

UNIVERSIDAD DEL MAR



**Filogeografía del dorado (*Coryphaena hippurus*) basada en
polimorfismos de longitud en fragmentos de restricción del
gen para citocromo b**

TESIS

**Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencias con Especialidad en Ecología Marina**

Presenta:

BIÓL. MAR. EDGAR CÉSAR MONTESINOS GÓMEZ

Dirigido por:

DR. ROLANDO CARDEÑA LÓPEZ

Puerto Ángel, Oaxaca

Noviembre de 2010

Puerto Ángel, Oaxaca, a 28 de octubre del 2010

DR. EDGAR ROBLES ZAVALA
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
DE LA UNIVERSIDAD DEL MAR
P R E S E N T E

Después de haber analizado y evaluado la tesis “**Filogeografía del dorado (*Coryphaena hippurus*) basada en polimorfismos de longitud en fragmentos de restricción del gen para citocromo b**” que presenta el **Biol. Mar. Edgar César Montesinos Gómez**.

Por este conducto, le comunicamos que la tesis cumple con los requisitos académicos para que el citado tesista presente el correspondiente examen profesional.

Sin más por el momento, quedamos de Usted.

A t e n t a m e n t e

Dr. Ramón Andrés López Pérez

Revisor

Dr. Marco Vinicio Ramírez Mares

Revisor

M. en C. Samantha G. Karam Martínez

Revisor

M. en C. Francisco Villegas Zurita

Revisor

Dr. Rolando Cardeña López

Director de Tesis

Reconocimientos.

Esta tesis fue desarrollada en el Laboratorio de Genética de la Universidad del Mar, bajo la dirección del Dr. Rolando Cardeña López. Su financiamiento, así como una beca del sustentante, provinieron del Fondo Sectorial SAGARPA-CONACYT a través del proyecto SAGARPA-2003-C01-225.

Las muestras de dorado provenientes de Hawai y las localidades del norte del Pacífico mexicano fueron obtenidas a través de un amable donativo de Dr. Axáyacatl Rocha Olivares, del CICESE.

Se citan resultados de un análisis filogenético basado en secuencias nucleotídicas del gen para citocromo b de *Coryphaena hippurus* y *C. equiselis*, los cuales fueron obtenidos por la estudiante Nayeli Escudero Castelán como parte de su proyecto de Servicio Social en el laboratorio donde se realizó esta tesis.

Agradecimientos

A mis padres por el apoyo que me brindaron

Índice general

	Página
Portada	i
Reconocimientos	ii
Agradecimientos	iii
Índice general	iv
Índice de Figuras	vi
Índice de Tablas	viii
Resumen	ix
1. Introducción	1
2. Marco teórico	2
2.1 Biología de <i>Coryphaena hippurus</i>	3
2.1.1 Taxonomía.....	3
2.1.2 Morfología externa.....	3
2.1.3 Hábitat y distribución.....	4
2.1.4 Crecimiento y biología reproductiva.....	5
2.1.5 Hábitos alimenticios.....	5
2.1.6 Pesquerías.....	6
2.2 Genética de poblaciones.....	6
2.2.1 Definición de stock.....	6
2.2.2 Estructura genética y filogeografía.....	7
2.3 Flujo génico y marcadores moleculares.....	8
2.3.1 Flujo génico.....	8
2.3.2 Marcadores moleculares.....	9
2.3.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa.....	11
2.3.2.2 Polimorfismos de longitud en fragmentos de restricción	12
2.3.2.3 ADN mitocondrial.....	12
2.3.2.4 ADN nuclear.....	14
3. Antecedentes	15
3.1 Estudios sobre citocromo b en peces.....	15
3.2 Estudios con marcadores genéticos en dorado.....	16
3.2.1 Aloenzimas.....	17
3.2.2 ADN nuclear.....	17
3.2.3 ADN mitocondrial.....	18
4. Hipótesis	20

