoría comenzó a desarrollarse tras la aparición de los primeros datos de secuencias de DNA a partir de trabajos como los de Kingman (1982a y b) que fueron secundados por muchos otros, iniciando un proceso que alcanzó su auge desde los años 1990s y hasta nuestros días y que fue llamado “convergencia hacia la coalescencia” y consistió en la reinterpretación de los tópicos de genética de poblaciones desde el punto de vista coalescente (Möhle, 2000). Sus principales ventajas incluyen el ser una teoría basada en la muestra (y no en la población), el ser una aproximación altamente eficiente que permite simular una gran cantidad de procesos, y finalmente que es especialmente adecuada para el análisis de DNA (Fu y Li, 1999).

De esta manera, la conjunción de avances tecnológicos y teóricos está abriendo un vasto campo de desarrollo para la genética de poblaciones.

### **3. OBJETIVOS**

### 3.1 OBJETIVO GENERAL

Este trabajo pretende obtener información sobre los aspectos más relevantes de genética poblacional en el calamar gigante (*D. gigas*), lo que incluye estimaciones sobre la diversidad genética y molecular, la estimación e identificación de algunas de las fuerzas y eventos evolutivos a los que debe su distribución y magnitud, como el flujo génico presente e histórico, la deriva génica y las fluctuaciones en el tamaño de la población. Todo esto tratando de considerar a algunos de los factores ecológicos y oceanográficos que pueden afectar la dinámica de las poblaciones y que son las causas subyacentes de gran parte de los procesos que moldean a la variación genética.

### 3.2 METAS

- Determinar la variación genética y molecular en las diferentes localidades muestreadas a lo largo del Pacífico Oriental.
- Determinar el grado de variabilidad temporal en algunas localidades de alta abundancia.
- Determinar la existencia y el grado de la hipotética diferenciación genética entre los grupos de talla (pequeño S, mediano, M, y grande, L) encontrados en poblaciones del Perú y México.
- Determinar la estructura genética.
- Obtener información histórica como la presencia de fluctuaciones poblacionales históricas y el probable origen de las poblaciones.

## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### 4.1 MUESTREO

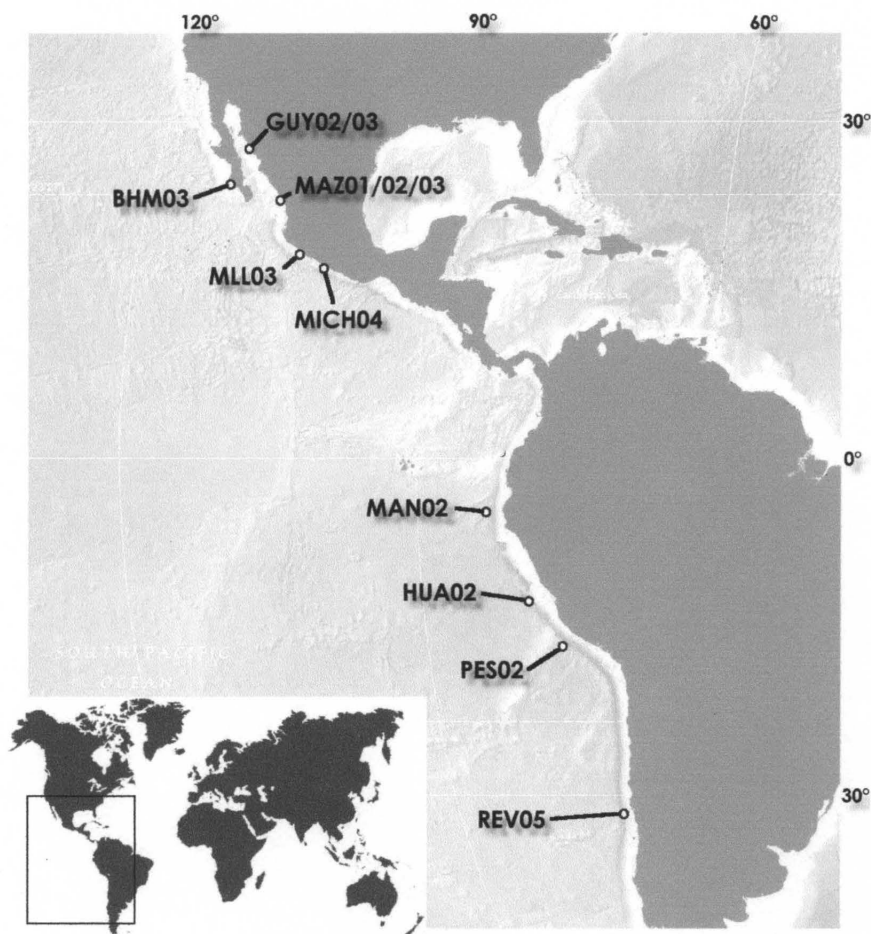
Se obtuvieron directamente o a través de intermediarios 296 muestras de tejido muscular de los mantos o tentáculos de organismos que fueron capturados por embarcaciones comerciales que operaban en las zonas de colecta. La ubicación precisa de las localidades de colecta y la información del muestreo se muestran en la figura 13 y la tabla 1. Las localidades de colecta abarcan las zonas más relevantes en abundancia (ver figura 10, pág. 26). Las grandes porciones que permanecen sin muestrear son zonas con poca exploración de donde difícilmente es posible obtener muestras debido a la incierta localización y abundancia del recurso.

Todas las muestras fueron trasladadas y almacenadas en el Laboratorio de Genética de Organismos Acuáticos del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICMyL) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) a  $-72^{\circ}$  C.

**Tabla 1. Colectas realizadas.**

Ref.	No. org.	Sitio de colecta	Posición del sitio de colecta (long, lat)	Fecha de colecta
GUY02	30	Costas de Guaymas, Sonora, Méx.	110°48'W, 27°45'N	feb/2002
GUY03	27	Costas de Guaymas, Son, Méx.	110°48'W, 27°45'N	may/2003
MAZ01	32	Costas de Mazatlán, Sinaloa, Méx.	106°48'W, 23°25'N	jul/2001
MAZ02	46	Costas de Mazatlán, Sin, Méx.	106°48'W, 23°25'N	ago/2002
MAZ03	27	Costas de Mazatlán, Sin, Méx.	106°48'W, 23°25'N	feb/2003
BHM03	12	Bahía Magdalena, BCS, Méx.	112°06'W, 24°28'N	mar/2003
MLL03	32	Manzanillo, Colima, Méx.	104°20'06''W, 19°04'49''N	jul/2002
MICH04	24	Costa de Michoacán, Méx.	103°00'40''W, 17°42'38''N	may/2004
MAN02	10	Pacífico Sur, Costas de Máncora, Perú	82-84°0'W, 4°0'S	nov/2002
HUA02	10	Pacífico Sur, Costas de Huacho, Perú	79-81°0'W, 11°30'S	oct/2002
PES02	10	Sur del Pacífico Peruano	77-79°0'W, 16°0'S	oct/2002
REV05	36	Región V, Chile	72-74°0'W, 32°S	ago/2005
Total	296	Pacífico Oriental	72°-112° W, 27° N-32° S	jul/2001-ago/2005





**Figura 13. Localidades de colecta.**

## 4.2 TÉCNICAS DE LABORATORIO

El DNA genómico fue extraído de todas las muestras usando el protocolo y los reactivos incluidos en el kit Wizard Genomic™ (Cat. A1125, Promega Biosciences). El DNA se cuantificó usando un fluorómetro DyNA Quant® 200 (Amersham Biosciences, San Francisco, CA, USA) que emplea el marcador fluorescente Hoechst 33258 (Cesarone et al., 1979).

### 4.2.1 RAPDs

Las reacciones de PCR se llevaron al cabo en un termociclador Mastercycler® Gradient de Eppendorff® (Eppendorf AG, Linz GMBH, Hamburg, Germany) en un volumen de reacción de 15 µL que contenía: amortiguador de PCR 10X “B” (Cat. M1901, Promega Biosciences), 0.2mM de cada dNTP, 0.75 U de Taq Polimerasa (Cat. M1661, Promega Biosciences), 5.6

pmol de iniciador, 3.0 mM de MgCl<sub>2</sub> y 1.5 ng de templado de DNA (2.5 ng/μL). Se ensayaron los 20 iniciadores de la serie OPF (Operon™, QIAGEN Inc. Valencia, CA, USA) y se seleccionaron los mejores con base en el número, intensidad, claridad y repetibilidad de los productos amplificados. El termociclador fue programado con un paso inicial a 94° C durante 3 minutos seguido por 44 ciclos que consistieron de tres pasos (1 minuto a 94° C, 1 minuto a 37° C y 2 minutos a 72° C) incrementando el tiempo de los pasos de acoplamiento y polimerización un segundo cada ciclo para contrarrestar la pérdida de actividad de la polimerasa. Adicionalmente se agregó un período final de 10 minutos a 72° C. Los productos de PCR se separaron por electroforesis horizontal en geles de ágarosa al 2.0% (Cat. 15510-019, Gibco™, Invitrogen Corporation Gran Island, NY, USA) teñidos con bromuro de etidio (0.5 μg/mL). Las electroforesis se llevaron a cabo a 90 V y 50-70 mA durante 1 hora y 55 minutos.

#### 4.2.2 Técnicas para analizar mtDNA

Después de comparar la variación genética de los únicos tres fragmentos provenientes de regiones mitocondriales de calamares sobre los que existe información: un fragmento de la región ribosomal 16S, un fragmento de la región del citocromo oxidasa I (COI), y un fragmento de la región del citocromo b, se concluyó que el citocromo b presentaba la mayor variación entre ellos y se eligió para realizar el estudio. Los iniciadores amplificaron una porción del citocromo b mitocondrial de 367 pares de bases (pb) en la que se había reportado variación suficiente para estudios de sistemática a nivel interespecífico e incluso intraespecífico (Merritt et al., 1998). Se emplearon los iniciadores UCYTB151F y UCYTB272R diseñados por Merritt et al. (1998), mismos que fueron sustituidos por otros no degenerados: UCYTB272RND (5'-GCG AAT AGG AAG TAC CAT TC-3') y UCYTB151FND (5'-TGT GGG GCC ACT GTT ATG ACT AA-3') a fin de evitar problemas con la técnica de SSCP que puede ser sensible al uso de dicho tipo de iniciadores (Sunnucks et al., 2000) al igual que las reacciones de secuenciación (Hillis et al., 1996). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler® Gradient de Eppendorff® (Eppendorf AG) en un volumen de 10 μL que contenía: amortiguador de PCR 10X "B" (Cat. M1901, Promega Biosciences), 0.2mM de cada dNTP (Cat. U1240, Promega Biosciences), 0.5 U de Taq polimerasa (Cat. M1661, Promega Biosciences), 10 pmol de cada iniciador (primer), 3.25 mM de MgCl<sub>2</sub> y 1 μL de templado de DNA sin diluir. El programa consistió en un paso inicial a 94° C durante 3

minutos seguido por 40 ciclos de tres pasos cada uno (1 minuto a 94° C, 1 minuto a 37° C y 2 minutos a 72° C) y finalmente, de un período final de 7 minutos a 72° C. Se corroboró la presencia de bandas del tamaño adecuado (aproximadamente 400 pb) mediante electroforesis horizontales en geles de agarosa al 1.5% (Gibco™, Cat. 15510-019; Invitrogen Corporation Gran Island, NY, USA) teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/mL). La electroforesis se llevó a cabo a 90 V y 50-70 mA durante 60 minutos.

Los productos amplificados se sometieron a la técnica de SSCP para separar variantes electroforéticas que presumiblemente corresponden a haplotipos con secuencias distintas. Para ello, 5 µL de productos de PCR se desnaturalizaron usando amortiguador de formamida (95%) a 94° C seguidos de una inmediata inmersión en hielo por 5 minutos, después se tomaron 2-3 µL y se sometieron a electroforesis vertical en geles de poliacrilamida al 8% (37.5:1 acrilamida/bisacrilamida, Cat. ACRL4001, BISL0202, ICN Pharmaceuticals, Pasadena, CA, USA, 5% glicerol) empleando 82.5 µL de persulfato de amonio y TEMED (Cats. APS00100, TEMED050 respectivamente, ICN Pharmaceuticals). La electroforesis se corrió en una cámara de secuenciación Sequi-Gen GT (Cat. 165-3862, Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) durante 15 horas a 500 V y 17.5 mA a 4° C. Los detalles no incluidos aquí se presentan en Sunnucks et al. (2000).

Todas las variantes electroforéticas detectadas se consideraron posibles alelos y se mandaron a secuenciar como productos de PCR purificados en columnas QIAquick PCR Purification Kit siguiendo el protocolo del producto (Cat. 28104, QIAGEN Inc.).

## 4.3 ANÁLISIS DE DATOS

### 4.3.1 Generales

Para el análisis de RAPDs se realizó una rigurosa selección de las bandas amplificadas para evitar incluir en los análisis a bandas generadas por artefactos de la técnica. Así, no se emplearon las bandas débiles y poco repetibles ni las bandas menores a 100 pb ni mayores a 1,500 pb. Tampoco fueron incluidas las bandas con una frecuencia menor a  $3/S$  ( $S$  = tamaño de la muestra total) atendiendo a la recomendación de Lynch y Milligan (1994). Cada banda fue interpretada como un locus y fue identificada por su movilidad en el gel, para lo cual se usó un marcador de peso molecular de 100 pb (Cat. G2101, Promega) como referencia.

El análisis de mtDNA se realizó adjudicando una secuencia a cada variante detectada mediante SSCP. La combinación de técnicas (secuenciación de variantes identificadas por SSCP) permite obtener muestreos mayores con un menor monto de secuencias a un costo razonable. Los resultados son considerados confiables y recomendables para estudios de ecología molecular y genética de poblaciones (Sunnucks et al., 2000) aunque es importante tener presente las limitaciones de la técnica. Las bases de datos se llenaron asignando una secuencia (haplotipo) a cada individuo y alineándolos todos por población.

### 4.3.2 Diversidad genética y molecular

En el caso de los RAPDs la diversidad genética fue estimada de dos maneras: mediante el estimador  $h$  de Nei (1973) y el índice de información de Shannon  $I$  (Shannon y Weaver, 1949) que es la suma de las frecuencias de las bandas por el logaritmo (base 2) de la misma frecuencia y tiene una relación más lineal con las frecuencias alélicas para valores cercanos a cero o a uno (Shannon y Weaver, 1949). Dichas estimaciones fueron realizadas para cada población y para el conjunto completo de todas las poblaciones.

Para el mtDNA se obtuvieron los índices de variación genética molecular más comunes. Estos incluyen la diversidad genética  $H$  (Nei, 1987), la diversidad nucleotídica  $\pi_n$ , el número de sitios polimórficos  $S$  y el número promedio de diferencias entre pares de haplotipos. También se obtuvieron estimaciones del parámetro  $\Theta$  (no confundir con el índice de diferenciación poblacional  $\theta$ ) que representa la tasa de mutación escalada y es igual a  $\Theta = 2N_e\mu$ , donde  $\mu$  es la tasa de mutación del fragmento. Se obtuvieron tres estimaciones de  $\Theta$  que se realizan mediante diferentes propiedades y relaciones con parámetros observados bajo una hipótesis de equilibrio neutral:

- $\hat{\theta}_S$  : El número de sitios segregantes  $S$  y el tamaño de muestra  $n$ , se relacionan con el parámetro  $\Theta$ , de la siguiente manera:  $\Theta = S / a_1$ , donde  $a_1 = \sum_{i=1}^{n-1} 1/i$  (Watterson, 1975).

- $\hat{\theta}_k$  : El número esperado de alelos ( $k$ ) y el tamaño de muestra ( $n$ ) también permiten estimar  $\theta$  debido a la siguiente relación bajo el modelo de alelos infinitos (Ewens, 1972) :

$$E[k] = \theta \sum_{i=0}^{n-1} 1/\theta + 1$$

- $\hat{\theta}_\pi$  : El número esperado promedio de diferencias entre pares de secuencias ( $\pi$ ) es  $\theta$ :

$$E(\hat{\pi}) = \theta, \text{ (Tajima, 1983).}$$

Para algunos cálculos o estimaciones (por ejemplo  $\pi$ ) es necesario emplear un modelo de sustitución molecular que relacione las diferencias entre haplotipos con el tiempo de divergencia entre los mismos de manera lineal. El modelo empleado, seleccionado mediante una prueba de razón de verosimilitud (Posada y Crandall, 1998), fue el de Tamura y Nei (1993) que incorpora correcciones para la ocurrencia de varias mutaciones en un mismo sitio, la presencia de tasas distintas de transversiones y transiciones, la aparición heterogénea de las mutaciones a lo largo del fragmento y las altas o bajas proporciones de G/C en el fragmento.

Adicionalmente, y con el fin de detectar si el marcador analizado se ajusta a un equilibrio mutación-deriva génica. Se aplicaron las siguientes pruebas al mtDNA (ya que no es posible aplicar a los datos provenientes de RAPDs):

- La prueba de Ewens-Watterson. Calcula un estadístico llamado  $F$  (equivalente a la homocigosis esperada) bajo los supuestos de una evolución neutral (Ewens, 1972). También se empleó la versión de Slatkin (1996) que no utiliza el estadístico  $F$  y compara las probabilidades de muestras simuladas con la observada.
- La prueba de Chakraborty. Esta prueba se enfoca particularmente en la desviación de la neutralidad producida por una población híbrida (una amalgama de otras poblaciones). La prueba se basa en la premisa de que una población híbrida tiene un número de alelos mayor que el esperado bajo equilibrio neutral (Chakraborty, 1990).
- La prueba de Tajima. Esta prueba compara las estimaciones de  $\theta$  de dos maneras: mediante el número de sitios segregantes y mediante el número promedio de diferencias entre pares de muestras. Las diferencias entre estimaciones pueden surgir debido a la selección natural, a fluctuaciones poblacionales y a la presencia de tasas de mutación distintas en el fragmento (Tajima, 1989a y b).

- La prueba de Fu. Mediante simulaciones calcula la función de densidad de probabilidad de obtener  $k$  alelos dado un valor determinado de  $\theta$ . Bajo neutralidad el valor de  $k$  se mantiene dentro de un intervalo pero algunos factores, particularmente las expansiones poblacionales, modifican este valor (Fu, 1997).

### 4.3.3 Variación temporal, tamaño efectivo de la población y deriva génica

La deriva génica es una fuerza evolutiva que involucra los cambios en las frecuencias alélicas debidos al error de muestreo. Esta fuerza se relaciona estrechamente con el concepto de tamaño efectivo de la población ( $N_e$ ) de la siguiente manera: a mayor  $N_e$  menor probabilidad de cambios importantes debidos a la deriva génica y viceversa. Usando dicha relación se empleó el método conocido como “temporal” (empleo de muestras tomadas en distintos tiempos en la misma población) para hacer estimaciones de  $N_e$ . También se probó estadísticamente si las frecuencias alélicas presentaban diferencias significativas de un año a otro tomando en cuenta el error de muestreo y la deriva génica.

En el análisis mediante RAPDs, la calidad de los productos amplificados en las muestras de GUY02 y MAZ03 no fue satisfactoria debido a la poca repetibilidad de las bandas amplificadas, posiblemente debido a una deficiente conservación del DNA nuclear debido al estado de conservación de los especímenes previo al momento de la colecta, por lo que solamente fue posible aplicar estos análisis a las muestras de Mazatlán de 2001 y 2002 (MAZ01 y MAZ02).

Para el análisis de mtDNA las comparaciones realizadas fueron entre muestras tomadas en la localidad de Mazatlán en 2001, 2002 y 2003 (MAZ01, MAZ02 y MAZ03) y entre las muestras de 2002 y 2003 de la localidad de Guaymas (GUY02 y GUY03).

La magnitud de los cambios temporales se estimó mediante la  $\theta (F_{ST})$  de Weir y Cockerham (1984) y el estadístico basado en simulaciones  $F_{STT}$  propuesto para este estudio (ver Apéndice # 2) el cual consiste en una  $F_{ST}$  convencional menos el valor promedio de todas las  $F_{ST}$ s generadas por pura deriva génica y error de muestreo en varios miles de simulaciones.

También se desarrollaron pruebas de hipótesis para descartar la presencia de diferencias significativas entre muestras espaciadas temporalmente:

- La prueba basada en simulaciones que fue desarrollada para este propósito, cuya publicación esta en proceso (ver Apéndice # 2).

- La prueba exacta de Raymond y Rousset (1995), que esta basado en una prueba de  $\chi^2$  basada en tablas de contingencias.
- La prueba de Waples (1989a), que también consiste en una prueba de  $\chi^2$ , pero que se ajusta por un factor de corrección que pondera la variación debida a la deriva génica. Los valores obtenidos fueron ajustados mediante la técnica de Bonferroni (Rice, 1989).

La prueba de Waples y la prueba basada en simulaciones requieren el conocimiento del tamaño total de la población y el tamaño efectivo de la población. Emplear las estimaciones de tamaño efectivo sería redundante por lo que se emplearon los valores arbitrarios  $N = 100,000$  y  $N_e = (0.5)N$  considerando que las poblaciones de *D. gigas* son muy grandes (se han estimado en decenas a centenares de millones) y que casi cualquier combinación de parámetros no modifica sustancialmente los resultados obtenidos con estos valores a excepción de tamaños totales y efectivos muy pequeños (menores a 1,000).

Todos los análisis anteriores se aplicaron a las frecuencias alélicas estimadas para RAPDs y mtDNA.

Para estimar el tamaño efectivo de la población se usaron las frecuencias alélicas estimadas mediante ambas técnicas (RAPDs y mtDNA) en muestras espaciadas temporalmente:

- El método de Waples (1989b) que realiza una estimación por momentos del  $N_e$  aprovechando su relación matemática con el estadístico  $F_k$  (la varianza estandarizada del cambio en las frecuencias alélicas) empleando un modelo clásico (Wright-Fisher).
- El método de Anderson et al. (2000) que realiza una estimación por máxima verosimilitud empleando un modelo clásico (Wright-Fisher).
- El método de Berthier et al. (2002) que también realiza una estimación por máxima verosimilitud pero utilizando un modelo coalescente.
- El método de Anderson (2005) que emplea una versión más eficiente del modelo coalescente de Berthier et al.
- El método de Wang y Whitlock (2003) que corrige el sesgo debido a migración para lo cual estima simultáneamente el  $N_e$  y las tasas de migración.

También se calcularon estimaciones de  $N_e$  empleando la relación que tiene este parámetro con el parámetro  $\theta$  (tasa escalada de mutación) y con  $H$  (heterocigosis esperada) bajo equilibrio neutral. En el caso del mtDNA mediante la relación  $\theta = 2N_e\mu$  empleando las estimaciones de  $\theta$

descritas en la sección de diversidad molecular. En el caso de los RAPDs mediante la relación  $H = 4N_e\mu / 4N_e\mu + 1$ , donde  $H$  puede ser la heterocigosis virtual esperada ( $h$ ).

#### 4.3.4 Diferenciación intrapoblacional

La posible presencia de grupos genéticamente diferenciados al interior de las poblaciones de *D. gigas* es algo que podría presentarse si los grupos de talla descritos en los antecedentes (chicos S, medianos M y grandes L) tienen ciclos de reproducción y migración desfasados. Debido a que solamente se tenía información de la talla en organismos de las muestras de MAN02, HUA02, PES02 y MAZ02, solamente se aplicaron los análisis a dichas muestras.

Las muestras de estas localidades fueron clasificadas de acuerdo a su talla para ubicarlos en uno de estos tres grupos (S, M y L) de acuerdo a la información proporcionada por Argüelles et al. (2001) y Tafur et al. (2001) para las muestras del Mar de Perú y a la información obtenida por Hernández-Herrera et al. (1996), Markaida y Sosa-Nishizaki (2001) y Markaida et al. (2004) para la muestra del Golfo de California. Las muestras de las localidades de MAN02, HUA02 y PES02 (Mar de Perú) fueron analizadas juntas debido a su número (10 organismos de cada una) y a la homogeneidad genética que presentaron en los análisis preliminares. Los grupos formados con las muestras del Mar de Perú quedaron así:

- Pequeños (S), 211-284 mm de LM (13 organismos).
- Medianos (M), 341-368 mm de LM (7 organismos).
- Grandes (L), >500 mm de LM (10 organismos).

En la muestra del Golfo de California (MAZ02) solamente se formaron dos grupos:

- Medianos (M), 300-370 mm de LM (30 organismos).
- Grandes (L), >500 mm de LM (16 organismos).

Los grupos así formados (pertenecientes a la misma localidad) fueron comparados mediante la estimación del estadístico  $\theta$  ( $F_{ST}$ ) de diferenciación poblacional (Weir y Cockerham, 1984) y sus frecuencias mediante la prueba exacta de Raymond y Rousset (1995).



### 4.3.5 Variación interpoblacional.

En este apartado se analizaron las muestras provenientes de todas las localidades. Los muestreos tomados en distintos años fueron agrupados y considerados como una sola muestra cuando provenían de la misma localidad.

Se estimó el estadístico de diferenciación genética poblacional  $\theta$  de Weir y Cockerham (1984) que es una versión insesgada multilocus del estadístico  $F_{ST}$ , así como el número efectivo de migrantes por generación,  $M$  (Slatkin y Barton, 1989) para todas las poblaciones y entre pares de poblaciones.  $M$  es una función de la  $F_{ST}$ : 
$$M = \frac{1 - F_{ST}}{2F_{ST}} .$$

Se estimaron las distancias genéticas basadas en coeficientes de coancestría propuestas por Reynolds et al. (1983) debido a que tienen una relación más lineal con el tiempo de divergencia entre poblaciones cuando su separación es reciente. Para visualizar gráficamente las relaciones de similitud entre las poblaciones se construyeron dendrogramas mediante el algoritmo de UPGMA (ver Nei y Kumar, 2000).

Para probar la homogeneidad de las frecuencias alélicas entre los muestreos se utilizó la prueba exacta de Raymond y Rousset (1995) de dos maneras: analizando todas las muestras simultáneamente y todos los pares de muestras.

#### 4.3.5.1 Estructura genética, aislamiento por distancia y barreras al flujo génico

La estructura genética más lógica es la que considera a las poblaciones del Hemisferio Norte (GUY, MAZ, BHM, MLL y MICH) como un grupo y a las del Hemisferio Sur (MAN, HUA, PES y REV) como otro grupo aparte. Esto se debe a la barrera que representa la distancia y al desfase de los ciclos de migración y reproducción asociados a cambios estacionales toda vez que las estaciones son diferentes en hemisferios distintos. Para corroborar que dicha estructura representa una partición que maximiza la variación genética entre grupos, se llevó a cabo un Análisis de Varianza Molecular Espacial o SAMOVA (Dupanloup et al., 2002). Dicho análisis ensaya todas las posibles particiones (o agrupaciones de poblaciones) para encontrar aquella que maximiza el porcentaje de variación genética que el Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) atribuye a diferenciación entre grupos. El AMOVA (implícito en el SAMOVA) fue implementado por Excoffier et al. (1992) y descompone jerárquicamente la aportación que hace a la variación genética total la variación entre individuos dentro de las

poblaciones, la variación entre poblaciones dentro de los grupos y la variación entre grupos de poblaciones.

Para probar el ajuste al modelo de aislamiento por distancia se probó la correlación entre matrices de distancias genéticas y distancias geográficas así como el ajuste de matrices de estimaciones de migración ( $M$ ) y distancias geográficas mediante la prueba de Mantel (Mantel, 1967; Sokal y Rohlf, 1995). Todo ello usando las distancias genéticas y geográficas entre todas las poblaciones y entre poblaciones del mismo hemisferio a fin de determinar que efecto tiene la distancia en diferentes regiones. Se realizaron pruebas adicionales con los logaritmos de las distancias geográficas, genéticas y estimaciones de migración.

El análisis propuesto por Bertorelle y Barbujani (1995) para detectar patrones espaciales en la variación genética mediante la estimación de “índices de autocorrelación” de DNA (AIDAs), es un análisis que permite inferir la asociación histórica (y no sólo al tiempo actual) que tenga un haplotipo con una ubicación geográfica determinada. Las gráficas de dicho análisis llamadas “correlogramas” permiten visualizar la distribución de la variación que puede ir desde una distribución azarosa (una línea horizontal) hasta un gradiente marcado (una recta con pendiente pronunciada). El análisis fue aplicado a datos de RAPDs y de mtDNA.

Finalmente se construyó una red de mínima longitud (minimum spanning network) y un árbol de mínima longitud que grafica las relaciones de similitud entre los haplotipos de mtDNA.

#### **4.3.6 Información histórica de las poblaciones**

El mtDNA ha sido la primera y más poderosa herramienta que se usó para obtener información histórica de las poblaciones debido a que su modo de herencia permite realizar reconstrucciones *filogenéticas* a nivel intraespecífico e incluso intrapoblacional mismas que permiten inferir muchos procesos históricos como las expansiones poblacionales o los cuellos de botella. Obviamente los análisis de este apartado se llevaron a cabo exclusivamente con información obtenida con mtDNA.

##### **4.3.6.1 Distribución de desigualdades**

Llamado en inglés *mismatch distribution*, consiste en la distribución del número observado de diferencias en todas las comparaciones pareadas de secuencias en la muestra. En ausencia de selección, y si el tamaño poblacional es constante en el tiempo, la distribución de desigualdades

es multimodal pero dentro de ciertos límites. Sin embargo, la presencia de selección, los cuellos de botella históricos, las contracciones o expansiones demográficas o espaciales así como algunas otras combinaciones de eventos y fuerzas evolutivas pueden modificar dicha distribución de desigualdades (Hudson, 1990; Rogers y Harpending, 1992; Ray et al., 2003; Excoffier, 2004).

La probabilidad de observar un número determinado de diferencias entre haplotipos (nótese que la distribución de probabilidad es la distribución esperada de desigualdades) en una población que ha tenido un incremento súbito en el tamaño efectivo puede ser calculada analíticamente. Esto permite estimar y probar estadísticamente el parámetro  $\theta$  de la población antes ( $\theta_0$ ) y después del proceso ( $\theta_1$ ) así como el número de generaciones transcurridas ( $\tau$ ) para completar la expansión (Hudson, 1990; Rogers y Harpending, 1992). De esta manera, el software empleado generó una distribución de desigualdades y los intervalos de confianza mediante simulaciones. También se llevó a cabo una prueba estadística no paramétrica (bondad de ajuste) para probar si la distribución observada se ajusta o no al escenario mencionado (expansión demográfica súbita).

Todo ello también se llevo a cabo pero bajo un escenario de una expansión espacial sin aumento del tamaño efectivo de la población.

#### **4.3.6.2 Análisis de relaciones genealógicas**

Se construyó un árbol *filogenético* de todos los haplotipos detectados en el fragmento de citocromo b mitocondrial analizado mediante el método bayesiano (Huelsenbeck y Ronquist, 2001). La elección del modelo adecuado de sustitución molecular se llevó a cabo mediante la prueba de razón de verosimilitud (Posada y Crandall, 1998). Dicha reconstrucción se llevó a cabo partiendo de la 1ª, 2ª y 3ª posiciones de los codones y también de manera conjunta ya que el fragmento analizado es una región codificante. También se llevó a cabo una reconstrucción genealógica considerando a todos los organismos analizados como OTUs (unidades taxonómicas independientes) mediante el algoritmo de Neighbor-Joining (ver Nei y Kumar, 2000).

Análogamente se realizó una reconstrucción genealógica de todos los organismos mediante datos de RAPDs empleando una matriz de distancias genéticas entre todos los organismos.

Todo ello para detectar patrones filogeográficos, eventos de migración histórica y comparar los patrones encontrados en las reconstrucciones hechas con RAPDs y mtDNA.

#### 4.3.7 Software Empleado

- **AIDA (Bertorelle y Barbujani, 1995):** Estimación de índices de autocorrelación para identificar patrones espaciales con RAPDs y mtDNA.
- **AMOVA-PREP versión 1.01 (Miller, 1998b):** Creación de las bases de datos que requiere el programa WINAMOVA y el programa SAMOVA para llevar a cabo el análisis a partir de las bases de datos de RAPDs.
- **Arlequín versión 3.0 (Excoffier et al., 2005):** Estimaciones de frecuencias alélicas con mtDNA; Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para datos de RAPDs y de mtDNA; estimaciones de variación genética y nucleotídica para datos de mtDNA ( $h$ ,  $H$ ,  $S$  y  $\pi$ ,  $\hat{\theta}_S$ ,  $\hat{\theta}_k$ ,  $\hat{\theta}_\pi$ ); distribución de desigualdades para datos de mtDNA; estimaciones de los parámetros de expansión demográfica y espacial  $\theta_0$ ,  $\theta_1$  y  $\tau$  así como simulación y obtención de intervalos de confianza de distribuciones de desigualdades bajo expansión demográfica y espacial para datos de mtDNA; la estimación de las distancias genéticas basadas en coeficientes de coancestría para información de mtDNA; las pruebas de neutralidad de Ewens-Watterson, Chakraborty, Tajima y Fu para información de mtDNA.
- **BioEdit versión 6.0.7 (Hall, 1999):** Alineamiento de secuencias (mtDNA), edición y corrección de las mismas así como identificación de alelos.
- **CoNe versión 1.01 (Anderson, 2005):** Estimaciones de  $N_e$  con información de RAPDs y de mtDNA.
- **Clustal W versión 1.4 (Thompson et al., 1994):** Alineamiento de las secuencias de mtDNA.
- **GENEPOP versión 3.3 (Raymond y Rousset, 1995):** Estimaciones del estadístico de diferenciación poblacional  $\theta$  con información de mtDNA entre muestras temporales, en los análisis intrapoblacionales y en los análisis interpoblacionales; la prueba exacta de Raymond y Rousset para datos de mtDNA en los análisis temporales, intrapoblacionales e interpoblacionales; las estimaciones de número efectivo de migrantes por generación ( $M$ ).
- **MCLEEPS versión 1.1 (Anderson et al., 2000):** Estimaciones de  $N_e$  con información de RAPDs y de mtDNA.
- **MEGA versión 3.1 (Kumar et al., 2004):** Construcción de los dendrogramas mediante UPGMA con datos de RAPDs y mtDNA. Reconstrucción genealógica de todos los individuos con datos de RAPDs y mtDNA.

- **MNe versión 1.0 (Wang y Whitlock, 2003):** Estimación de  $N_e$  y tasas de migración conjuntamente, para datos de RAPDs y mtDNA.
- **MODELTEST versión 3.7 (Posada y Crandall, 1998):** Elección del modelo adecuado de sustitución molecular para llevar a cabo la reconstrucción filogenética.
- **MrBayes versión 3.1 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001):** Reconstrucción filogenética de todos los alelos detectados en el fragmento de citocromo b analizado.
- **POPGENE versión 1.31 (Yeh et al., 1999):** Estimaciones de variación genética  $h$  (diversidad genética) e  $I$  (índice de información de Shannon) para datos de RAPDs; estimaciones del número efectivo de migrantes por generación ( $M$ ) para datos de RAPDs.
- **SAMOVA versión 1.01 (Dupanloup et al., 2002):** Análisis de Varianza Molecular Espacial para datos de RAPDs y de mtDNA.
- **TEMPEST versión 1.4 (Sandoval-Castellanos, Apéndice # 2):** Prueba de heterogeneidad de frecuencias alélicas entre muestras temporales y estimaciones de  $F_{ST}$  entre muestras temporales de RAPDs y mtDNA.
- **TempTest versión 2.2 (Waples, 1989a):** Prueba de heterogeneidad de frecuencias alélicas entre muestras temporales de RAPDs y mtDNA.
- **TFGA versión 1.3 (Miller, 1998a):** Estimaciones de frecuencias alélicas con RAPDs; estimaciones de  $\theta$  ( $F_{ST}$ ) entre muestras temporales, entre grupos de edades (análisis intrapoblacional) y entre localidades (análisis interpoblacional) para datos de RAPDs; la prueba exacta de Raymond y Roussett entre muestras temporales, entre grupos de edades (análisis intrapoblacional) y entre localidades (análisis interpoblacional) para frecuencias de RAPDs; las distancias genéticas (basadas en coeficientes de coancestría) para datos de RAPDs; la prueba de Mantel para el ajuste al modelo de aislamiento por distancia con información de RAPDs y de mtDNA.
- **tm3.1 versión 3.1 (Berthier et al., 2002):** Estimaciones de  $N_e$  con información de RAPDs y de mtDNA.
- **WINAMOVA versión 1.4 (Excoffier, 1992):** Análisis de Varianza Molecular para datos de RAPDs.

## **5. RESULTADOS**

## 5.1 RAPDS

Se obtuvieron 124 bandas amplificadas con cinco iniciadores (primers) de la serie OPF (OPF-1, OPF-3, OPF-4, OPF-5 y OPF-6) de las cuales solamente 74 cumplieron con los requisitos para ser incluidas en el análisis (tabla 2). Dichas bandas tuvieron un tamaño entre 190 y 1000 pares de bases (figura 14).

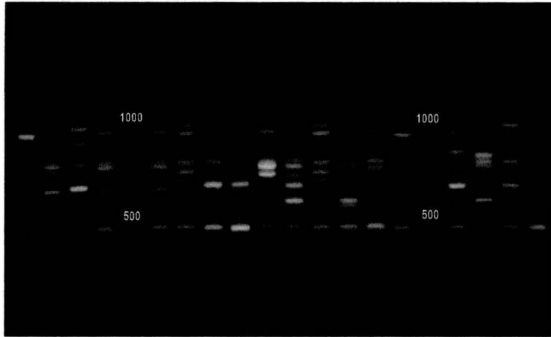


Figura 14. Bandas amplificadas con los iniciadores OPF-14.

**Tabla 2. Iniciadores empleados y número de loci analizados por cada uno.**

Primer	Secuencia	# loci
OPF-01	5'-ACGGATCCTG-3'	26
OPF-03	5'-CCTGATCACC-3'	7
OPF-04	5'-GGTGATCAGG-3'	17
OPF-05	5'-CCGAATTCCC-3'	12
OPF-06	5'-GGGAATTCCG-3'	12

**Tabla 3. Estimaciones de variación genética con RAPDs: diversidad genética de Nei,  $h$ , y el índice de información de Shannon,  $I$ . El segundo renglón muestra la desviación estandar.**

Clave	$h$	$I$
GUY02/03	0.237 0.119	0.388 0.153
MAZ01/02/03	0.217 0.113	0.363 0.148
BHM03	0.176 0.159	0.284 0.229
MICH04	0.199 0.113	0.338 0.152
MAN02	0.238 0.155	0.376 0.214
HUA02	0.221 0.148	0.357 0.202
PES02	0.250 0.155	0.393 0.213
REV05	0.214 0.140	0.351 0.190
Total	0.238 0.108	0.393 0.136

### 5.1.1 Diversidad genética

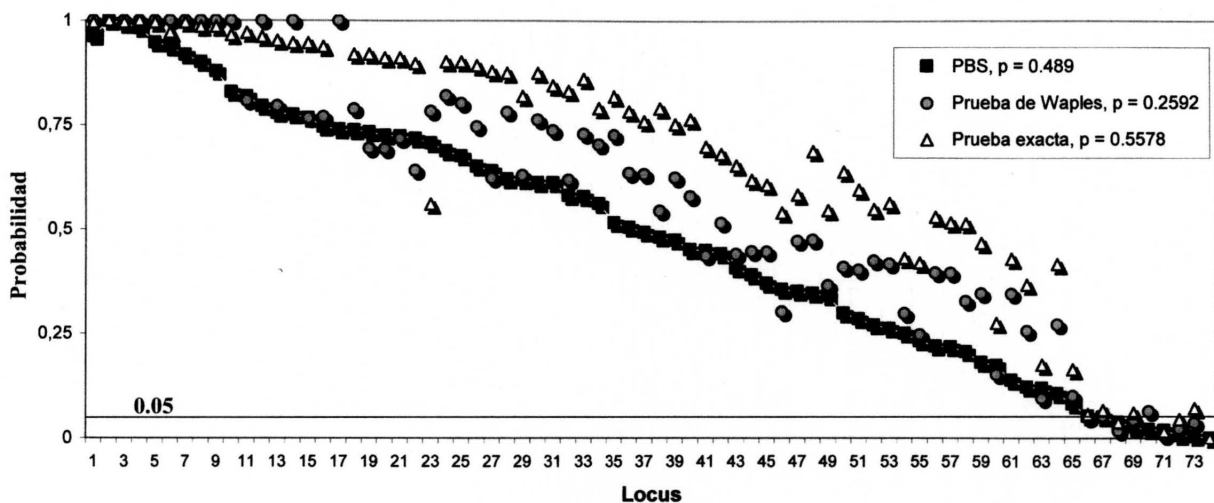
En términos generales la diversidad genética con RAPDs resultó entre baja y moderada, dentro de los límites de los estudios con RAPDs, pues su carácter dominante limita su máxima diversidad a 0.5. Las estimaciones se mostraron relativamente homogéneas entre todas las localidades con los valores máximos en la localidad de Perú Sur (PES) (tabla 3).

### 5.1.2 Variación temporal, tamaño efectivo de la población y deriva génica

No se encontraron evidencias de variación temporal significativa en las frecuencias alélicas de la población analizada. El valor de  $\theta$  ( $F_{ST}$ ) entre muestras temporales para la única comparación realizada

(MAZ01 vs MAZ02) fue de 0.013 (intervalo de confianza, IC: 0.002 a 0.026), mientras que el estadístico  $F_{STT}$  promedio entre todos los loci fue de 0.002 ( $P[F_{STT}>0] = 0.518$ ).

La figura 15 muestra una grafica con las probabilidades obtenidas con la prueba basada en simulaciones (PBS), la prueba exacta y la prueba de Waples aplicadas sobre los 74 loci analizados con RAPDs. La PBS detectó siete loci significativos ( $p < 0.05$ ), la prueba exacta siete y la prueba de Waples cuatro. Los valores de probabilidad totales (multilocus) fueron: 0.489 para la PBS, 0.558 para la prueba exacta y 0.004 para la prueba de Waples (al ser la única que no da un valor multilocus se aplicó la corrección de Bonferroni, de tal manera que la probabilidad con esta prueba es equivalente a 0.259 con un solo locus). La PBS presentó valores mucho menores que las otras dos pruebas, posiblemente debido a la subestimación del error de muestreo que dichas pruebas presentan por su diseño teórico (ver Apéndice # 2).