5. Objetivos	21
5.1 Objetivo general.....	21
5.2 Objetivos particulares.....	21
6. Materiales y métodos	22
6.1 Área de estudio.....	22
6.1.1 Cuencas del Océano Atlántico y Pacífico.....	22
6.1.2 Pacífico Oriental y Central.....	23
6.2 Muestras.....	26
6.3 Diseño de iniciadores.....	27
6.4 Extracción de ADN.....	27
6.5 Amplificación de ADN.....	28
6.6 Determinación de patrones de restricción.....	28
6.7 Electroforesis y visualización de ADN.....	28
6.8 Estimación del tamaño de bandas.....	28
6.9 Análisis estadísticos.....	28
6.9.1 Determinación de haplotipos compuestos.....	29
6.9.2 Análisis de diversidad genética.....	29
6.9.2.1 Diversidad haplotípica.....	29
6.9.2.2 Diversidad nucleotídica.....	29
6.9.2.3 Divergencia nucleotídica entre poblaciones	30
6.9.3 Análisis de estructura poblacional.....	30
6.9.3.1 Análisis de varianza molecular.....	30
6.9.3.2 Índices de fijación.....	31
6.9.3.3 Red de expansión mínima.....	31
6.9.3.4 Filogramas.....	32
7. Resultados y discusiones	34
7.1 Extracción de ADN.....	34
7.2 Diseño de iniciadores.....	34
7.3 Amplificación de ADN.....	35
7.4 Caracterización de la variación.....	36
7.5 Estructura genética y filogeografía.....	40
7.5.1 Red de expansión mínima.....	40
7.5.2 Diversidad genética.....	45
7.5.3 Filogeografía.....	49
8. Conclusiones	55
9. Literatura citada	57
Anexo	66

Índice de Figuras

Figura 1. Macho de <i>Coryphaena hippurus</i> (Tomado de Marsh y Mazurek, 2007).....	4
Figura 2. Distribución mundial de <i>Coryphaena hippurus</i> (Tomado de http://www.flmnh.ufl.edu/fish/gallery/descript/dolphin/dolphin.html).....	4
Figura 3. Tipos básicos de estructura genética (Tomado de Laikre et al., 2005).....	7
Figura 4. Principales giros oceánicos en el mundo (Tomado de Norris,2000).....	22
Figura 5. Mapa de isotermas medias anuales (Tomado de Castaño - Fernández y Castaño-Fernández, 2008).....	23
Figura 6. Área estadística 77 de la FAO (Tomado de Csirke y Tanstad, 2003).....	23
Figura 7. Diagrama de masas de agua superficiales y corrientes en el Océano Pacífico Tropical. STSW, Agua superficial subtropical; TSW, Agua superficial tropical; ESW, Agua superficial ecuatorial. El sombreado representa la temperatura superficial media del mar (más oscuro = agua más fría) (Shea et al., 1992, en Fiedler y Talley, 2006).....	24
Figura 8. Patrones de corrientes en el Pacífico Oriental Central en abril (FAO, 1995).....	25
Figura 9. Patrones de corrientes en el Pacífico Oriental Central en octubre (FAO, 1995).....	25
Figura 10. Cobertura geográfica del estudio.....	26
Figura 11. Extractos de ADN obtenidos a partir de tejido muscular y de aleta. La barra indica la región en la que se observaron algunos restos de ADN genómico.....	34
Figura 12. Amplificación de una muestra de ADN de dorado, con los pares de iniciadores F1-R1 (A) y F1-R2 (B). El carril M contiene marcadores de tamaño.....	35
Figura 13. Amplicones generados con el par de iniciadores F1-R1.....	35
Figura 14. Patrones de bandeo observados en geles de poliacrilamida, con las tres enzimas de restricción que generaron polimorfismos. Las flechas señalan fragmentos polimórficos. Los carriles marcados con "M" contienen marcadores de tamaño.....	37
Figura 15. Mapas de restricción para las enzimas que revelaron polimorfismos. Para cada enzima se indica la secuencia de reconocimiento y el sitio de corte (bases subrayadas). Los números señalan la posición (pb) de los sitios de corte. Las letras señalan los sitios de corte polimórficos.....	38

Índice de Figuras (continuación)