**Figura 15. Probabilidades obtenidas con tres pruebas estadísticas aplicadas a las frecuencias alélicas de 74 loci de RAPDs tomadas en dos años consecutivos (MAZ01 vs MAZ02). Los loci fueron ordenados de acuerdo a su probabilidad con la PBS (de mayor a menor) con fines de visualización. En el recuadro se muestran los valores globales (sobre todos los loci) de cada prueba.**

El tamaño efectivo de la población estimado por los diferentes métodos es reducido en todos los casos y va desde  $N_e = 16.78$  (IC: 14.58-68.66) hasta 33.6 (IC: 19.49-72.42). Dichas estimaciones aparentemente están muy influenciadas por la presencia de unos pocos loci. Al retirar del análisis a los siete loci que presentaron diferencias significativas en sus frecuencias alélicas, las estimaciones rápidamente se incrementan y alcanzan el tope permitido por la computadora en los métodos de verosimilitud ( $> 9\ 000$ ) indicando que la mayoría de los alelos sustentan un tamaño efectivo de la población, de miles cuando menos.



La estimación obtenida mediante  $h$  fue de 78,256,303 para una tasa de mutación  $\mu = 1.0 \times 10^{-9}$ . Si se usa un valor de  $\mu$  diez veces mayor, el  $N_e$  se reduce diez veces (a 7,825,630). Esto confirma que el  $N_e$  debe de ser un valor grande y que los valores bajos que se estimaron probablemente son el efecto de unos pocos loci sometidos a alguna fuerza como la selección natural.

### 5.1.3 Diferenciación intrapoblacional

No se encontraron indicios de diferenciación genética entre los grupos de edades de las muestras de las localidades de MAN02, HUA02, PES02 y MAZ02. Aunque los valores de  $\theta$  ( $F_{ST}$ ) son positivos los intervalos de confianza abarcan valores negativos (tabla 4). En la prueba

**Tabla 4. Estimación de  $\theta$  entre grupos de talla y probabilidad obtenida con la prueba exacta.**

Comparación tamaño LM (No. de organismos)	Localidades	$\theta$ (S.D.)	Prob. P. Exacta
Pequeños 300-370 mm (30) vs Grandes >500 mm (16)	Mazatlán (MAZ02)	-0.005 (0.004)	$P = 1.000$
Pequeños 211-284 mm (13) vs Medianos 341-368 mm (7) vs Grandes >500 mm (10)	Mar de Perú (MAN02, HUA02 y PES02)	0.015 (0.010)	$P = 0.958$

exacta los los valores de  $p$  fueron muy elevados, alcanzando incluso el valor de 1.000. Esto se debe en parte a la naturaleza de la prueba, que tiende a redondear valores elevados de  $p$ , y a que los muestreos no son demasiado grandes. No obstante, el grado de homogeneidad en las frecuencias es notorio.

### 5.1.4 Diferenciación interpoblacional y estructura genética

El valor del índice de diferenciación poblacional  $\theta$  ( $F_{ST}$ ) aplicado a todas las localidades fue de 0.081 (IC: 0.039 a 0.134). El número estimado de migrantes por generación ( $M$ ) sobre todas las muestras fue de 4.25 (migrantes promedio por generación). Los valores entre pares de muestras se presentan en las tablas 5 y 6. Los valores obtenidos mediante la prueba exacta presentaron una heterogeneidad notable entre las frecuencias de las muestras, tanto en el valor general para todas las muestras ( $p < 0.001$ ) como en los valores pareados (tabla 5). Los valores de distancias genéticas se muestran en la tabla 6.

**Tabla 5. Estimaciones de  $\theta$  ( $F_{ST}$ ; sobre la diagonal) y probabilidad obtenida con la prueba exacta (bajo la diagonal) entre pares de muestras. Las comparaciones que presentaron diferencias significativas están resaltadas con negritas.**

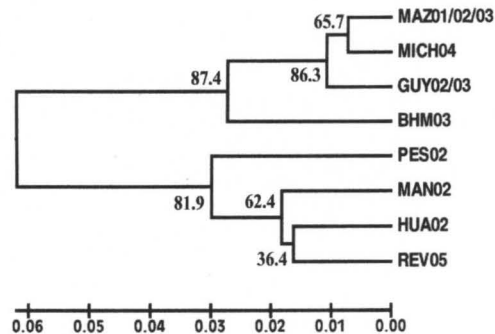
	GUY02/ 03	MAZ01/ 02/03	BHM03	MICH 04	MAN02	HUA02	PES02	REV05
GUY02/03	-	<b>0.019</b>	<b>0.035</b>	<b>0.023</b>	<b>0.116</b>	<b>0.065</b>	<b>0.127</b>	<b>0.111</b>
MAZ01/02/03	<b>0.001</b>	-	<b>0.077</b>	<b>0.015</b>	<b>0.151</b>	<b>0.083</b>	<b>0.148</b>	<b>0.116</b>
BHM03	0.158	<b>&lt;0.001</b>	-	<b>0.048</b>	<b>0.129</b>	<b>0.080</b>	<b>0.145</b>	<b>0.139</b>
MICH04	0.229	<b>0.017</b>	0.323	-	<b>0.147</b>	<b>0.077</b>	<b>0.128</b>	<b>0.112</b>
MAN02	<b>0.013</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.659	<b>0.009</b>	-	0.035	<b>0.065</b>	<b>0.037</b>
HUA02	<b>0.047</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.995	0.273	1.000	-	<b>0.054</b>	<b>0.032</b>
PES02	<b>0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.178	<b>0.007</b>	1.000	1.000	-	<b>0.056</b>
REV05	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.836	0.587	<b>0.028</b>	-

**Tabla 6. Número efectivo de migrantes por generación,  $M$  (sobre la diagonal) y distancias genéticas basadas en coeficientes de coancestría (bajo la diagonal) entre pares de muestras.**

	GUY02/ 03	MZ01/ 02/03	BHM03	MICH 04	MAN02	HUA02	PES02	REV05
GUY02/03	-	29.42	11.73	21.00	5.653	8.655	5.250	6.876
MAZ01/02/03	0.020	-	7.630	<b>32.86</b>	5.145	8.008	5.114	7.040
BHM03	0.035	0.080	-	10.13	4.690	6.586	4.113	4.739
MICH04	0.024	0.015	0.048	-	4.863	7.899	5.448	6.796
MAN02	0.122	<b>0.161</b>	0.137	0.157	-	10.87	7.846	13.67
HUA02	0.067	0.086	0.083	0.079	0.035	-	8.744	14.92
PES02	0.135	0.158	0.156	0.134	0.067	0.055	-	10.58
REV05	0.117	0.123	0.149	0.117	0.037	0.032	0.057	-

La figura 16 muestra el dendrograma obtenido por UPGMA.

El Análisis de Varianza Molecular Espacial (SAMOVA) encontró que el agrupamiento que maximiza la variación debida a diferenciación entre grupos es el mismo agrupamiento de muestras que el que sugiere el dendrograma (Hemisferio Sur vs Hemisferio Norte). Los detalles del AMOVA realizado con la estructura genética mencionada se muestran en la tabla 7.



**Figura 16. Dendrograma entre poblaciones construido con el algoritmo de UPGMA empleando las distancias genéticas basadas en coeficientes de coancestría.**

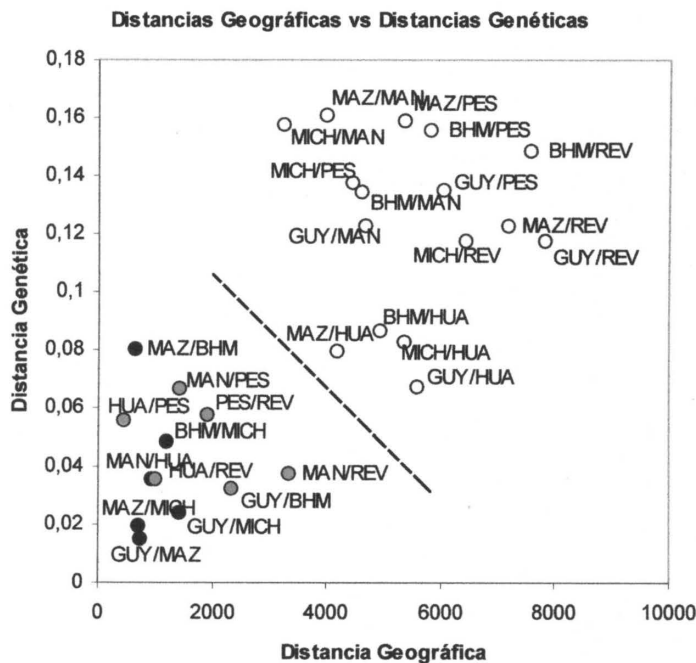
**Tabla 7. Detalles del AMOVA. El agrupamiento probado es el de muestras del Hemisferio Norte contra muestras del Hemisferio Sur. Los valores de probabilidad fueron obtenidos con una distribución nula de 1000 repeticiones de remuestros por *bootstrapping*.**

Tipo de varianza	g.l.	Var	Total	$\Phi_{SC/ST/CT}$	P
Entre grupos	1	0.827	6.15%	0.045	<0.001
Entre poblaciones dentro de los grupos	6	0.567	4.22%	0.104	<0.001
Dentro de las poblaciones	189	12.06	89.64%	0.061	<0.001

La clara división entre poblaciones del Hemisferio Norte y poblaciones del Hemisferio Sur puede deberse a aislamiento por distancia o a una barrera geográfica (sugerida por el análisis SAMOVA/AMOVA) o por ambos factores.

El ajuste al modelo de aislamiento por distancia fue significativo. La correlación entre matrices de distancias geográficas y genéticas fue significativa con la prueba de Mantel

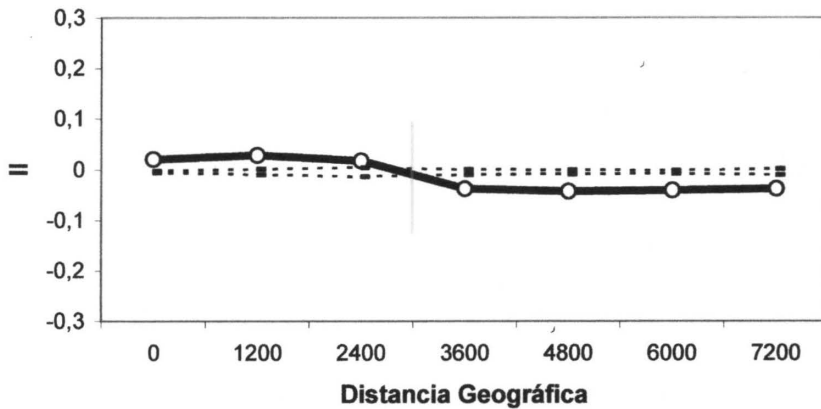
aplicada a todas las muestras ( $r = 0.754, p = 0.011$ ). No obstante, es posible que dicho resultado se deba más a una barrera geográfica que al flujo génico entre los hemisferios pues cuando se aplicó la prueba con muestras del mismo hemisferio por separado no se encontró ninguna correlación ( $r = -0.424$  y  $-0.201, p = 0.745$  y  $0.752$ , para el Hemisferio Sur y el Hemisferio Norte respectivamente). En la gráfica de la figura 17 se indica con una línea punteada la separación que divide las comparaciones entre muestras del mismo grupo (bajo la línea)



**Figura 17. Gráfica de la correlación entre distancias geográficas y distancias genéticas. Los puntos en negro corresponden a las comparaciones entre localidades del Hemisferio Norte, los puntos en gris a las comparaciones entre localidades del Hemisferio Sur y los puntos en blanco a las comparaciones entre localidades de diferentes hemisferios.**

de las comparaciones entre grupos distintos (arriba de la línea).

El autocorrelograma de la figura 18 muestra lo que aparentemente es un gradiente de poca pendiente. Sin embargo, una observación minuciosa permite observar dos grupos de categorías: debajo de los 3,000 kilómetros (es decir en comparaciones entre poblaciones del mismo grupo) existe el mismo nivel de correlación, mientras que por arriba de esta distancia hay menos correlación (es decir entre muestras de diferentes grupos). Esto sustenta la hipótesis de que el



resultado del análisis de aislamiento por distancia es más un artefacto debido a una barrera geográfica que divide a dos grupos de poblaciones que están separados por distancias grandes.

**Figura 18. Autocorrelograma obtenido mediante RAPDs.**

El análisis genealógico muestra un patrón que divide a todas las muestras del Hemisferio Sur en un linaje y a las del Hemisferio Norte en otro. Aunque adentro de estos grupos hay mezclas de localidades que evidencian flujo génico, no existen intromisiones de organismos del Hemisferio Sur agrupados con organismos del Hemisferio Norte ni viceversa. Esto denota una fuerte separación entre los grupos al no presentar eventos mínimos de migración. El fenograma construido con todos los individuos como OTUs se presenta en la figura 26 (sección de mtDNA).

## 5.2 ANÁLISIS DE DNA MITOCONDRIAL

Los iniciadores empleados amplificaron un producto de 367 pb con una composición nucleotídica de: C = 17.16%; T = 25.87%; A = 44.71%; G = 12.26%. Se detectaron 20 haplotipos en todas las muestras con 28 sitios segregantes (ver Apéndice # 3) que contenían 31 sustituciones: 25 transiciones y 6 transversiones.

### 5.2.1 Diversidad genética y molecular

La diversidad genética total (heterocigosis virtual) resultó moderada alcanzando valores máximos en la población de Manzanillo (MLL),  $H = 0.587$ . La diversidad nucleotídica también fue más alta en MLL ( $\pi_n = 0.007$ ) que en las demás poblaciones en donde estuvo alrededor de  $\pi_n \sim 0.005$ ). Los valores de  $\theta_K$  y  $\theta_S$  comparados con  $\pi_n$  dan una buena idea de la distribución de los alelos en las localidades: Mazatlán (MAZ) presenta los valores más elevados, mientras que Manzanillo (MLL) y Michoacán (MICH) presentan valores equilibrados y el resto presentan valores pequeños debido a la presencia de pocos haplotipos, sin que tal déficit llegue a ser significativo (tabla 8).

La prueba de Ewens-Watterson no detectó desviaciones de la neutralidad para ninguna localidad. En cambio la prueba de Chakraborty presentó valores muy heterogéneos de probabilidad en los que las localidades de Mazatlán (MAZ) y Michoacán (MICH) presentan un exceso significativo de haplotipos. Esta prueba es conocida por ser particularmente sensible a los efectos de la mezcla de poblaciones, lo que es posible en estas localidades debido a su ubicación geográfica. Los valores de la  $D$  de Tajima resultaron significativos para varias localidades indicando pocos sitios segregantes ( $S$ ) con respecto al número de diferencias entre pares de secuencias ( $\pi$ ). Ello denota una posible influencia de selección natural, tasas de mutación diferentes o fluctuaciones poblacionales en la historia evolutiva de la variación analizada. La prueba de Fu, que es más sensible a los efectos de las fluctuaciones poblacionales resultó significativa solamente para la localidad de Mazatlán (MAZ) pero presentó valores casi significativos en las localidades de Región V (REV) y Michoacán (MICH) (tabla 8).

**Tabla 8. Estimaciones de diversidad genética y molecular obtenidas con el fragmento de citocromo b mitocondrial analizado. Los valores de  $\theta$  se presentan estandarizados por sitio y las varianzas debajo. En el caso de  $\theta_k$  se presenta el intervalo de confianza del 95%. También se presentan resultados de las pruebas de neutralidad: el valor  $p$  de encontrar  $k$  o más alelos en muestras simuladas (prueba de Chakraborty); los estadísticos  $D$  de Tajima y el estadístico  $F_s$  (prueba de Fu) con los valores de significancia debajo.**

Localidad	$H$	$\pi_n$	$\hat{\theta}_S$	$\hat{\theta}_k$	Charkraborty P(obs $\geq k$ )	Tajima D P	Fu, $F_s$ P
GUY02/03	0.410 0.086	0.005 0.003	0.008 0.003	0.003 0.001-0.008	0.121	-1.222 0.112	1.522 0.191
MAZ01/02/03	0.398 0.068	0.005 0.003	<b>0.011</b> 0.003	<b>0.008</b> 0.004-0.016	<b>&lt;0.001</b>	<b>-0.916</b> 0.003	<b>-0.350</b> 0.041
BHM03	0.378 0.181	0.005 0.004	0.008 0.004	0.003 0.001-0.010	0.278	<b>0.529</b> 0.019	3.275 0.546
MLL	<b>0.587</b> 0.100	<b>0.007</b> 0.004	0.009 0.004	0.006 0.002-0.013	0.168	<b>-0.776</b> 0.000	1.046 0.122
MICH04	0.386 0.139	0.004 0.003	0.006 0.003	0.005 0.002-0.013	<b>0.037</b>	<b>-0.791</b> 0.003	0.261 0.074
MAN02	0.200 0.154	0.002 0.002	0.003 0.002	0.001 0.000-0.005	0.395	<b>-1.562</b> 0.001	1.224 0.210
HUA02	0.417 0.191	0.005 0.004	0.007 0.004	0.003 0.001-0.011	0.316	<b>-1.189</b> 0.002	1.657 0.290
PES02	0.511 0.164	0.005 0.003	0.004 0.002	0.003 0.001-0.010	0.503	0.927 0.118	1.667 0.273
REV05	0.067 0.061	0.001 0.001	0.002 0.001	0.001 0.000-0.003	0.189	<b>-1.732</b> 0.000	0.135 0.089
Hemisferio Norte	0.427 0.045	0.006 0.003	0.012 0.003	0.011 0.006-0.018	<b>&lt;0.001</b>	<b>-1.524</b> 0.004	<b>-3.798</b> 0.022
Hemisferio Sur	0.223 0.071	0.002 0.002	0.005 0.002	0.004 0.002-0.009	<b>0.001</b>	<b>-1.564</b> 0.011	<b>-1.464</b> 0.071
Total	0.377 0.040	0.006 0.003	0.012 0.003	0.003 0.002-0.008	0.000	-1.696 0.000	-8.094 0.004

### 5.2.2 Variación temporal, tamaño efectivo de la población y deriva génica

Los valores de  $\theta$  y de la  $F_{ST}$  en las comparaciones temporales resultaron positivos en algunos casos pero en ningún caso significativos.

Los valores de probabilidad obtenidos con la prueba basada en simulaciones (PBS), la prueba exacta y la prueba de Waples se presentan en la tabla 9, así como las estimaciones de  $\theta$  y de la  $F_{ST}$ . Los valores de probabilidad obtenidos son no significativos en todos los casos y tienden a ser menores con la prueba exacta y la prueba de Waples que con la PBS. Esto posiblemente se debe a propiedades teóricas de las dos pruebas (prueba exacta y prueba de Waples) relacionadas con la no independencia de las frecuencias alélicas en un loci con

múltiples alelos, lo cual es asumido cuando se usa una  $\chi^2$  cuadrada como estadístico de prueba. Esta situación no se presenta en la PBS (ver Apéndice # 2).

**Tabla 9. Estimaciones de  $\theta$  y  $F_{ST}$  entre muestras espaciadas temporalmente así como las probabilidades obtenidas con tres pruebas estadísticas: la prueba basada en simulaciones (PBS), la prueba exacta y la prueba de Waples. Los valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar (para  $\theta$ ) y a la probabilidad de que  $F_{ST}$  sea mayor que cero.**

	MAZ01 vs MAZ02	MAZ01 vs MAZ03	MAZ02 vs MAZ03	GUY02 vs GUY03
$\theta$	0.001 (0.012)	-0.002 (0.232)	0.014 (0.023)	0.044 (0.530)
$F_{ST}$	-0.020 (0.151)	-0.027 (0.042)	0.017 (0.421)	0.032 (0.520)
P. B. S.	0.821	0.979	0.350	0.150
Prueba exacta	0.495	1.000	0.221	0.122
Prueba de Waples	0.072	0.123	0.031	0.010

Las estimaciones de tamaño efectivo de la población resultaron elevadas y alcanzaron el límite máximo permitido por los métodos de verosimilitud (> 9,000) pero con intervalos de confianza mucho más amplios que los obtenidos con RAPDs. Los valores y los intervalos de confianza e presentan en la tabla 10.

La estimación obtenida mediante  $\Theta_\pi$  requiere asumir un valor conocido de la tasa de mutación. Para  $\mu = 1.0 \times 10^{-9}$ , el tamaño efectivo de la población sería de 2,786,376. Si se usa un valor de  $\mu$  diez veces mayor, el  $N_e$  se reduce diez veces (a 278,638).

**Tabla 10. Estimaciones del tamaño efectivo de la población para todas las comparaciones con mtDNA con cuatro distintos métodos.**

	MAZ01 vs MAZ02	MAZ01 vs MAZ03	MAZ02 vs MAZ03	GUY02 vs GUY03
Waples	Indet.	Indet.	Indet.	27.54
Berthier	>5 000 (4.55->5 000)	>5 000 (20.14->5 000)	1 260 (4.55-5 000)	67.39 (0-5 000)
Anderson 2000	>5 000	>5 000	>5 000	128.52
Anderson 2005	>5 000	>5 000	>5 000	4598
Wang y Whitlock	7 343 (6.84->9 000)	>9 000 (7.48->9 000)	6 145 (5.78->9 000)	8 984 (12.69->9 000)

### 5.2.3 Diferenciación intrapoblacional

No se encontraron indicios de diferenciación genética entre los grupos de edades de las muestras analizadas (MAN02, HUA02, PES02 y MAZ02). Los valores de  $\theta$  ( $F_{ST}$ ) tampoco resultaron significativos (tabla 11). Al igual que con RAPDs las frecuencias alélicas indican una distribución homogénea entre los grupos de distinta talla (ver tabla 11).

**Tabla 11. Estimación de  $\theta$  entre grupos de talla y probabilidad obtenida con la prueba exacta.**

Comparación tamaño LM (No. de organismos)	Localidades	$\theta$ (S.D.)	Prob. P. Exacta
Medianos 300-370 mm (30) vs Grandes >500 mm (16)	Mazatlán (MAZ02)	-0.001 (0.003)	$P = 0.856$
Pequeños 211-284 mm (13) vs Medianos 341-368 mm (7) vs Grandes >500 mm (10)	Mar de Perú (MAN02, HUA02 y PES02)	0.055 (0.020)	$P = 1.000$

#### 5.2.4 Diferenciación interpoblacional y estructura genética

El valor del índice de diferenciación poblacional  $\theta$  ( $F_{ST}$ ) aplicado a todas las localidades fue de 0.037 (Desviación Estándar, DE: 0.005). El número estimado de migrantes por generación ( $M$ ) sobre todas las muestras fue de 7.12 (migrantes promedio por generación). Los valores entre pares de muestras se presentan en las tablas 12 y 13. Los valores obtenidos mediante la prueba exacta presentaron evidencias de una heterogeneidad notable, tanto en el valor general para todas las muestras ( $p = 0.007$ ) como en los valores pareados (ver tabla 12). Los valores de distancias genéticas se muestran en la tabla 13.

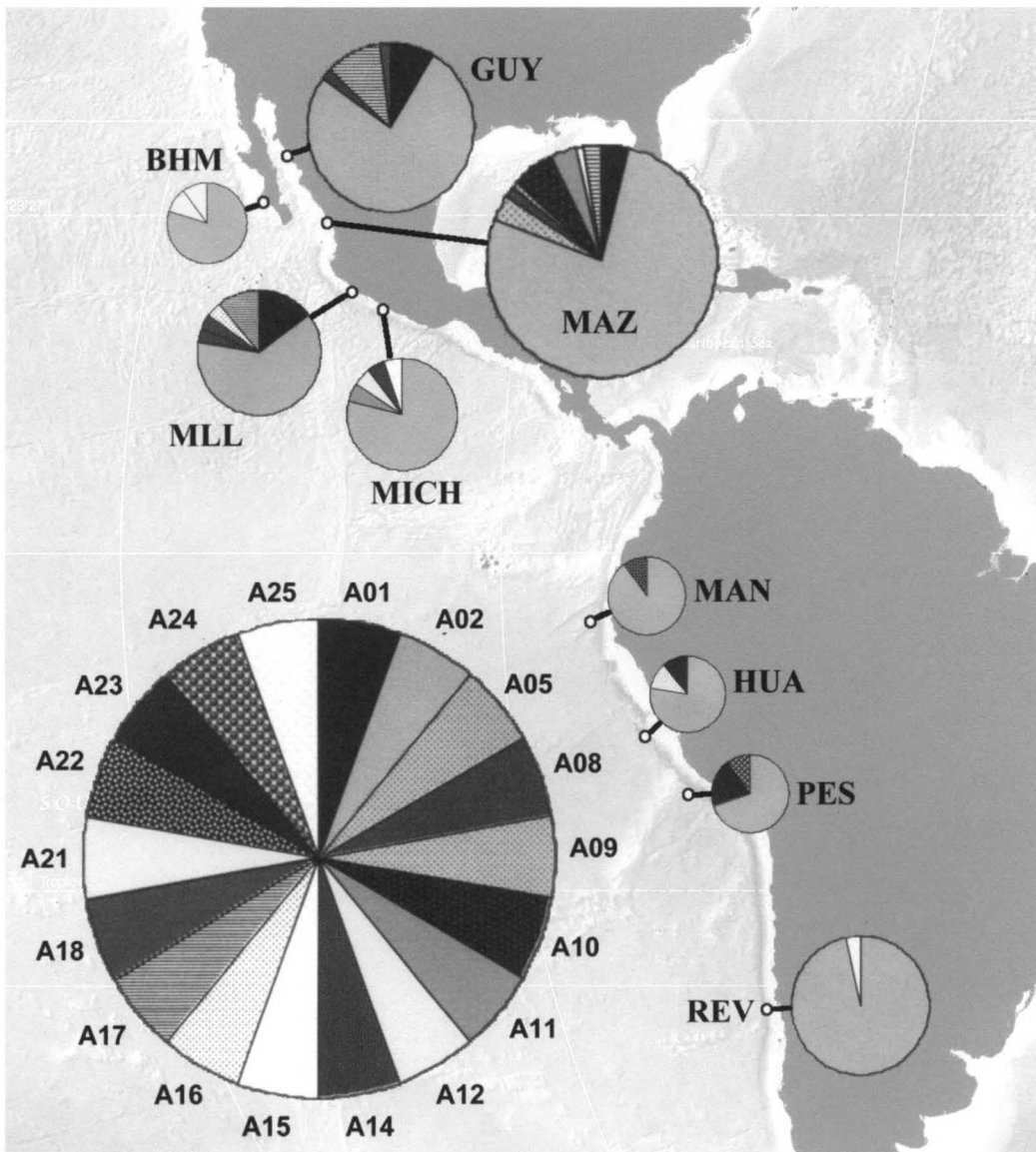
**Tabla 12. Estimaciones de  $\theta$  ( $F_{ST}$ ; sobre la diagonal) y probabilidad obtenida con la prueba exacta (bajo la diagonal) entre pares de muestras. Las comparaciones que presentaron diferencias significativas están resaltadas con negritas.**

	GUY02 /03	MAZ01 /02/03	BHM 03	MLL01	MICH 04	MAN 02	HUA02	PES02	REV05
GUY02/03	-	0.013	0.018	-0.003	0.003	-0.017	-0.014	0.039	0.076
MAZ01/02/03	0.117	-	-0.009	0.032	-0.020	-0.019	-0.016	0.022	0.041
BHM03	0.157	0.322	-	0.027	-0.034	-0.019	-0.053	0.011	0.117
MLL01	0.529	<b>0.047</b>	0.266	-	0.029	0.037	-0.001	0.033	<b>0.176</b>
MICH04	<b>0.049</b>	0.338	0.868	0.114	-	-0.027	-0.036	0.025	0.074
MAN02	0.392	0.676	1.000	0.451	0.897	-	-0.022	<b>0.080</b>	0.001
HUA02	0.151	0.285	1.000	0.378	0.641	0.591	-	-0.058	<b>0.142</b>
PES02	0.051	0.075	0.457	0.090	0.265	0.333	1.000	-	<b>0.293</b>
REV05	<b>0.030</b>	0.689	0.134	<b>0.001</b>	0.075	0.447	0.132	<b>0.025</b>	-



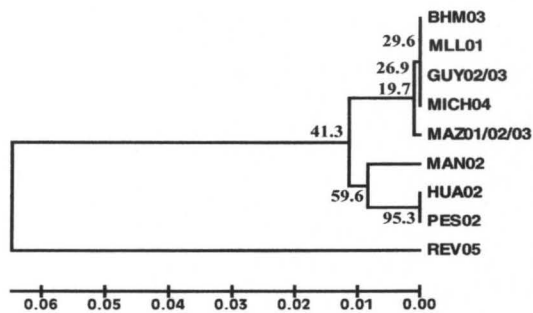
**Tabla 13. Número efectivo de migrantes por generación,  $M$  (sobre la diagonal) y distancias genéticas basadas en coeficientes de coancestría (bajo la diagonal) entre pares de muestras.**

	GUY02 /03	MAZ01 /02/03	BHM 03	MLL01	MICH 04	MAN 02	HUA02	PES02	REV05
GUY02/03	-	38.06	26.58	>100	182.7	>100	>100	12.28	6.097
MAZ01/02/03	0.013	-	>100	15.23	>100	>100	>100	22.38	11.75
BHM03	0.019	0.000	-	18.29	>100	>100	>100	46.22	3.783
MLL01	0.000	0.032	0.027	-	16.48	12.93	>100	14.71	2.335
MICH04	0.003	0.000	0.000	0.030	-	>100	>100	19.31	6.295
MAN02	0.000	0.000	0.000	0.038	0.000	-	6.29	5.761	>100
HUA02	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-	>100	3.026
PES02	0.040	0.022	0.011	0.033	0.026	0.083	0.000	-	1.207
REV05	0.079	0.042	0.124	<b>0.194</b>	0.076	0.001	0.153	<b>0.347</b>	-



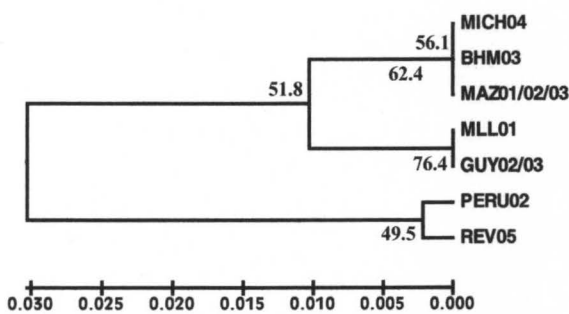
**Figura 19. Frecuencias de los principales haplotipos de citocromo b encontrados en las localidades muestreadas (indicadas con un punto). El área de los círculos es proporcional al tamaño de las muestras.**

La distribución de los haplotipos en las diferentes localidades se muestra en la figura 19. Ahí se ve como el haplotipo dominante (el A02) está distribuido a frecuencias similares en todas las



**Figura 20. Dendrograma entre poblaciones construido con el algoritmo de UPGMA empleando las distancias genéticas basadas en coeficientes de coancestría.**

obtenido por UPGMA. Éste presenta una inconsistencia topológica importante con el patrón encontrado en RAPDs, aunque con poco sustento de bootstrapping: la población de Chile (REV05) aparentemente polariza los árboles induciendo a las localidades de Perú a mezclarse



**Figura 21. Dendrograma entre poblaciones construido con el algoritmo de UPGMA empleando las distancias genéticas basadas en coeficientes de coancestría. Las muestras del Mar de Perú se agruparon en una sola.**

con las del Hemisferio Norte aunque estas (las de Perú; MAN, HUA y PES) tienden a mantenerse juntas. Para probar si este agrupamiento se debe al pequeño tamaño de las muestras de Perú (10 organismos en cada localidad), se construyó un segundo dendrograma analizando a todas las muestras del Mar de Perú (MAN, HUA y PES) como una sola. La figura 21 muestra dicho dendrograma en donde la agrupación de Perú efectivamente se asocia a la muestra de Chile dejando en una rama a las muestras del Hemisferio Sur y en otra a las muestras del Hemisferio Norte, aunque los valores de bootstrap se mantienen relativamente bajos.

El Análisis de Varianza Molecular Espacial (SAMOVA) encontró el mismo agrupamiento que maximiza la diferenciación entre grupos encontrado con el análisis de RAPDs. Este agrupamiento es el que divide en poblaciones del Hemisferio Norte y poblaciones del Hemisferio Sur. Los detalles del AMOVA para datos de mtDNA se presentan en la tabla 14.

También se observa como las localidades de Michoacán (MICH) y sobre todo la de Mazatlán (MAZ) muestran muchos alelos a bajas frecuencias mientras que otras como la Región V (REV) solamente dos. En general las localidades del Hemisferio Norte muestran mayor diversidad de alelos que las del Hemisferio Sur.

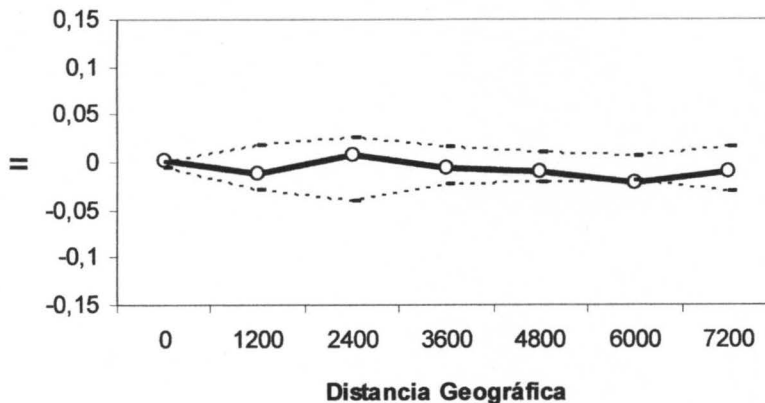
La figura 20 muestra el dendrograma obtenido por UPGMA. Éste presenta una inconsistencia topológica importante con el patrón encontrado en RAPDs, aunque con poco sustento de bootstrapping: la población de Chile (REV05) aparentemente polariza los árboles induciendo a las localidades de Perú a mezclarse con las del Hemisferio Norte aunque estas (las de Perú; MAN, HUA y PES) tienden a mantenerse juntas. Para probar si este agrupamiento se debe al pequeño tamaño de las muestras de Perú (10 organismos en cada localidad), se construyó un segundo dendrograma analizando a todas las muestras del Mar de Perú (MAN, HUA y PES) como una sola. La figura 21 muestra dicho dendrograma en donde la agrupación de Perú efectivamente se asocia a la muestra de Chile dejando en una rama a las muestras del Hemisferio Sur y en otra a las muestras del Hemisferio Norte, aunque los valores de bootstrap se mantienen relativamente bajos.

**Tabla 14. Detalles del AMOVA. El agrupamiento probado es el de muestras del Hemisferio Norte contra muestras del Hemisferio Sur. Los valores de probabilidad fueron obtenidos con una distribución nula de 1000 repeticiones de remuestros por *bootstrapping*.**

Tipo de varianza	g.l.	Var	Total	$\Phi_{SC/ST/CT}$	P
Entre grupos	1	3.246	2.02%	0.017	<0.001
Entre poblaciones dentro de los grupos	7	9.106	1.13%	0.031	<0.001
Dentro de las poblaciones	236	239,3	96.85%	0.020	<0.001

El ajuste al modelo de aislamiento por distancia fue pequeño y no significativo con la prueba de Mantel aplicada a todas las muestras. Se obtuvo una correlación muy débil y estadísticamente no significativa ( $r = -0.248$ ;  $p = 0.790$ ).

Esto sustenta la hipótesis de que el aislamiento por distancia detectado en el análisis de RAPDs es mas bien un artefacto analítico ocasionado por una barrera al flujo génico que polariza a las poblaciones de *D. gigas* en dos grupos (Hemisferio Sur y Hemisferio Norte) que, al estar separados por miles de kilómetros, provocan la tendencia a encontrar menores



**Figura 22. Autocorrelograma obtenido mediante mtDNA.**

distancias genéticas entre localidades cercanas (dentro del mismo grupo) que entre localidades lejanas (en grupos diferentes). Los índices de autocorrelación indican la presencia de un casi imperceptible gradiente del tipo llamado “diferenciación de gran distancia” que es un gradiente en el que los efectos del flujo génico, deriva y selección local han perturbado el patrón puramente inclinado que se espera de poblaciones en equilibrio neutral y flujo génico pequeño (figura 22).

### 5.2.5 Información histórica de las poblaciones

El patrón encontrado en la distribución de desigualdades observada aplicada a todas las muestras conjuntamente es multimodal (figura 23) y presenta un ajuste estadístico marginal a una súbita expansión demográfica ( $p = 0.180$ , probabilidad de que las diferencias entre el modelo y las simulaciones sean mayores que las diferencias entre el modelo y la dist. observada), misma que fue más acorde a una expansión espacial ( $p = 0.680$ ). En el Hemisferio Norte la distribución observada fue significativamente diferente del modelo de expansión demográfica ( $p = 0.020$ ) pero no espacial ( $p = 0.780$ ). La misma tendencia se observó en el Hemisferio Sur (expansión demográfica,  $p = 0.080$ ; expansión espacial,  $p = 0.520$ ).

**Figura 23. Distribución de desigualdades de todo el conjunto de muestras y de los muestreos agrupados en Hemisferio Norte y Hemisferio Sur con curvas teóricas (Modelo) y límites de confianza del 95% bajo un escenario de expansión demográfica (derecha) y una expansión espacial (izquierda).**

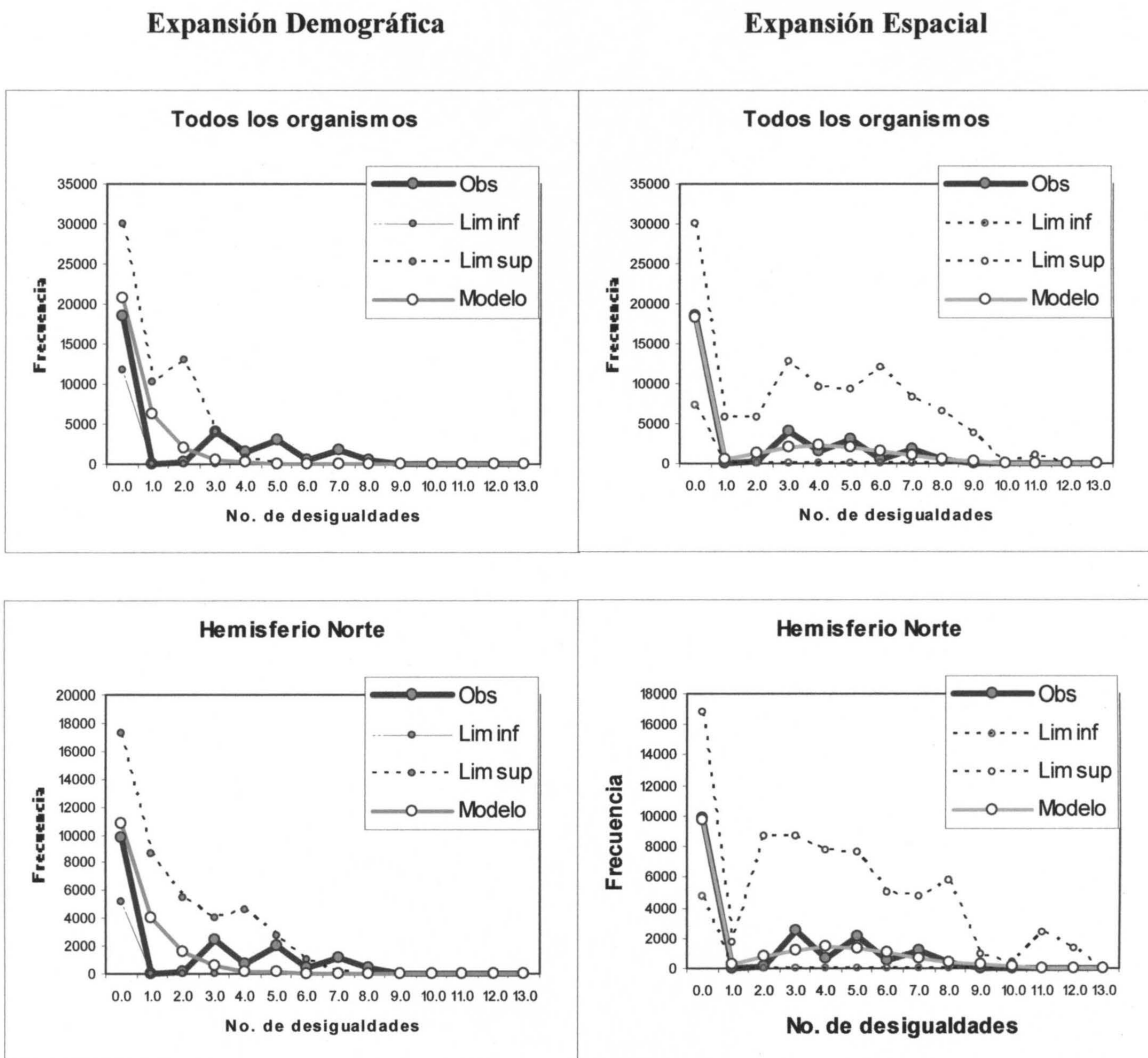
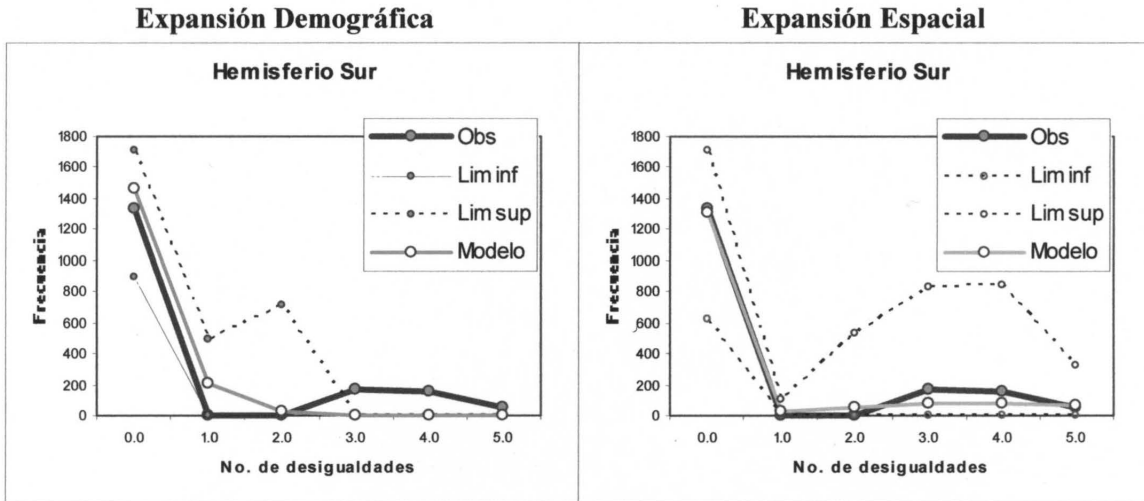


Figura 23. Continuación.