Figura 16. Red de expansión mínima que muestra las mínimas relaciones evolutivas entre los haplotipos detectados, y su distribución en el área de estudio. Los pares de letras en cada conexión indican aparición (+) o desaparición (-) de sitios de restricción.....	41
Figura 17. Filogramas para los grupos analizados, construidos mediante los algoritmos de unión al vecino más cercano (A) y de agrupamiento no ponderado por pares utilizando la media aritmética (B).....	49
Figura 18. Istmo de Centroamérica a mediados del Mioceno (hace 15 a 16 millones) (A), finales del Mioceno (hace 6 a 7 millones de años) (B), y finales del Plioceno (hace aproximadamente 3 millones de años) (C). Las líneas paralelas oblicuas representan masas de tierra emergentes; las zonas punteadas señalan aguas someras; las líneas paralelas horizontales representan aguas oceánicas profundas (Tomado de Coates y Obando, 1996).....	51
Figura 19. Región del Océano Indo-Pacífico durante el Pleistoceno (Tomado de Brown y Lomolino, 1998).....	53
Figura 20. Mapa de corrientes e isotermas en el extremo austral del continente africano. Las flechas abiertas indican la dirección de los vientos alisios, y las sólidas las corrientes. Las zonas en verde representan el sistema de surgencias de Benguela, las cuales aparecen en el inserto relacionadas con isobatas. AC, Corriente de Angola; AGC, Corriente de Agulhas; BCC, Corriente Costera de Benguela; BOC, Corriente Oceánica de Benguela; EUC, Subcorriente Ecuatorial; SAC, Corriente del Atlántico Sur; SEC, Corriente Ecuatorial del Sur; SECC, Contracorriente Ecuatorial del Sur. Así como las surgencias que ocurren en la Corriente de Benguela (Tomado de Marlow et al., 2000).....	53

Índice de Tablas

Tabla I. Utilidad de algunas herramientas genéticas en pesquerías. (Modificada de Ward, 2002).	11
Tabla II. Estudios genéticos realizados con el gen mitocondrial del citocromo b en peces.....	15
Tabla III. Estudios realizados con marcadores genéticos en <i>Coryphaena hippurus</i>	16
Tabla IV. Origen geográfico y claves de registro de las secuencias obtenidas del Genbank	26
Tabla V. Número de muestras biológicas colectadas por localidad.....	26
Tabla VI. Grupos de datos usados en los análisis estadísticos.....	28
Tabla VII. Iniciadores seleccionados para la amplificación.....	34
Tabla VIII. Número de muestras amplificadas por localidad	36
Tabla IX. Haplotipos compuestos y su frecuencia. Los haplotipos indican presencia (1) o ausencia (0) de los sitios de restricción descritos en la Figura 15.....	40
Tabla X. Diversidad haplotípica (H), diversidad nucleotídica (π) y divergencia nucleotídica (d) reportadas para peces marinos cosmopolitas con distribución continua, a partir del análisis de RFLPs mitocondriales.....	45
Tabla XI. Diversidad haplotípica (H) y diversidad nucleotídica (π) para los grupos del Pacífico.....	46
Tabla XII. Valores de diversidad nucleotídica (π) (diagonal superior) y divergencia nucleotídica (d) (diagonal inferior) entre los grupos estudiados.....	47
Tabla XIII. AMOVA realizado en tres niveles entre Pacífico y Atlántico.....	48

Resumen.