El árbol de todos los haplotipos detectados con mtDNA muestra un patrón tipo estrella en el que ningún haplotipo aparece como el ancestral con una confianza aceptable de bootstrapping

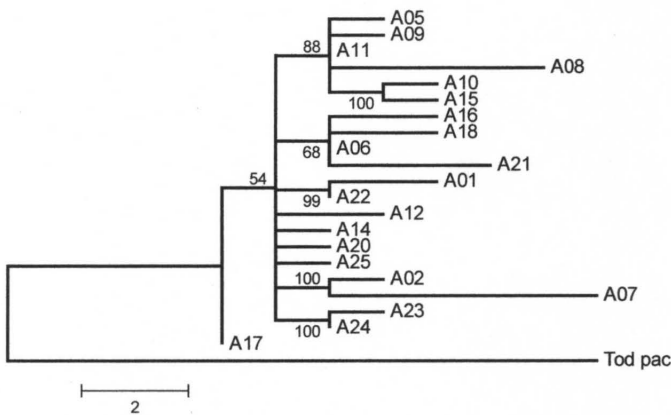


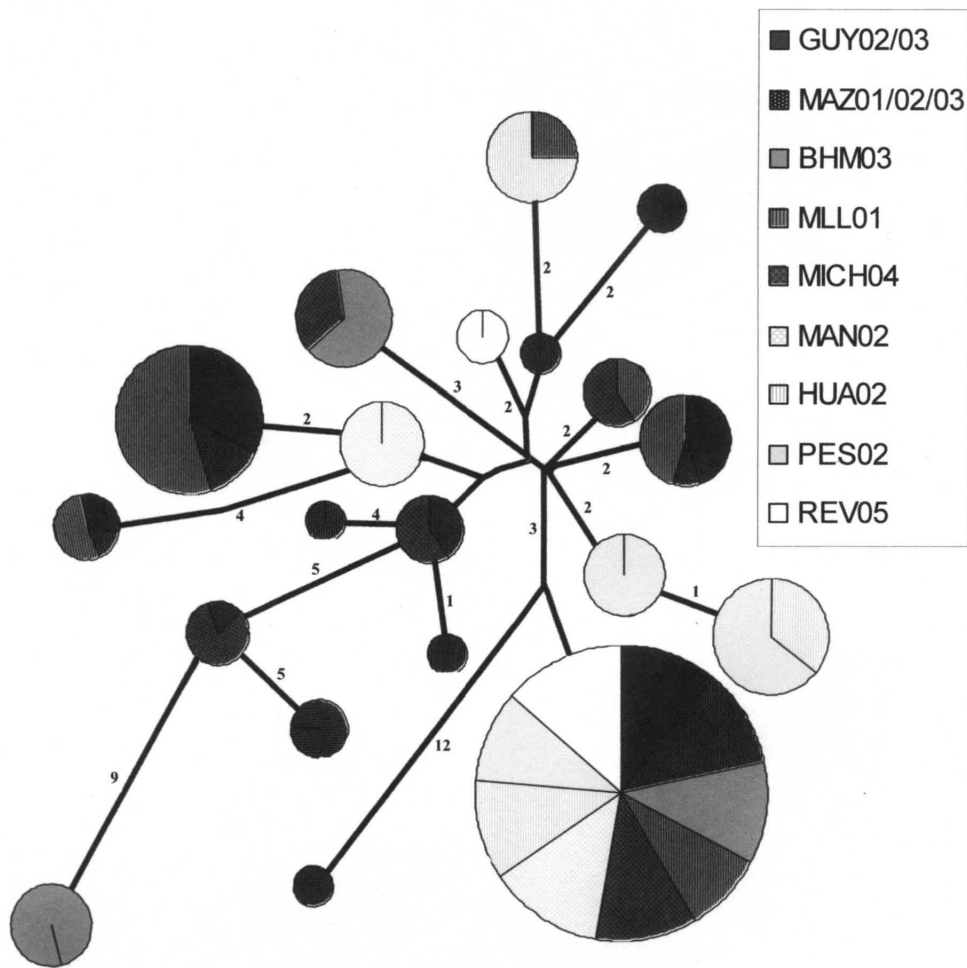
Figura 24. Árbol filogenético de los haplotipos detectados en el fragmento de citocromo b analizado. El árbol fue obtenido mediante el métodos bayesiano. Los valores de los nodos son valores de probabilidad posterior.

cercanía del alelo A17 con la base del árbol.

(figura 24). El alelo más probable a ser el ancestral sería el haplotipo A17. El haplotipo más común (A02) aparece en una rama reciente (figura 24). Los análisis partidos por 1ª, 2ª y 3ª posiciones de los codones dan información poco consistente entre si. Sólo el análisis de 3ª posición, el

más variable, presenta un árbol con prácticamente la misma topología del árbol total mostrando una mayor

La figura 28 muestra el árbol de conexiones mínimas en sustitución de la red de conexiones mínimas, ya que dicha red resulta demasiado compleja para mostrarse gráficamente debido a la cantidad excesiva de conexiones alternativas que presenta.



**Figura 25. Árbol de conexiones mínimas. El tamaño de los círculos representa la frecuencia del haplotipo y el color de las porciones corresponde a la localidad (clave arriba a la derecha); en general las poblaciones del Hemisferio Norte se indican en tonos oscuros y las del Hemisferio Sur en tonos claros.**

El árbol construido considerando a cada individuo como una unidad taxonómica operacional (OTU) mediante mtDNA se muestra en la figura 26. En éste no se observa una correlación entre linajes y localidades analizadas pues el haplotipo más común (A02) esta distribuido a frecuencias similares entre todas las poblaciones (ver figura 19). También se encuentran algunas ramas pequeñas que son exclusivas o casi exclusivas de alguna región o población. La forma del árbol corresponde a la categoría filogeográfica que Avise (2000) denomina V, árbol génico llano con distribución de linajes variado, que representa el árbol de una especie con flujo génico pequeño a moderado entre poblaciones históricamente relacionadas de manera estrecha. En esta categoría usualmente el alelo más común es el ancestral (plesiomórfico) mientras que los alelos exclusivos de alguna población son derivados (apomórficos).

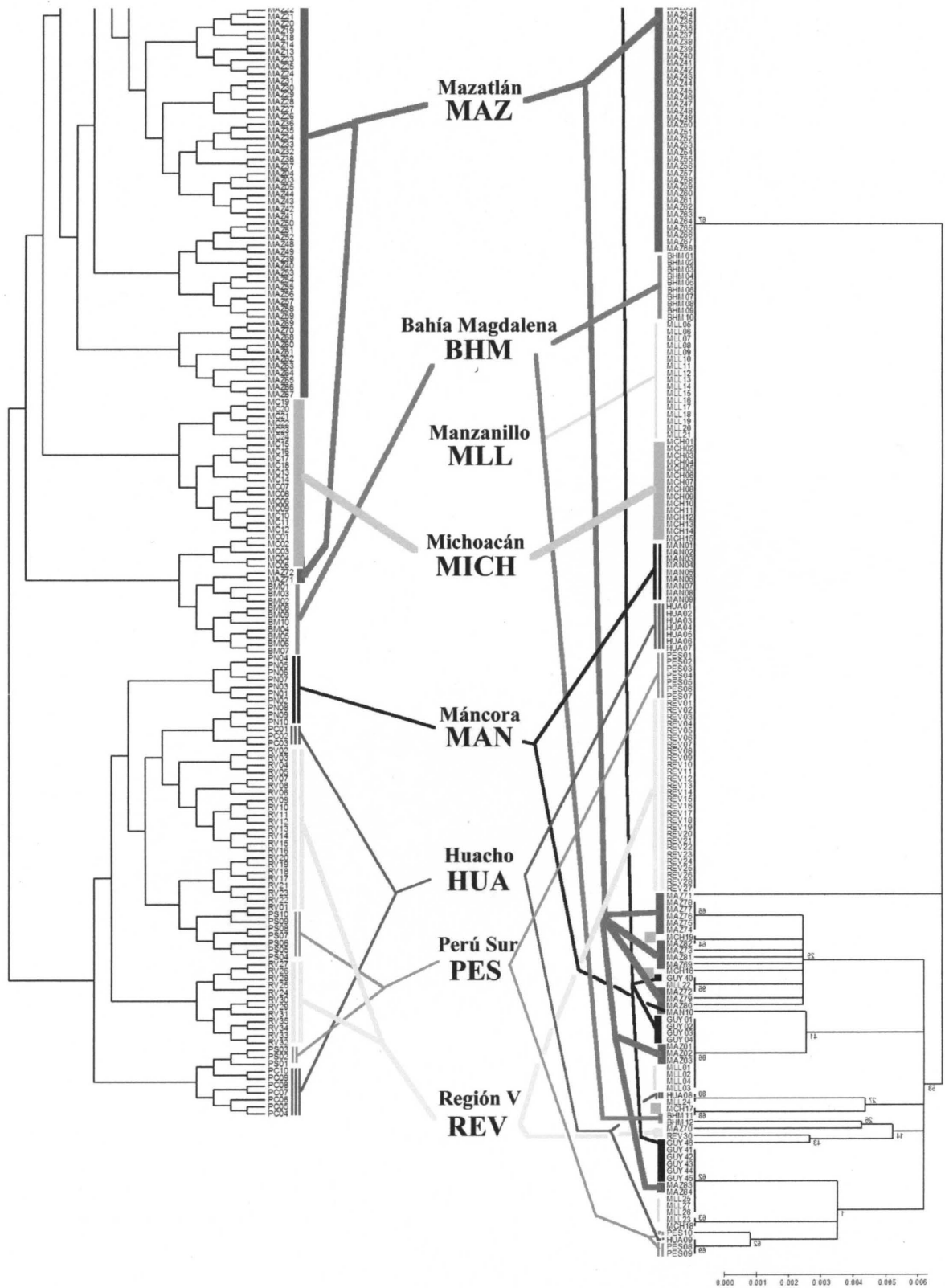
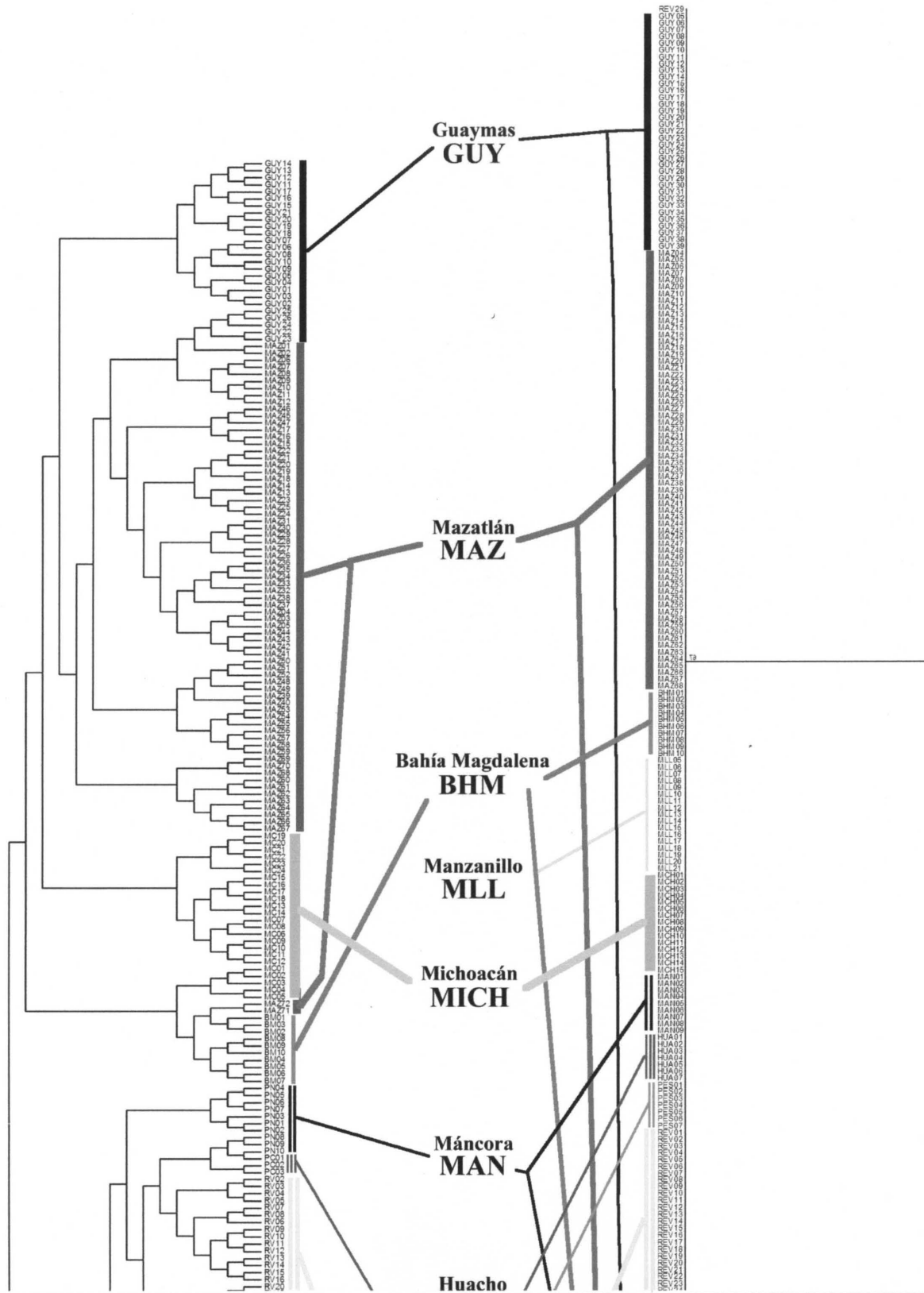


Figura 26. Fenograma de todos los genotipos analizados con RAPDs (izquierda) y secuencias de mtDNA (derecha) considerando a cada individuo como una OTU. Las líneas verticales muestran el conjunto de muestras de una localidad en una determinada rama, conectadas con el nombre de la localidad (al centro).





## **6. DISCUSIÓN**

## 6.1 VARIACIÓN GENÉTICA Y MOLECULAR

La diversidad genética estimada con RAPDs generalmente es menor a la mitocondrial debido a que los RAPDs son marcadores considerados como nucleares (Dowling et al., 1996), que se considera que evolucionan hasta un orden de magnitud más lentamente que el DNA mitocondrial, aunque de una región a otra las tasas pueden variar hasta dos ordenes de magnitud, debido a su modo de herencia, su tamaño efectivo poblacional y la exposición incrementada a condiciones bioquímicas potencialmente dañinas para la molécula (Ballard y Whitlock, 2004). Otra razón de tipo teórico es la restricción que impone en los análisis el hecho de que los RAPDs requieren ser analizados como marcadores dominantes de manera que el número de alelos en una muestra tiene un máximo de dos, lo que a su vez acota la estimación de la heterocigosis esperada a un máximo de 0.5. En cambio, las secuencias de mtDNA pueden presentar un número de haplotipos (alelos) distintos solamente limitado por el tamaño de la muestra.

Por otro lado, el mtDNA es una sola molécula sin recombinación, por lo que estrictamente debe ser considerado como un solo locus mientras que los RAPDs, que teóricamente obtienen una muestra aleatoria de cualquier parte del genoma nuclear, ofrecen información de una gran cantidad de loci. No obstante la incertidumbre acerca de las regiones muestreadas por los RAPDs no permite profundizar más sobre las particularidades de la variación detectada. El mtDNA presenta aproximadamente una cuarta parte del  $N_e$  en una población diploide con igual número de hembras y machos lo que teóricamente reduciría un poco la variabilidad y aumentaría las diferencias entre grupos genéticamente diferenciados al permitir que las variantes se fijen más rápidamente por deriva génica. No obstante el menor  $N_e$  del mtDNA no alcanza a contrarrestar los efectos de su elevada tasa de mutación de manera que sólo la presencia de selección natural que “castiga” mutaciones deletéreas en genes importantes para las células establece diferencias significativas en la cantidad de variación a lo largo del genoma mitocondrial (Ballard y Whitlock, 2004). Aunque la región del citocromo b suele ser considerada “conservada”, es decir de evolución lenta (Dowling et al., 1996), los ensayos de este estudio así como los reportes previos indicaron niveles de variación suficientes para estudios a nivel intraespecífico (Merritt et al., 1998).

La variación genética resultó moderada en ambos casos. La diversidad genética encontrada con RAPDs resultó muy similar a la reportada por Enríquez-Paredes (1999) para la misma especie en el Golfo de California (tabla 15). No existen referencias de otros calamares

oceánicos más que del calamar antártico *Moroteuthis ingens*. Los estudios realizados en otros calamares omastreífidós han detectado variabilidad muy baja con isoenzimas en las especies de *Illex argentinus* y *Martialia hyadesi* (Brierley et al., 1993) pero altas con microsatélites en *Illex argentinus*, *Illex coindetii* y *Todaropsis eblanae* (Carvalho et al., 1992; Adcock et al., 1999; Dillane et al., 2000). La razón de dichas diferencias es poco clara, aunque se considera más factible que se deba a diferencias en las tasas de mutación de los diferentes marcadores: particularmente bajas para las isoenzimas empleadas (fenómeno usual en especies de aguas frías) y elevadas en microsatélites que aparentemente presentan evidencias de mutación y recombinación elevadas. Aunque tampoco se han descartado las barridas selectivas como causas probables (comunes en especies de aguas frías como lo son *Illex argentinus* y *Martialia hyadesi*) (Nevo et al., 1984), la presencia de colapsos demográficos (reducciones drásticas en la población, cuellos de botella) es una hipótesis que sí fue desechada para esas especies debido al hallazgo de heterocigosis elevadas en análisis con microsatélites y de un elevado número de alelos, indicadores más sensibles a las reducciones poblacionales (Ryman et al., 1995). Curiosamente los niveles bajos de diversidad isoenzimática parecen ser característicos de los cefalópodos. *D. gigas* no presentó un número bajo de alelos con mtDNA por lo que es razonable predecir una variación elevada en estudios futuros con marcadores como los microsatélites.

**Tabla 15. Heterocigosis esperada encontrada en diferentes calamares con distintos marcadores moleculares.**

Especie	Referencia	Marcador	$H_e$
<i>Dosidicus gigas</i>	(este estudio)	RAPDs	0.238
		mtDNA	0.377
<i>Dosidicus gigas</i>	Enríquez-Paredes (1999)	RAPDs	0.221
<i>Illex argentinus</i>	Carvalho et al. (1992)	Isoenzimas	0.011
<i>Illex argentinus</i>	Adcock et al. (1999)	VNTRs	0.784
<i>Illex coindetii</i>			0.610
<i>Illex illecebrosus</i>			0.592
<i>Martialia hyadesi</i>	Brierley et al. (1993)	Isoenzimas	0.014
<i>Moroteuthis ingens</i>	Sands et al. (2003)	RAPDs	0.312
<i>Illex coindetii</i>	Dillane et al. (2000)	Microsats	0.940
<i>Todaropsis eblanae</i>		Microsats	0.894
<i>Loligo forbesi</i>	Shaw (1997)	Microsats	0.672
<i>Loligo pealei</i>	Maxwell et al. (2000)	Microsats	0.840

Las estimaciones de variabilidad genética obtenidas con RAPDs fueron mucho más parecidas entre localidades que las obtenidas con mtDNA posiblemente debido al soporte

estadístico que le proporciona el número elevado de loci analizados (74). Las poblaciones que presentaron mayor diversidad genética y nucleotídica fueron las de Perú Sur (PES) y Mazatlán (MAZ). Manzanillo (MLL) presentó índices muy elevados con mtDNA pero no con RAPDs. La localidad de Mazatlán se encuentran geográficamente en el punto donde se alcanzan altas concentraciones poblacionales (Ehrhardt et al., 1986; Morales-Bojórquez et al., 1997) y aunque la localidad Perú Sur (PES) no está en la zona de mayor abundancia (que correspondería mas bien a las localidades de Máncora y Huacho; Mariátegui y Taipe, 1996; Arguelles y Yamashiro, 1997; Taipe et al., 2001), este estudio determinó que las localidades de Perú aparentemente pertenecen al mismo stock o población. Por lo anterior, es posible que los centros con mayor abundancia sean los que tienen la mayor variabilidad genética debido no al tamaño de la población, sino también a su ubicación geográfica que resulta punto de cruce migratorio de organismos de otras regiones.

La localidad de la Región V (REV) presentó una variabilidad muy baja en el mtDNA, aunque no se detectó lo mismo con RAPDs lo que podría indicar que la población mantiene un tamaño pequeño que afecta más al mtDNA aunque no se descarta que el simple error de muestreo sea la causa.

La localidad de Mazatlán tiene claramente mucha variación genética, al igual que algunas de sus localidades vecinas, presentando una riqueza alélica de mtDNA muy elevada (tabla 4). Debido a que su variación genética no es mucho mayor que las de las otras localidades vecinas y, considerando que en el norte las muestras no se mostraron del todo homogéneas, es posible que la población de Mazatlán reciba continuamente variación fresca de diversas localidades aledañas pues, como se puede ver en la figura 19 es la única localidad que comparte dos o más alelos con todas las localidades del Hemisferio Norte. La prueba de Chakraborty sustenta que Mazatlán es una población mixta (ver sección 6.5).

## **6.2 VARIACIÓN TEMPORAL, TAMAÑO EFECTIVO DE LA POBLACIÓN Y DERIVA GÉNICA**

Los tamaños poblacionales estimados en el Golfo de California y el Mar de Perú son muy elevados pero el tamaño efectivo poblacional de largo plazo, que es el promedio armónico de los tamaños efectivos de cada generación, puede ser mucho menor que el tamaño total (Hedrick, 2000b). Las estimaciones de tamaños poblacionales han variado hasta dos órdenes de magnitud en México y Perú en pocos años: en el Golfo de California se estimaron más de 50

millones de organismos en 1995-96 mientras que en Perú en 1992-94 fluctuó de 7 a 144 millones de individuos (Argüelles y Yamashiro, 1997; Morales-Bojorquez et al, 1997). Aún así, las estimaciones más reducidas presentan números suficientemente grandes para hacer irrelevante el efecto de la deriva génica en períodos cortos.

Las estimaciones de  $N_e$  obtenidas en este estudio mediante los estadísticos  $\theta$  (mtDNA) y  $H$  (RAPDs) resultaron muy elevadas (de cientos de miles a decenas de millones) para un intervalo de valores de  $\mu$  razonable ( $10^{-8}$  a  $10^{-9}$ ) con ambos marcadores. Adicionalmente, la detección de un número elevado de alelos con el mtDNA (que es más susceptible a las reducciones poblacionales que otros indicadores de variación molecular), contradice la presencia de colapsos poblacionales severos en la historia reciente de la especie (Ryman et al., 1995).

Esto indica que, pese a las fluctuaciones poblacionales, los colapsos sufridos por las pesquerías y las estimaciones bajas de  $N_e$ , la variabilidad genética no da lugar a que la población haya tenido un tamaño efectivo menor a cientos de miles en su pasado evolutivo reciente.

Entonces ¿cómo explicar los valores de probabilidad relativamente bajos entre frecuencias alélicas tomadas de la misma localidad de un año a otro? Explicar eso implica explicar también las bajas estimaciones de tamaño efectivo obtenidas con RAPDs y mtDNA pues los métodos que mostraron valores pequeños utilizan como fundamento que las diferencias entre las frecuencias alélicas dependen del tamaño efectivo de la población.

Los casos en los que dichas diferencias fueron menores es en las comparaciones MAZ02 vs MAZ03 y GUY02 vs GUY03 con datos de mtDNA. En este caso, como el marcador utilizado (mtDNA) emplea un solo locus, la probabilidad de obtener valores de probabilidad bajos e incluso significativos (no fue el caso) por puro azar, es alta.

Adicionalmente, la migración puede ser un factor de incertidumbre al permitir que muestras de diferentes años tomadas en la misma región no provinieran del mismo stock, sino de alguno ligeramente distinto, debido a que los desplazamientos anuales de los organismos no ocurren exactamente en las mismas fechas cada año, especialmente si se presentan anomalías térmicas en la superficie del mar. Esto también se aplica para las diferencias detectadas con RAPDs.

En la comparación hecha con RAPDs, los cambios temporales fueron no significativos con una probabilidad global de alrededor de 0.5. No obstante, las bajas estimaciones de  $N_e$  indican que los cambios fueron mayores a los esperados. Este resultado estuvo fuertemente influido por unos pocos loci que, tras ser excluidos del análisis mostraron que en general, la mayoría de los

loci tuvieron cambios temporales muy pequeños, no significativos, que generan estimaciones de  $N_e$  elevadas.

Por otro lado, también es posible que algunos de los fragmentos amplificadas estén bajo selección natural u otra fuerza evolutiva (como flujo génico o recombinación) o que estén cerca de una región sometida a dichas fuerzas y sean “arrastrados” (*hitchhiking*). También es probable que se haya presentado una combinación de fuerzas evolutivas como la migración, selección y recombinación en algunos loci pues la magnitud de los coeficientes de selección necesarios para explicar los cambios de los cinco loci mas significativos deberían ser de 0.2 a 0.6.

### 6.3 VARIACIÓN INTRAPOBLACIONAL

No se detectó evidencia alguna de variación intrapoblacional entre los grupos de talla con ninguno de los marcadores, ni empleando estimaciones de divergencia poblacional, ni con las pruebas de heterogeneidad de frecuencias alélicas (prueba exacta). Las frecuencias fueron sumamente homogéneas indicando que, al menos para grupos de tallas que coexisten en el tiempo y el espacio, no hay evidencias de aislamiento reproductivo. Eso no implica necesariamente la ausencia de aislamiento entre los grupos de talla mencionados en otros estudios ya que Enríquez-Paredes (1999) detectó diferenciación significativa mediante RAPDs entre un grupo que denominó “cohorte enana” y los grupos de mayor tamaño (“cohorte chica” y “cohorte grande”). Es de notar que los grupos del Golfo de California analizados en el presente estudio corresponderían a los grupos mediano (M) y grande (L) de acuerdo a la nomenclatura adoptada por otros autores, y que equiparados a la cohorte chica y grande de Enríquez-Paredes no presentaron diferenciación en ninguno de los estudios. En el caso de los calamares de Perú se analizaron individuos que por su tamaño podrían corresponder a los tres grupos (S, M y L). Sin embargo esto no implica que correspondan a dichos grupos pues los organismos más pequeños podrían ser juveniles de grupos mayores.

Anderson y Rodhouse (2001) sugieren que es posible que exista un desfase en los ciclos de migración-reproducción de las distintas cohortes que al ser transportadas por corrientes marinas y habitar en regímenes oceanográficos distintos origine una diferenciación genética entre grupos diferenciados por su talla, crecimiento y otros parámetros. Nigmatullin et al. (2001) van más allá y consideran que *D. gigas* es una especie en un intenso proceso de

radiación adaptativa y que estos grupos pueden representar especies en *status nascentii* o al menos stocks distintos.

Con la información obtenida aquí se considera poco probable la presencia de diferenciación entre los grupos mediano y grande, aunque es posible que exista diferenciación entre el grupo pequeño y los demás pero no tan profunda como se ha sugerido.

Debido a la ausencia de diferenciación entre todos los grupos analizados en este estudio se considera improbable que la existencia de diferenciación entre los grupos de talla haya provocado un sesgo en los resultados interpoblacionales.

#### 6.4 VARIACIÓN INTERPOBLACIONAL Y ESTRUCTURA GENÉTICA

La diferenciación genética poblacional entre hemisferios es convincente. Las estimaciones de  $\theta$  ( $F_{ST}$ ) para todas las poblaciones resultaron significativas y las frecuencias alélicas muestran heterogeneidad significativa también con ambos marcadores. La partición de las poblaciones en Hemisferio Norte y Hemisferio Sur fue sustentada por los dendrogramas y el SAMOVA/AMOVA en ambos marcadores, aunque de manera más categórica con RAPDs que con mtDNA.

Es posible que la divergencia entre los dos hemisferios sea reciente y con ello se haya propiciado un sorteo de linajes incompleto en el mtDNA, de manera que los haplotipos no han alcanzado a fijarse en las poblaciones y las diferencias son principalmente en las frecuencias. Así, el haplotipo dominante (A2 en este caso) está distribuido en todas las poblaciones mientras que otros haplotipos se encuentran exclusivamente en unas u otras localidades. El haplotipo A1, por ejemplo, es exclusivo del Hemisferio Norte mientras que el haplotipo A23 es exclusivo del Hemisferio Sur (ver figura 19). Curiosamente los haplotipos exclusivos de uno u otro hemisferio no parecen pertenecer a un linaje en particular o a una región de la red de haplotipos (figura 25). Éste patrón es más acorde con un escenario de dispersión (ver más adelante).

Si las inconsistencias entre el patrón detectado con mtDNA y el de RAPDs se deben solamente a la presencia de muestreos pequeños para las poblaciones de Perú, la unificación de dichas localidades en una sola muestra podría corregir el problema en el análisis de mtDNA toda vez que las tres muestras del Mar de Perú (MAN, HUA y PES) no presentaron ningún indicio de divergencia poblacional entre sí (con ambos marcadores). Esto efectivamente reagrupó a todas las muestras del Hemisferio Sur en un solo clado y a las del Hemisferio Norte en otro, aunque con poco sustento de bootstrapping. No obstante, es importante recalcar que los

dendrogramas solamente muestran patrones de similitud y de ninguna manera deben ser interpretados como las relaciones evolutivas entre las poblaciones.

De acuerdo a O'Dor (1988), no existen limitaciones fisiológicas ni energéticas para que un calamar como *D. gigas*, cuyo tamaño y fisiología lo convierten en un nadador potente, realice migraciones sobre toda su área de distribución (de más de 8,000 kilómetros). Por esto, las restricciones más importantes al flujo génico en *D. gigas* podrían no estar relacionadas con la distancia.

Considerando lo anterior y considerando que el mtDNA no presentó indicios de correlación debida a aislamiento por distancia, la hipótesis de una barrera entre hemisferios se fortalece pues la aparente correlación entre distancias geográficas y genéticas en el análisis de RAPDs no es tal al interior de los grupos (Hemisferio Norte y Hemisferio Sur) y se produjo aparentemente por la gran distancia que separa estos dos grupos cuyas comparaciones internas presentaban distancias menores y diferenciación pequeña mientras que las comparaciones entre localidades de diferentes grupos mostraban distancias grandes y diferenciación mayor.

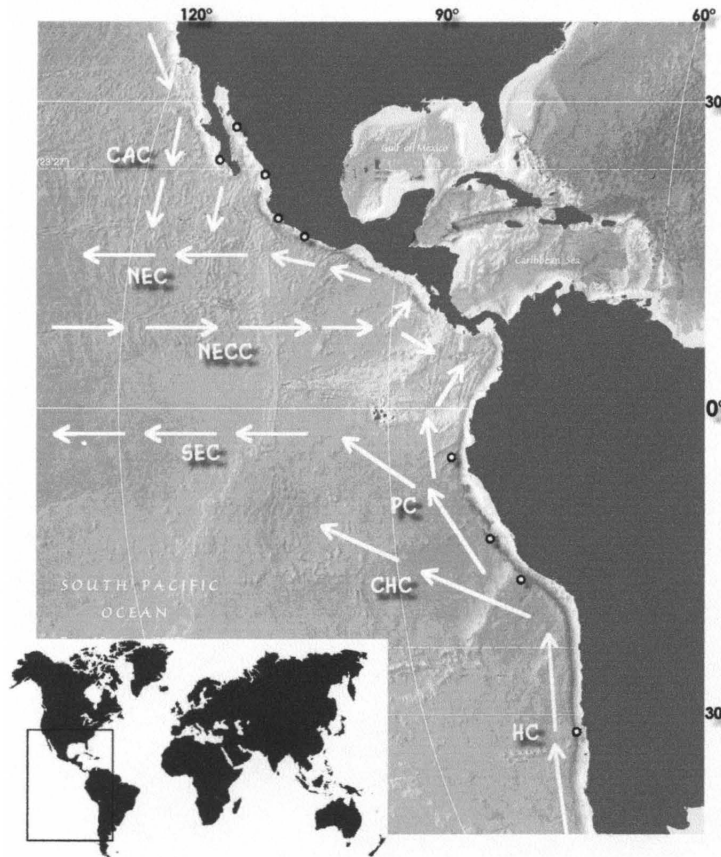
La obtención de índices de correlación también sustenta lo anterior y en el mismo análisis de RAPDs, muestra gráficamente la ausencia de gradiente y la presencia de correlación mayor en comparaciones por debajo de los 3 mil kilómetros (entre poblaciones del mismo hemisferio) y correlación menor en comparaciones de más de 3 mil kilómetros (entre poblaciones de diferente hemisferio).

En ausencia de un aislamiento por distancia la diferenciación solo puede ser explicada por barreras geográficas, oceanográficas, biológicas y conductuales.

Entre las causas de la divergencia de tipo oceanográfico están los factores derivados de los diferentes regímenes oceanográficos como la temperatura que tiene un fuerte impacto en los calamares (Brito-Castillo et al., 2000; Waluda et al., 2004), así como la fuente de alimentos. Otros factores oceanográficos muy importantes son las corrientes marinas cuyo efecto sobre la distribución de la variación genética está comprobado ampliamente. De hecho los patrones detectados en este estudio se ajustan muy bien a la hipótesis de que el flujo génico sigue la dirección de las corrientes marinas más importantes, tanto en el norte como en el sur (ver figura 27). En el norte la Corriente Norecuatorial corre paralela a la costa de México en dirección norte, hacia el Golfo de California y se aparta internándose en el Pacífico. No obstante, una parte de la fuerza que empuja esta corriente termina en el interior del Golfo de California. Considerando que los ricos sistemas de surgencias del interior del Golfo de California mantienen una rica provisión de alimento para *D. gigas* y toda la cadena trófica local, sería muy



lógico esperar que los organismos provenientes de localidades cercanas a la línea Costera del sur de México tuvieran un flujo génico mayor con las localidades del interior del Golfo que las poblaciones del Pacífico Norte mexicano, apartadas del Golfo de California por la Corriente de California.



**Figura 27. Corrientes marinas del Pacífico Oriental : Corriente de California (CUC), Corriente Norecuatorial (NEC), Contracorriente Norecuatorial (NECC), Corriente Surecuatorial (SEC), Corriente de Chile (CHC), Corriente de Perú (PC) y Corriente de Humboldt (HC).**

Adicionalmente, el análisis de alelos compartidos muestra la presencia de varios haplotipos comunes a las poblaciones de la costa del sur de México y el Golfo de California pero que no comparten con la población del norte del Pacífico (Bahía Magdalena), como el haplotipo A01, el A08 y el A17. A su vez esta localidad (BHM) despliega altas frecuencias de los haplotipos A12 y A21 que no comparte con el resto (ver figura 19).

En el Hemisferio Sur, la ausencia de península tiene un efecto importante en la estructura genética: no se encontró evidencia de diferenciación genética entre las poblaciones del Mar de Perú. Los sistemas de corrientes dominantes, como la Corriente de Perú y la Corriente

Efectivamente las localidades de la línea costera sur de México, Manzanillo (MLL) y Michoacán (MICH) presentan una relación mucho más cercana con la población de Mazatlán (MAZ) y Guaymas (GUY) que la localidad del norte del Pacífico Mexicano, Bahía Magdalena (BHM), aun cuando ésta se encuentra geográficamente más próxima a estas localidades. Esto se puede ver en las estimaciones de distancias genéticas, de migración,  $F_{ST}$  pareadas y en los dendrogramas construidos con datos de RAPDs y de mtDNA.

Surecuatorial tienen un efecto homogeneizador aun cuando su potencia puede transportar huevecillos, larvas y adultos cientos de kilómetros en distintas direcciones: hacia el Pacífico o sobre la línea costera hacia el norte empujadas por la Corriente de Humboldt. Aparentemente, esto no sucede, o si sucede, es probablemente contrarrestado por la contracorriente de Perú que podría transportar de regreso a los adultos a la línea costera peruana. En el caso de la muestra de la localidad de la Región V (REV) la información de RAPDs y mtDNA es contrastante: mientras que con RAPDs la Región V aparece cercana a las muestras del Mar de Perú (MAN, HUA y PES), en el mtDNA aparece muy apartada. Sin embargo, la cercanía con las poblaciones peruanas detectadas con RAPDs no es absoluta pues se detectó heterogeneidad significativa con la muestra de Perú Sur (PES). Es posible que exista cierta diferenciación moderada o pequeña pero que mantiene un cierto flujo génico entre las poblaciones que habitan aguas chilenas y las de aguas peruanas, promovido por la poderosa Corriente de Perú.

Los factores biológicos que pueden determinar o influir en los patrones de flujo génico son el ciclo de vida y las preferencias alimenticias y reproductivas de la especie. En este caso, las migraciones de *D. gigas* también están fuertemente influidas por el alimento. Las grandes agregaciones de organismos como la sardina (*Sardinops sagax*) sustentadas por los sistemas de surgencias atraen a los calamares hacia el interior del Golfo de California propiciando el flujo génico. Por otra parte el desove que sucede en los límites de la plataforma continental se lleva a cabo en algunos puntos selectos del litoral en México. La presencia de zonas de desove en la costa occidental de la Península de Baja California establece una barrera reproductiva con respecto al Golfo de California pues independientemente de la dirección de las corrientes marinas, los organismos del norte del Pacífico Mexicano difícilmente van a adentrarse al Golfo de California si tienen sus “propias” zonas de desove y alimentación como las zonas de surgencias en la costa de Baja California. Aunque en el sur del Pacífico Mexicano también existen zonas de desove, éstas se encuentran al sur de las localidades de Michoacán (MICH) y Manzanillo (MLL) (Markaida y Sosa-Nishizaki, 2001) y alcanzarlas implicaría nadar oponiéndose al flujo de la Corriente Norecuatorial. En cambio seguir la dirección de la corriente puede llevar a los organismos a las ricas zonas de desove del Golfo de California.

## 6.5 INFORMACIÓN HISTÓRICA DE LAS POBLACIONES

Sobre la disyuntiva entre si la diferenciación genética detectada se debe a una divergencia antigua o a la ausencia de flujo génico, es posible que la divergencia sea reciente con muy poco

flujo génico (unos pocos organismos por generación). Las reconstrucciones genealógicas con RAPDs muestra una separación completa de individuos del Hemisferio Norte y del Hemisferio Sur aunque las localidades al interior de estos grupos si presentan indicios de flujo génico e incluso de homogeneidad entre poblaciones. Es interesante notar que en el fenograma de RAPDs no hay un solo individuo del Hemisferio Sur en el Hemisferio Norte ni viceversa denotando poco o ningún flujo génico evidente. El análisis genealógico con mtDNA es menos tajante. No muestra una separación de linajes para cada hemisferio, pues en ambos hemisferios (e incluso en todas las localidades) el haplotipo más común es el mismo indicando que la divergencia no ha sido lo suficientemente antigua como para fijar las diferencias. No obstante, se han encontrado haplotipos exclusivos de un hemisferio e incluso de algunas localidades. Este tipo de genealogía coincide muy bien con la categoría filogeográfica de árboles que Avise (2000) llamó árboles llanos con distribución de linajes variado, y que coincide con la hipótesis de que la divergencia entre hemisferios es reciente y con un flujo génico pequeño. Aunque esta categoría de árboles usualmente tienen como alelo más común al alelo ancestral esto no es un requisito esencial (Avise, 2000). Además, la reconstrucción filogenética de los haplotipos (figura 24) presentó un patrón radial y pocas diferencias entre haplotipos de manera que casi todos los haplotipos tienen probabilidades similares de ser el ancestral.

El árbol de mínima longitud (figura 25) al no presentar regiones enteras pertenecientes a un hemisferio también sustenta la afirmación de que el patrón de los árboles es más acorde con un escenario de dispersión que de vicarianza (Avise, 2000). Sustentando esta hipótesis, la distribución de desigualdades se ajusta bastante bien a un escenario de expansión espacial pero no a uno de pura expansión demográfica (figura 23).

El fragmento de citocromo b analizado no se separó significativamente de la neutralidad con la prueba de Ewens-Watterson.

La prueba de Chakraborty mostró resultados igualmente no significativos para la mayoría de las muestras excepto para dos, Michoacán y Mazatlán (MICH y MAZ), mismas que comparten alelos con muchas localidades del Hemisferio Norte lo que indica una posible mezcla de poblaciones (Chakraborty, 1991). La muestra de Michoacán se encuentra en medio del paso de la Corriente Norecuatorial, recibiendo posiblemente variación del sur. Si eso es cierto cabría esperar que la localidad de Manzanillo (MLL) mostrara valores similares. Esto no sucedió aunque la probabilidad obtenida fue más bien baja y no significativa (0.1682). En Mazatlán la separación de la neutralidad es muy significativa y posiblemente recibe flujo génico de casi todas las localidades ubicadas en el Hemisferio Norte posiblemente debido a las

migraciones anuales al interior del Golfo. De hecho, las estimaciones de migración ( $M$ ) son elevadas (de 7 a 32 organismos por generación) con las localidades del Hemisferio Norte.

La separación de la neutralidad detectada por la prueba de Tajima en casi todas las poblaciones puede deberse en parte a expansiones poblacionales, estructura genética, cuellos de botella, eventos selectivos y tasas de mutación diferenciales (Tajima, 1989a y b), aunque los análisis de este estudio presentan evidencias de una expansión espacial y divergencia poblacional reciente.

La prueba de  $F_u$  presenta valores positivos para todas las localidades excepto Mazatlán que muestra un valor negativo y significativo del estadístico  $F_s$ , lo que es evidencia de una expansión poblacional (Fu, 1997).

Aunque no es posible afirmarlo con certeza, las fluctuaciones poblacionales históricas, particularmente la expansión poblacional, y la hibridación de las poblaciones de Mazatlán y Michoacán parecen ser suficientes para explicar las desviaciones de la neutralidad encontradas en este estudio.

La historia evolutiva de *D. gigas* aparentemente es compleja pues su demografía, aún en el presente y bajo condiciones relativamente estables, parece sufrir vaivenes desproporcionadamente altos. La expansión demográfica y espacial de *D. gigas* debió estar caracterizada por grandes fluctuaciones poblacionales. Esto podría haber sucedido a partir de la última glaciación o quizás de algún evento previo. La manera en que esto sucedió debió de afectar a la variabilidad genética de forma compleja. Por ejemplo sometiendo a la población a períodos de expansión espacial seguidos de reducciones poblacionales como las observadas en el presente, pero durante largos períodos de tiempo, lo que ocasionaría una dispersión en ondas o con períodos de recolonización frecuentes, todo ello acompañado de migraciones anuales que dependen de las condiciones ambientales y que los hacen, incluso hoy en día, difíciles de predecir. Los eventos geológicos y climáticos globales pudieron tener una repercusión profunda en la historia de las poblaciones de *D. gigas*.

Así, con la evidencia analizada, se puede afirmar que *D. gigas* pudo haber evolucionado a partir de algún ancestro que ocupaba una área de distribución menor a la que ocupa ahora e invadiendo nichos ecológicos vacantes al ser un oportunista ecológico como casi todos los calamares oceánicos. De esta manera extendió su distribución a todas aquellas áreas suficientemente productivas para mantener su crecimiento y gran tamaño, características indispensables para competir con calamares como *S. ovalaniensis* y posiblemente con otros tipos de organismos. En toda esta área de distribución, las poblaciones se empezaron a

diferenciar debido a una barrera entre hemisferios, a factores oceanográficos, conductuales y posiblemente a diferenciación simpátrica entre grupos de talla. Aunque no hay evidencias de diferenciación significativamente vigorosa como para dar origen a especies o subespecies crípticas, *D. gigas* podría estar en un proceso de radiación adaptativa (Nigmatullin et al., 2001), que podría estar en sus niveles más altos, llevando a la población a invadir todos los nichos ecológicos presentes y aumentando la diferenciación entre hemisferios pero también entre poblaciones del mismo hemisferio e incluso entre “componentes” de la misma población (grupos de talla).

## 6.6 PERSPECTIVAS

Las preguntas que surgen de este estudio y que pueden ser abordadas inmediatamente mediante estudios más amplios o con otros marcadores genéticos incluyen la estimación de diversidad genética con microsatélites a fin de comparar con la diversidad genética reportada con otros calamares omastréfidos. También está la determinación de la divergencia genética entre el grupo de talla grande-mediano (que parecen constituir uno solo) y el grupo pequeño, la refinación de los patrones de divergencia poblacional precisa entre localidades del mismo hemisferio y la determinación de relaciones filogeográficas mediante el uso de otros marcadores de DNA y de microsatélites, así como el análisis de muestras provenientes de regiones clave por su ubicación geográfica como la región del Domo de Costa Rica o las zonas Ecuatoriales más alejadas de la Costa, aún cuando dichas zonas presenten poca abundancia y los muestreos sean difíciles.

También es importante emplear nuevas herramientas analíticas, particularmente aquellas basadas en aproximaciones genealógico-coalescentes pues permiten determinar con mucha eficiencia procesos históricos y se acoplan fácilmente a simulaciones que permiten acercarse a la resolución de problemas cuya solución analítica se ha mostrado elusiva.

## **7. CONCLUSIONES**

### **Diversidad genética y molecular**

- La diversidad genética y molecular de *D. gigas* es moderada y homogénea en las poblaciones analizadas.
- Dicha diversidad coincide con la encontrada en otros estudios.
- Las localidades en donde *D. gigas* es más abundante presentaron niveles de diversidad genética y nucleotídica mayores.
- La muestra de Mazatlán presenta un elevado y significativo exceso de haplotipos.

### **Variación temporal, $N_e$ y deriva génica**

- No existen evidencias de cambios temporales significativos en las frecuencias alélicas de las muestras obtenidas en diferentes años.
- Las estimaciones de tamaño efectivo poblacional están fuertemente influidas por unos pocos loci significativos posiblemente sujetos a fuerzas evolutivas como la selección y el flujo génico.
- La presencia de estimaciones bajas de  $N_e$  y valores moderados de probabilidad en las comparaciones temporales aparentemente no se debe a un tamaño poblacional pequeño o a contracciones demográficas recientes.
- Las estimaciones de  $N_e$  hechas mediante estimadores de diversidad molecular generan valores de millones con ambos marcadores (RAPDs y mtDNA).

### **Divergencia intrapoblacional**

- No se encontró ninguna evidencia de diferenciación genética entre grupos de tallas en localidades de Perú y del Golfo de California.
- No se descarta la posible presencia de diferenciación del grupo pequeño pero si entre los grupos mayores (mediano y grande).

### **Divergencia interpoblacional y estructura genética**

- Los dendrogramas del análisis de RAPDs sustentan fuertemente la estructura genética que separa a las del Hemisferio Norte de las del Hemisferio Sur, mientras que los de mtDNA de una manera muy débil.
- El SAMOVA/AMOVA presenta máxima diferenciación entre grupos para dicha estructura.

- No existen diferencias fijadas de mtDNA entre hemisferios y las diferencias se encuentran principalmente en las frecuencias y en la presencia de alelos exclusivos a bajas frecuencias.
- La presencia aparente de aislamiento por distancia puede no ser real y deberse a una barrera geográfica al flujo génico que divide al Hemisferio Norte del Hemisferio Sur.
- Existen también indicios de divergencia al interior de los grupos del Hemisferio Sur y del Hemisferio Norte.
- Los patrones de diferenciación adentro de los grupos (Hemisferio Norte y Hemisferio Sur) son acordes con una diferenciación debida a los patrones de corrientes marinas.
- Algunos factores biológicos como el ciclo de vida y las preferencias alimenticias y reproductivas de *D. gigas* pueden influir también en la estructura genética.

### **Información histórica de las poblaciones**

- Es posible que la divergencia poblacional se deba a una diferenciación reciente más que al flujo génico.
- La distribución de haplotipos, sus relaciones filogenéticas y las estimaciones de  $\theta$  son acordes con un escenario de diferenciación entre hemisferios debida a la dispersión más que a la vicarianza.
- La distribución de desigualdades sustenta mejor una expansión espacial que demográfica en ambos hemisferios.
- La población de Mazatlán presenta evidencias de ser una población mixta, y una tendencia similar muestra la población de Michoacán.
- Las desviaciones de la neutralidad detectadas en el fragmento de citocromo b analizado podrían deberse a fluctuaciones poblacionales y a la hibridación de poblaciones mas que a eventos selectivos.
- *D. gigas* podría haber evolucionado bajo un escenario complejo que incluye una expansión geográfica acompañada de invasiones “oportunistas” de nichos ecológicos vacantes.



## Referencias

- Adcock GJ, Shaw PW, Rodhouse PG, Carvalho GR** (1999) Microsatellite analysis of genetic diversity in the squid *Illex argentinus* during a period of intensive fishing. *Mar Ecol Prog Ser* 187: 171-178.
- Allendorf FW, Rymann N, Utter FM** (1987) Genetics and fishery management. Past, present and future. *En: Ryman, N., Utter, F. M. (eds.) Population genetics and fishery management.* University of Washington Press, Seattle, 18 p.
- Amaratunga T** (1983) The role of cephalopods in the marine ecosystem. Pág. 379-415 *En: J. F. Caddy, ed. Advances in assessment of world cephalopod resources. FAO Fish Tech Pap* 231: 77 p.
- Anderson EC, Williamson EG, Thompson EA** (2000) Monte Carlo Evaluation of the Likelihood for  $N_e$  From Temporally Spaced Samples. *Genetics* 156: 2109-2118.
- Anderson CIH, Rodhouse PG** (2001) Life cycles, oceanography and variability: ommastrephid squid in variable environments. *Fish Res* 54, 133-143.
- Anderson EC** (2005) An Efficient Monte Carlo Method for Estimating  $N_e$  From Temporally Spaced Samples Using a Coalescent-Based Likelihood. *Genetics* 170: 955-967.
- Argüelles J** (1996) Crecimiento y reclutamiento del calamar gigante *Dosidicus gigas* en el Perú (1991 a 1994). *Inf Prog Inst Mar Perú* 23: 3-14.
- Arguelles J, Yamashiro C** (1997) Estimacion de la población del calamar gigante *Dosidicus gigas* en el litoral peruano mediante el análisis de cohortes. *Informe Progresivo Inst Mar Peru* 72: 3-24.
- Argüelles J, Rodhouse PG, Villegas P, Castillo G** (2001) Age, growth and population structure of the jumbo flying squid *Dosidicus gigas* in Peruvian waters. *Fish Res* 54: 51-61.
- Avise JC** (2000) Phylogeography: The history and formation of species. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts, USA, London, England.
- Ayala FJ, Kiger JAJr** (1989) Genética Moderna. Fondo Educativo Interamericano. México, Bogota, Caracas, Santiago, San Juan, Panamá. 836 p.
- Ballard JO, Whitlock MC** (2004) The incomplete natural history of the mitochondria. *Mol Ecol* 13: 729-744.
- Berthier P, Beaumont MA, Cornuet J-M, Liukart G** (2002) Likelihood Based Estimation of the Effective Population Size Using Temporal Changes in Allele Frequencies: A Genealogical Approach. *Genetics* 160: 741-751.
- Bertorelle G, Barbujani G** (1995) Analysis of DNA Diversity by Spatial Autocorrelation. *Genetics* 140: 811-819.

**Brierley AS, Rodhouse PG, Thorpe JP, Clarke MR** (1993) Genetic evidence of population heterogeneity and cryptic speciation in the ommastrephid squid *Martialia hyadesi* from the patagonian shelf and Antarctic Polar frontal zone. *Mar Biol* 116: 593-602.

**Brito-Castillo L, Alcántara-Razo E, Morales-Azpeitia RC, Salinas-Zavala A** (2000) Temperaturas del Golfo de California durante mayo y junio de 1996 y su relación con las capturas de calamar gigante (*Dosidicus gigas* D'Orbigny, 1835). *Ciencias Marinas* 26: 413-440.

**Caddy JF** (1983) The cephalopods: factors relevant to their population dynamics and the assessment and management of stocks. Pág. 416-452 *En*: J. F. Caddy, ed. Advances in assessment of world cephalopod resources. *FAO Fish Tech Pap* 231: 77 p.

**Carvalho GR, Thompson A, Stoner AL** (1992) Genetic diversity and population differentiation of the shortfin squid *Illex argentinus* in the southwest Atlantic. *J Exp Mar Biol Ecol* 158:105-121.

**Carvalho GR, Hauser L** (1994) Molecular genetics and the stock concept in fisheries. *Rev Fish Biol Fish* 4: 326-350.

**Cesarone C, Bolognesi C, Santi L** (1979) Improved microfluorometric DNA determination in biological material using 33258 Hoechst. *Anal Biochem* 100: 188-197.

**Chakraborty R** (1990) Mitochondrial DNA polymorphism reveals hidden heterogeneity within some Asian populations. *Am J Hum Genet* 47: 87-94.

**Chakraborty R, Weiss KM** (1991) Genetic variation of the mitochondrial DNA genome in American Indians is at mutation-drift equilibrium. *Am J Hum Genet* 86: 497-506.

**Clarke MR, Fitch JE** (1979) Statoliths of Cenozoic teuthoid cephalopods from North America. *Palaeontology* 22: 479-511.

**De la Rosa M, Trinidad-Silva J, García-Tirado VM, García-Peña S** (1996) Calamar: una pesquería en desarrollo. 265-309. *En*: Pesquerías Relevantes de México. Vol. I. Instituto Nacional de la Pesca. SEMARNAP. 555 p.

**De Ligny W** (1969) Serological and biochemical studies in fish populations. *Oceanog Mar Biol Ann Rev* 7: 411-513.

**Dillane E, Galvin P, Coughlan J, Rodhouse PGK, Cross TF** (2000) Polymorphic variable number of tandem repeat (VNTR) loci in the ommastrephid squid, *Illex coindetii* and *Todaropsis eblanae*. *Mol Ecol* 9: 933-1011.

**Dong Z** (1981) The present status and the prospects of cephalopod resources in the West Pacific. *J Fish China* 5: 263-70.

**Dowling TE, Moritz C, Palmer JD, Rieseberg LH** (1996) Chapter 8: Nucleic Acids III: Analysis of Fragments and Restriction Sites. 249-320 p. *En*: Hillis, M. D., Moritz, C. y K. B. Mable (eds.). *Molecular Systematics*. 2ª ed. Sinaur Associates Inc., Sunderland. U.S.A. 655 p.

**Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L** (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Mol Ecol* 11: 2571-2581.

**Ehrhardt NM, Jaquemin PS, González-Dávila G, Ulloa-Ramírez PA, García-Badillo F, Ortiz-Cobos JG, Solís-Nava AJ** (1982a) Descripción de la pesquería de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) durante 1980 en el Golfo de California, flota y poder de pesca. *Ciencia Pesquera* 3: 41-60.

**Ehrhardt NM., Jaquemin PS, Solís-Nava A, García-Badillo F, González-Dávila G, Ortiz-Cobos JG, Ulloa-Ramírez P** (1982b). Crecimiento del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en el Golfo de California, México, durante 1980. *Ciencia Pesquera* 3: 33-39.

**Ehrhardt NM, Jaquemin PS, García-Badillo F, González-Dávila G, López BJM., Ortiz-Cobos JG, Solís-Nava** (1983) On the fishery and biology of the giant squid *Dosidicus gigas* in the Gulf of California, Mexico. Pág. 306-340 *En*: J. F. Caddy, ed. *Advances in assessment of world cephalopod resources*. *FAO Fish Tech Pap* 231.

**Ehrhardt NM, Solís-Nava A, Jaquemin PS, Ortiz-Cobos J, Ulloa-Ramírez P, González-Dávila G, García-Badillo F** (1986) Análisis de la biología y condiciones del stock del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en el Golfo de California, México, durante 1980. *Ciencia Pesquera* 5: 63-76.

**Ehrhardt NM** (1991) Potential impact of a seasonal migratory jumbo squid (*Dosidicus gigas*) stock on a Gulf of California sardine (*Sardinops sagax caerulea*) population. *Bull Mar Sci* 49: 325-332.

**Enríquez-Paredes LM** (1999) Estructura genética de las agregaciones de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en el Golfo de California, México. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Baja California, México.

**Excoffier L** (1992) *WINAMOVA: Análisis of Molecular Variance for Windows*. Versión 1.4. University of Geneva, Switzerland.

**Excoffier L, Smouse P, Quattro J** (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.

**Excoffier L** (2004) Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Mol Ecol* 13: 853-864.

**Excoffier L, Laval G, Schneider S** (2005) *Arlequin 3: An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis*. Release 3.0. University of Bern, Bern, Switzerland.

**Ewens WJ** (1972) The sampling theory of the selectively neutral alleles. *Theor Popul Biol* 3: 87-112.

- FAO** (1975) Consulta de Expertos sobre Pesca de Calamares y otros Cefalópodos. Tokio y Hokodate, Japón, 9-13 septiembre 1975. *FAO Informes de Pesca* 170: 12 p.
- FAO** (2001a) State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA); Part 1: World Review of Fisheries and Aquaculture. Internet: Página de la Organización de las Naciones unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO); categoría Pesquerías: [http://www.FAO.org/sof/sofia/index\\_en.htm](http://www.FAO.org/sof/sofia/index_en.htm).
- FAO** (2001b) FAO Yearbook of Fishery Statistics "Catches and Landings", Vol.80 Internet: <Ftp.fao.org/fi/stat/windows/fishplus/fstat.zip> (1.6 Mb).
- FAO** (2002) A fishery manager's guidebook. *FAO Fisheries Technical Papers* T424: 231 p.
- FAO** (2006) FAO Yearbook of Fishery Statistics. 98 (1).
- FSED** (2001) Fisheries Statistics and Economics Division. National Marine Fisheries Service. Consultado en: <http://www.st.nmfs.gov/st1/commercial/index.html>.
- Fu Y-X** (1997) Statistical Test of Neutrality of Mutations Against Populations Growth, Hitchhiking and Background Selection. *Genetics* 147: 915-925.
- Fu Y-X, Li W-H** (1999) Coalescing into the 21<sup>st</sup> century: an overview and prospects of coalescent theory. *Theor Pop Biol* 56:1-10.
- Galván-Magaña F, Rodríguez J, Nienhuis HJ** (1985) Cefalópodos, atún aleta amarilla y migración. *Trans CIBCASIO* 10: 461-480.
- Gelman A, Carlin JB, Stern HS, Rubin DB** (2006) Bayesian Data Analysis. Chapman & Hall/CRC, London, New York, Washington DC.
- Hall TA** (1999) BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41: 95-98.
- Hedrick PW** (2000a) Chapter 2. Measures of Genetic Variation. 47-88 p. *En: Genetics of Populations*. 2<sup>a</sup> ed. Jones and Barlett Publishers. Boston-Toronto-Londres-Singapur. 553 p.
- Hedrick PW** (2000b) Chapter 6. Genetic Drift and Effective Population Size. 225-264 p. *En: Genetics of Populations*. 2<sup>a</sup> ed. Jones and Barlett Publishers. Boston-Toronto-Londres-Singapur. 553 p.
- Hillis DM, Mable BK, Larson A, Davis SK, Zimmer EA** (1996) Chapter 9: Nucleic Acids IV: Sequencing and Cloning. 321-381 p. *En: Hillis, M. D., Moritz, C. y K. B. Mable (eds). Molecular Systematics*. 2<sup>a</sup> ed. Sinaur Associates Inc., Sunderland. U.S.A. 655 p.
- Hernández-Herrera A, Morales-Bojorquez E, Nevares-Martínez MO, Balmori-Ramírez A, Rivera-Parra GI** (1996) Distribución de tallas y aspectos de la reproducción del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en el Golfo de California, México, en 1996. *Ciencia Pesquera* 12: 85-89.

- Hernández-Herrera A, Morales-Bojórquez E, Cisneros-Mata MA, Nevárez-Martínez MO, Rivera-Parra GI** (1998) Management strategy for the giant squid (*Dosidicus gigas*) fishery in the Gulf of California, Mexico. *CalCOFI Rep* 39: 212-218.
- Hudson RR** (1990) Gene genealogies and the coalescent process. *En: Futuyama, Antonovics JD* (eds.) Oxford Surveys in Evolutionary Biology. University Press, New York, USA. 1-44 p.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F** (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- IMARPE** (2006) Investigación de Invertebrados Marinos: Calamar gigante o Pota. Instituto del Mar de Perú. <http://www.imarpe.gob.pe/imarpe/invertebrados.php>
- Kingman JFC** (1982a) The coalescent. *Stoch Process Their Appl* 13: 235-248.
- Kingman JFC** (1982b) On the Genealogy of large populations. *J Appl Probab A* 19: 27-43.
- Kumar S, Tamura K, Nei M** (2004) MEGA 3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. *Brief Bioinform* 5: 150-163.
- Lynch M, Milligan BG** (1994) Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol Ecol* 3: 91-99.
- Mantel N** (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.
- Mariátegui L, Taipe A** (1996) Distribución y abundancia relativa del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en el Perú. *Informe Progresivo Inst Mar Peru* 34: 3-27.
- Mariátegui L, Tafur R, Morón O, Ayón P** (1997) Distribución y captura del calamar gigante *Dosidicus gigas* a bordo de buques calamareros en aguas del Pacífico Centro Oriental y en aguas nacionales y adyacentes. *Inf Prog Inst Mar Perú* 63: 3-36.
- Mariátegui L, Castillo G, Ruiz C, Pais C, Díaz B, Valladares O** (1998) Pesquería artesanal del Calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en el litoral norte, octubre a diciembre 1997. *Inf Prog Inst Mar Peru* 77: 27-38.
- Markaida U, Sosa-Nishizaki O** (2001) Reproductive biology of the jumbo squid *Dosidicus gigas* in the Gulf of California, 1995-1997. *Fish Res* 54: 63-82.
- Markaida U, Quiñónez-Velázquez C, Sosa-Nishizaki O** (2004) Age, growth and maturation of jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae) from the Gulf of California, Mexico. *Fish Res* 66: 31-47.
- Masuda S, Yokawa K, Yatsu A, Kawahara S** (1998) Growth and population structure of *Dosidicus gigas* in the Southeastern Pacific Ocean. *En: Okutani T* (ed.) Contributed Papersto International Symposium of Large Pelagic Squids, 18-19 de Julio de 1996, JAMARC, Tokyo. 107-118 p.

**Maxwell MR, Buresch KM, Hanlon RT** (2000) Pattern of Inheritance of Microsatellite Loci in the Squid *Loligo pealeii* (Mollusca: Cephalopoda). *Mar Biotechnol* 2:517-521.

**Merrit TJS, Shi L, Chase MC, Rex MA, Etter RJ, Quattro JM** (1998) Universal cytochrome b primers facilitate intraspecific studies in molluscan taxa. *Mol Mar Biol Biotechnol* 7: 7-11.

**Miller MP** (1998a) *Tools for population genetic analyses (TFPGA): A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data*. Versión 1.3. Northern Arizona University, Flagstaff, Arizona, USA.

**Miller MP** (1998b) *AMOVA-PREP: A Program for the Preparation of AMOVA Input Files from Dominant-marker Raw Data*. Versión 1.01. Northern Arizona University, Flagstaff, Arizona, USA.

**Möhle M** (2000) Ancestral Processes in Population Genetics-The Coalescent. *J Theor Biol* 204: 629-638.

**Morales-Bojórquez E, Hernández-Herrera A, Nevárez-Martínez MO, Díaz de León-Corral AJ, Rivera-Parra GI, Ramos-Montiel A** (1997) Abundancia poblacional del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en las costas de Sonora, México. *Oceanides* 12: 89-95.

**Nei M** (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 3321-3323.

**Nei M** (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY, USA.

**Nei M, Kumar S** (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York, NY, USA.

**Nesis KN** (1970) The biology of the giant squid of Peru and Chile, *Dosidicus gigas*. *Oceanology*, 17 p.

**Nesis KN** (1983) *Dosidicus gigas*. En: Boyle PR (ed.) *Cephalopod Life Cycles, Vol. I Species Accounts*. Academic Press, Londres. 216-231 p.

**Nesis KN** (1987) *Cephalopods of the World. Squids, Cuttlefishes, Octopuses and Allies*. THF Publications, New Jersey, 351 p.

**Nevárez-Martínez MO, Morales-Bojórquez E** (1997) El escape proporcional y el uso del punto de referencia biológico  $F_{\%BR}$ , para la explotación del calamar gigante *Dosidicus gigas*, en el Golfo de California, México. *Oceanides* 12: 97-105.

**Nevo E, Beiles A, Ben-Shlomo R** (1984) The evolutionary significance of genetic diversity: ecological, demographic and life-history correlatos. En: Mani GS (ed.) *Evolutionary dynamics of genetic diversity*, Springer-Verlag, Berlin. 13-213 p.

**Nigmatullin ChM** (1988) Phylogeny of the squids of the family Ommastrephidae. International Workshop on Systematics and Biogeography of Cephalopods. Smithsonian Institution, Washington DC. 23 p.

**Nigmatullin ChM, Laptikhovsky V, Mokrin N, Sabirov R, Marcaida U** (1999) On life history traits of the jumbo squid *Dosidicus gigas*. En: Tresierra-Aguilar AE, Culquichicon-Malpica ZG (eds.) First International Symposium on Pacific Squids, VIII Congreso Latinoamericano sobre Ciencias del Mar, Trujillo, Perú, 17-21 de Octubre, 1999. Libro de Resúmenes Ampliados Tomo I, 291 p.

**Nigmatullin ChM, Nesis KN, Arkhipkin AI** (2001) A review of the biology of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae). *Fish Res* 54: 9-19.

**O'Dor RK** (1988) The energetic limits on squid distributions. *Malacologia* 29: 113-119.

**Olson R, Young J, Allain V, Galván-Magaña F** (2005) OFCCP Workshop on the Application of Stable Isotopes in Pelagic Ecosystems, La Paz, B.C.S., Mexico, 31 May-1 June 2005. *Globec International Newsletter* 11: 42-44.

**Osako M, Murata M** (1983) Stock assessment of cephalopod resources in the Northwestern Pacific. Pág. 55-82 En: J. F. Caddy (ed.), Advances in assessment of world cephalopod resources. *FAO Fish Tech Pap* 231: 77 p.

**Park LK, Moran P** (1994) Developments in molecular genetic techniques in fisheries. *Rev Fish Biol Fish* 4: 272-299.

**Pfeffer G** (1912) Die Cephalopoden der Plankton-Expedition. Zugleich eine monographische Übersicht der oegopsiden Cephalopoden. Erg. Plankton-Exped. Humboldt-Stiftung 2, 815 p.

**Posada D, Crandall KA** (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.

**Ramirez RM, Klett A** (1985) Composición de tallas de la captura de calamar gigante en el Golfo de California durante 1981. *Trans. CIBCASIO* 10: 124-137.

**Ray N, Currat M, Excoffier L** (2003) Intra-Deme Molecular Diversity in Spatially Expanding Populations. *Mol Biol Evol* 20: 76-86.

**Raymond M, Rousset F** (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Heredity* 86: 248-249.

**Reynolds J, Weir BS, Cockerham CC** (1983) Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics* 105: 767-779.

**Rice WR** (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223-225.

**Rogers AR, Harpending H** (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol Biol Evol* 9: 552-569.

- Roper CFE, Sweeney MJ, Naven CE** (1984) FAO species catalogue. Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of species of interest to fisheries. *FAO Fish Synop* 3(125): 277 p.
- Ryman N, Utter F, Laikre L** (1995) Protection of intraspecific biodiversity of exploited fishes. *Rev Fish Biol Fish* 5: 417-446.
- Sands ChJ, Jarman SN** (2003) Genetic differentiation in the squid *Moroteuthis ingens* inferred from RAPD analysis. *Polar Biol* 26: 166-170.
- Sato T** (1976) Resultados de la pesca exploratoria para *Dosidicus gigas* (D'Orbigny) frente a California y México. *FAO Inf Pesca* 170: 62-68.
- Shannon CE, Weaver W** (1949) The mathematical theory of communication. Univ. of Illinois Press, Urbana, USA.
- Shaw PW** (1997) Polymorphic microsatellite markers in a cephalopod: the veneid squid *Loligo forbesi*. *Mol Ecol* 6: 297-298.
- Silva EP, Russo CAM** (2000) Techniques and statistical data analysis in molecular population genetics. *Hydrobiologia* 420:119-135.
- Sick K** (1961) Haemoglobin polymorphism in fishes. *Nature* 192: 894-896.
- Slatkin M, Barton NH** (1989) A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43: 1349-1368.
- Slatkin M** (1996) A correction to the exact test based on the Ewens sampling distribution. *Genet Res* 68: 259-260.
- Smith PJ, Roberts PE, Hurst RJ** (1981) Evidence for two species of arrow squid in the New Zealand fishery. *N. Z. J. mar. Freshwat Res* 15: 247-253.
- Smith PJ** (1996) La diversidad genética de los recursos pesqueros marinos: posibles repercusiones en la pesca. *FAO Documento Técnico de Pesca* No. 344. Roma, FAO. 59 p.
- Sokal R, Rohlf FJ** (1995) Biometry. 3a edición. W.H. Freeman and Co., New York, NY, USA.
- Sunnucks P, Wilson ACC, Beheregaray LB, Zenger K, French J, Taylor AC** (2000) SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Mol Ecol* 9: 1699-1710.
- Tafur R, Villegas P, Rabí M, Yamashiro C** (2001) Dynamics of maturation, seasonality of reproduction and spawning grounds of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae) in Peruvian waters. *Fish Res* 54:33-50



- Taibe A, Yamashiro C, Mariategui L, Rojas P, Roque C** (2001) Distribution and concentrations of the jumbo flying squid (*Dosidicus gigas*) off the Peruvian coast between 1991 and 1999. *Fish Res* 54: 21-32.
- Tajima F** (1983) Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 105: 437-460.
- Tajima F** (1989a) Statistical Method For Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Tajima F** (1989b) The Effect of Change On Population Size On DNA Polymorphism. *Genetics* 123: 597-601.
- Tamura K, Nei M** (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 10: 512-526.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ** (1994) *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice*. Disponible en: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>
- Thorpe JP, Solé-Cava AM, Watts PC** (2000) Exploited marine invertebrates: genetics and fisheries. *Hydrobiologia* 420:165-184.
- Voss GL** (1974) Cephalopod resources of the world. *FAO Fish Circ* 149: 175 p.
- Waluda CM, Trathan PN, Rodhouse PG** (2004) Synchronicity in southern hemisphere squid stocks and the influence of the Southern Oscillation and Trans Polar Index. *Fish Oceanogr* 13: 255-266.
- Wang J, Whitlock MC** (2003) Estimating Effective Population Size and Migration Rates From Genetic Samples Over Space and Time. *Genetics* 163: 429-446.
- Waples RS** (1989a) Temporal variation in allele frequencies; testing the right hypothesis. *Evolution* 43: 1236-1251.
- Waples RS** (1989b) A generalized approach for estimating effective population size from temporal changes in allele frequency. *Genetics* 121: 379-391.
- Ward RD** (2000) Genetics in fisheries management. *Hydrobiologia* 420: 191-201.
- Ward RD, Grewe PM** (1994) Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. *Rev Fish Biol and Fish* 4: 300-325.
- Watterson G** (1975) On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theor Popul Biol* 7: 256-276.
- Weir BS, Cockerham CC** (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.

**Worms J** (1983) World fisheries for cephalopods: a synoptic overview. Pág. 1-20 *En*: J. F. Caddy, ed. Advances in assessment of world cephalopod resources. *FAO Fish Tech Pap* 231: 77 p.

**Wormuth JH** (1976) The biogeography and numerical taxonomy of the oegopsid squid family Ommastrephidae in the Pacific Ocean. *Bull Scripps Instn Oceanogr* 23: 1-90.

**Wormuth JH** (1998) Workshop deliberations on the Ommastrephidae: a brief history of the systematics, distribution, and biology of the genera *Martialia* Rochebrune and Mabile, 1889, *Todaropsis* Girard, 1890, *Dosidicus* Steenstrup, 1857, *Hyaloteuthis* Gray, 1849, and *Eucleoteuthis* Berry, 1916. *En*: Voss NA, Vecchione M, Toll RB, Sweeney MJ (Eds.) Systematics and Biogeography of Cephalopods, Smithsonian Contribs Zool., No. 586, Part II. 373-383 p.

**Yamashiro C, Mariátegui L, Taipe A** (1997) Cambios en la distribución y concentración del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) frente a la costa peruana durante 1991-1995. *Inf Prog Inst Mar Perú* 52: 3-40.

**Yatsu A, Tafur R, Maravi C** (1999) Embryos and rhyncoteuthion paralarvae of the jumbo flying squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda) obtained through artificial fertilization from Peruvian waters. Report of the Kaiyo Maru for Study on the Resources of Two Ommastrephid Squids, *Dosidicus gigas* and *Ommastrephes bartrami*, in the Pacific Ocean during September 11- December 24, 1997. Fish Agency Jpn, Tokyo, 171-180 p.

**Yeh FC, Yang R, Boyle T** (1999) *Population Genetic Analysis, POPGENE (32-bit): Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis*. Versión 1.32. University of Alberta, Edmonton, AB.

### Apendice # 3 Haplotipos de mtDNA

**Alineamiento de todos los haplotipos detectados en la región de citocromo b empleada en este estudio.**

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100		
A01	AGGTTTAATATGTAAGGGTTACTAAAGGATTAGCAGGAATAAAATTTTCGGGAATCCCTAAAGCATTAGGAAACAATATACTAATTTCAATTAATAAT											
A02											T	
A05											A	
A06												
A07											T	
A08											A	
A09											A	
A10						G						G
A11											A	
A12												
A14												
A15						G						A
A16												
A17												
A18											C	
A21						A						
A22												
A23												
A24												
A25												
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200		
A01	AGTAATATAACAAGAAACCAATAAATCTTTATATCTATAACTGATGAAAAGGAATCTTATCCACATCACTATTAATACCTAAAGGATTGTTTCTAC											
A02	C	G									A	
A05											A	
A06											A	
A07											A	
A08											A	
A09											A	
A10											A	
A11											A	
A12											A	
A14											A	
A15											A	
A16											A	
A17											A	
A18	A										A	
A21											A	
A22											A	
A23											A	
A24											A	
A25	A	G									A	

```

210      220      230      240      250      260      270      280      290      300
A01  CCCTCTGATGTAGGAACAATAAGTGTATACCCACTATAGCCATCAATACAAAAGGCAATAAAAAATGAAAACAAAAAACGTCCTAAGAGTCGCATTATC
A02  .....
A05  .....C.....
A06  .....
A07  .....A.....
A08  .....A.....G.....G.....
A09  .....
A10  .....
A11  .....
A12  .....A.....
A14  .....
A15  .....
A16  .....A.....
A17  .....A.....
A18  .....
A21  .....C.....
A22  .....
A23  .....T.....
A24  .....
A25  .....

```

```

310      320      330      340      350      360
A01  TACAGAAAACCCACCTCAAATTCATAAACAATTATTTACCCACATAAGGAATAGCTGAAACCAA
A02  .....T.....
A05  .....T.....
A06  C.....T.....
A07  .G.....T...T.....
A08  .....T.....
A09  .....T.....
A10  .....T.....
A11  .....T.....
A12  .....T.....
A14  .....G.T.....
A15  .....T.....
A16  C.....T.....
A17  .....T.....
A18  C.....T.....
A21  C.....T.....
A22  .....T.....
A23  .....T.....
A24  .....T.....
A25  .....T.....

```

## Apendice # 4

### Haplotipos compartidos

**Frecuencias de los haplotipos detectados en el citocromo b mitocondrial en las diferentes localidades**

Haplo	GUY 57	MAZ 105	BHM 12	MLL 32	MICH 24	MAN 10	HUA 10	PES 10	REV 36
A01	0.087	0.036	-	0.148	-	-	-	-	-
A02	0.761	0.774	0.800	0.630	0.789	0.900	0.778	0.7	0.967
A05	-	0.012	-	-	-	-	-	-	-
A06	-	0.012	-	-	-	-	-	-	-
A07	-	0.012	-	-	-	-	-	-	-
A08	0.022	0.012	-	0.037	-	-	-	-	-
A09	-	0.012	-	-	-	-	-	-	-
A10	-	0.059	-	-	-	-	-	-	-
A11	-	0.036	-	-	0.053	-	-	-	-
A12	-	-	0.100	-	0.053	-	-	-	-
A14	-	-	-	0.037	0.053	-	-	-	-
A15	-	0.012	-	-	0.053	-	-	-	-
A16	-	-	-	0.037	-	-	0.111	-	-
A17	0.109	0.024	-	0.111	-	-	-	-	-
A18	0.022	-	-	-	-	-	-	-	-
A21	-	-	0.100	-	-	-	-	-	-
A22	-	-	-	-	-	0.100	-	-	-
A23	-	-	-	-	-	-	0.111	0.200	-
A24	-	-	-	-	-	-	-	0.100	-
A25	-	-	-	-	-	-	-	-	0.033

**Apendice # 5**  
**Base de datos de RAPDs**

Los loci incluidos en el análisis de RAPDs. El nombre indica la serie de iniciadores (primers) con un guión seguido de su tamaño aproximado, por ejemplo F06-160 indica el locus definido la banda de aproximadamente 160 pb amplificada con el iniciador OPF 06. El orden en el que aparecen es el mismo en el que se encuentran en la base de datos:

F01-160, F01-190, F01-210, F01-230, F01-250, F01-270, F01-280, F01-300, F01-350, F01-380, F01-400, F01-430, F01-450, F01-480, F01-530, F01-550, F01-590, F01-610, F01-700, F01-740, F01-600, F01-720, F01-950, F01-1050, F01-390, F01-290, F03-385, F03-450, F03-505, F03-520, F03-530, F03-690, F03-800, F04-205, F04-305, F04-350, F04-390, F04-405, F04-480, F04-505, F04-520, F04-550, F04-590, F04-705, F04-740, F04-800, F04-810, F04-900, F04-950, F04-990, F05-235, F05-300, F05-335, F05-350, F05-400, F05-500, F05-605, F05-700, F05-760, F05-940, F05-1020, F05-610, F06-310, F06-350, F06-409, F06-455, F06-490, F06-510, F06-590, F06-620, F06-660, F06-790, F06-850, F06-900.

A continuación los genotipos encontrados con todos los loci de RAPDs. Cada renglón es un individuo, los números representan la presencia (1) o ausencia (0) de banda en el gel. Las claves de las localidades son las presentadas en la tabla 1.

**GUY02**

```
00000011010001100001101000101001100001001010000000010001000101001101100000
00100011100000000001100010000001101101000100100001000001100000000000010000
00000101000101000000010000000010100000000000000000100000000101000000000000
0101100000000001000101000000000000000000000000000000000000000000000000000000
00000000100100100101010011110000000101000001100110100101011100101001111010
0000000000000000111111001101100000100110100000100000100101100000001110010
00000100101010000100000011001000000011000100010000000101110000000000000000
0001000000010000001100010100100010000000000000000000000000000000000000000000
00000000000100000010001011011000000110110000000001000000000000000000000000000
00000011010110000000000010000001100101101000000010010010101001000001010110
00000100000011100001000100100001000000100000110001101111001101011100010000
100000100100011000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000
00000100100000100101010001001000000000100110100000010000001001001000001000
0001000000000111000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000
00000011100011001011011000000011000111000100101001000001010101001101110010
0100101100001100000101000000001000011100100100000001000110010000000000000000
00010000000000100101100000001000000100010110100001010010001010111001100100
00010010111000000111011000100001000100000010100000000011100001000101010110
1010110000000000100110011100000000010110000000000100000000000000000000000000
1000001000010000000000110000001000011100100010011001100011100000000000000000
00010011110010001101001100010000000001001010100100000101100100001000010000
```







00100010010010100010000000100000000100100001100000100000000100101010011110  
00000010000101001000000100000000000000010000101000100000000000001000000010  
00000000100010000010000010000000000001000110101000000101000101001001000010  
00000000001001000000001100000010000001000010110000000100000001001000001010  
000010000000001111000100010010000000000001000100000000000010000000001100101010  
0000000000011110001100010010000000000001000000000000000000000000000000001000100010  
00100100000001000110000010010000000001000010001110001000000000001100000010  
0000010000001000011000000000000000001000000100010000000000101000000000000  
0000001110001010100100000011000000000000000100000010000010111001000001001  
000000101010100000101000001000100001010000011000100000101000000000000000  
000100100000100001000100000000000000001001000001000001110010000000000101  
0000001000000010101100111000000010000000001100010000001000000000000011111  
000000101000000100101000001100110000010101100100000001001101001000000010  
0000000010100010000110000100000000100101001110000001111011010000000000000

**MAN02**

00000011010100010000111100001010100001010011100110000000001010001001101011  
00000101000000010000111000011010010001000100101000000001001000001000000110  
00000011011010000011001100101001100001111000111010000100010001001101110011  
0001001111100001000111100000100100100101100100000000011110000000000000000  
00000011110100001100001010101000000001011001100000000001010111001001001011  
00000000001101100001001000001000100101010011100110000001110010001000100010  
00000010101100101000101100101001000011001001101001000010001110001001110010  
00001100010001100111001100001000000001000001001000000100001011000001100000  
00010110000100110011001001001011100001000000100001001001010010000100000010  
00000010010010100010101000001000000001000001100010100000000101001010001010

**HUA02**

00100001010010000011101000001010100001000001110011001001110000001100100010  
00000001100011001000001000010100000001010001101000000011001000001110101000  
00000010010000000000011000001101000001100001101100000101000100001100110110  
000000100000000011010010000001101100001001001101010000101100010001010110011  
00000010000000010001000000101000000101100001100010000000100000001000000011  
00101001000001001001001000001000000011010001110000000001101000000000010110  
00000001001100000001001001001000100001000010110100000001100111001000110010  
00000100000011001101101010101010000001000101110110000000000011000000000000  
00000000001001111000100000001010011101000001100000100100101000001000000000  
00000000100010010010000000101011001001000100010001000001001010001000110010

**PES02**

000000000100101001100001110010101000010000000000010000000000010000101100010  
000000000000010000111110111101000000101100001000100000011001010000000110110  
00000001101100110011010110001011100001010011101010001000010010101100010010  
00000000000101000011011011001011100001000001111110000001101110001111101110  
00000000100010001010001000001110000001000001100010000101001010000100101010  
00000000100001010010000010101011000001011001101110010000010101001101000011  
000010000000100100101010000010011000001010001101110000000000011000100101010  
000100100011100000011000000101000000101000001110100000001100000101100010111  
00011000000110010111100101001000000000010001100011000010111100001111010111  
10100110101001000110010100001011000001000001100010000000111011010010100010

**REV05**

000000000010010010010000010110000000001000001100001000110000010000110010010  
000001000000000010000011000001000100001001010100000000000110000001100111010  
00001100000010100000111000001000100001001001100010000011001000001110001010  
00010100000101000010001000111100001001010010110010000011011001001110110010

00000010001010001010001000001001000001000000101000000001010101001101001010  
00001011000000001010001000011000000001000011100001000001000010000100110010  
00000011001000000010110010001000000001011001100000000101010000001100100010  
00000011101000001000001000101000001001001000001010000101001001100110011010  
00000010001001110100000100000100010000110101110000000001000001000100111010  
00000010001000001001001000001010100001000001101001000001010101001100110110  
00010000001100000101000000101000000001000011100000001101000001001101100010  
00010010000100000110011000101000000001000011101000001001110000001100100010  
00011011001010001000001000001000001001001001101010000101001101100110001010  
0000001000100000001000110000100000000100000110101000000100001001100001010  
000000100010000000001001110000100000000100000110101000000100000001101001010  
000000110010010110001010000010000000010000110001010010010011001110000000000  
0000000100101000000100100010100010001001001100000000010000000001101110011  
00000000111000000011000001001100101001010000110100000101000001001101011010  
00100001101011100100000110001100001001110011110010000011001111001111000110  
00  
0000010100000100110100000010100000001110000110001000001101001101110110110  
00000001100101001000010000101000000101100011000000000011010010000101110110  
00000001100011011000001000001000  
00000010000001111000001000001000000001000001101010000101000010000000010010  
00000000110011000110101000011000000001001000100010010011011001000000010100  
000000100000100100000110000000000000011100000100010001011001000000000010010  
0000000000000000100100011000001000  
00000000010101110000010000001000000101100001100010000100000001000011001010  
00000010001101110100011000001000000001010001100010000010001001001011011011  
00001001100000000000111000101000000001000010000110000011010000000011010011  
000000001000000000000011000001000000001000100000011000100000010001010000110  
00000100100000010000100000001000000001000010100000000011000010000100000110  
00000000000100001000001000001001100101001010100010010011001100000000010111  
0001000000001000011001100001100100000100000100001000001110111000000000111  
00010100100001000111001000001000001101000010000000001001010000000011001010  
00000101100010010101001010000000010011000101000101100001001100001001101010