El dorado (*Coryphaena hippurus*) es un pez pelágico altamente migratorio que se distribuye a lo largo de las aguas tropicales y subtropicales del planeta. Al ser una especie de importancia pesquera mundial, el conocimiento de su estructura genética representa un elemento importante a considerar en los planes para su manejo. Durante aproximadamente dos décadas la elucidación de esta cuestión ha sido abordada por varios grupos de investigación, en diferentes escalas geográficas y mediante el uso de diversos marcadores genéticos. En general, las evidencias de poblaciones diferenciadas han sido poco claras, aún al considerar escalas geográficas amplias. En esta tesis se analizó la variación genética mitocondrial del dorado en una escala global, empleando PCR-RFLPs del gen para citocromo b. Se analizaron 81 ejemplares del Pacífico Central y Oriental, y ocho secuencias de ADN del Pacífico Occidental y de ambos extremos del Atlántico. La variación genética de estas muestras se analizó mediante una red haplotípica de expansión mínima, comparaciones de divergencias nucleotídicas, AMOVA y filogramas construidos mediante los algoritmos de unión al vecino más cercano y de agrupamiento no ponderado por pares utilizando la media aritmética. El objetivo fue detectar estructura genética e inferir posibles escenarios evolutivos de la especie. Se detectaron 10 sitios de restricción polimórficos, los cuales revelaron 14 haplotipos y dos linajes: Ch01 y Ch08. Se encontraron evidencias claras de tres clados bien diferenciados: el linaje Ch01, que sería el más reciente en la historia evolutiva del dorado y que se habría originado en la cuenca del Pacífico, donde actualmente se le encuentra de manera exclusiva; y dos variantes del linaje Ch08, la más ancestral que es característica del Pacífico, y la más reciente, que habría surgido en el Atlántico y es característica de esta cuenca. El Golfo de Tehuantepec aparece como una zona donde la distribución de los linajes Ch01 y Ch08 presenta un cambio drástico. La aparente ausencia de traslapes en los límites de distribución de los linajes podría estar influenciada por factores como la alta variabilidad ocenográfica en la zona de estudio; o intrínsecos a la biología de la especie, como comportamientos de retorno a sitios de alimentación y resguardo, o fidelidad al sitio de desove. Se detectaron evidencias de conectividad entre las poblaciones de dorado del Atlántico y el Pacífico. Estas estuvieron representadas por dos individuos: uno del Atlántico que presentó un haplotipo característico del Pacífico, y otro del Pacífico que presentó un haplotipo característico del Atlántico. Tal conectividad podría ocurrir a través de la corriente de Agulhas, en el sur de África. El análisis filogeográfico de estos resultados sugiere que la actual diversidad genética mitocondrial del dorado ha sido moldeada por eventos evolutivos que incluyen al menos dos eventos de aislamiento vicariante. Estos aislamientos se habrían originado por la emergencia del Istmo de Centroamérica durante finales del Mioceno; por enfriamiento del mar, y descenso en su nivel para formar un puente de tierra entre Australia y el sureste asiático, debido a glaciaciones cíclicas desde finales del Mioceno hasta el Pleistoceno; y por enfriamientos del mar en el sur de África debidos a las mismas glaciaciones, culminando en tiempos geológicos recientes con la formación del sistema de surgencias de Benguela. Desde el punto de vista de la genética molecular, el linaje Ch01 presenta una diferenciación tan alta que lo señala como una posible nueva especie o subespecie del género *Coryphaena*.

Palabras clave: *Coryphaena hippurus*, citocromo b, RFLP, estructura genética, filogeografía.

1. Introducción.

La conservación de organismos marinos es una tarea difícil, por varias razones: el hábitat es inmenso pues los océanos cubren el 70 por ciento de la superficie del mundo y existen numerosas dificultades para la observación y estudio de las especies marinas. La necesidad de información para poblaciones marinas, ha llegado a ser más crítica cada año, debido al incremento del volumen de las pesquerías comerciales y deportivas, que han provocado colapsos económicos a través de la sobrepesca (Awise, 1994). Por esto son necesarias estrategias para la conservación y el uso sustentable de los recursos biológicos en la zona costera para lograr la preservación de las pesquerías a largo plazo. Uno de los principales retos al respecto, incluye desarrollar estrategias de administración para las especies con sus diferentes características biológicas y requisitos (Laikre *et al.*, 2005).

Un resultado de estos esfuerzos, es el concepto de "stock" (Waples, 1998), es frecuentemente definido como la unidad básica para pesca y manejo según Carvalho y Hauser, 1994. En el ámbito genético, el stock es descrito como una unidad aislada reproductivamente, la cual es genéticamente diferente de otras unidades (Carvalho y Hauser, 1994). El modelo de distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones (stocks) es referida como la estructura genética. El ignorar o no conocer la estructura genética de una población sujeta a explotación puede resultar en pérdida de diversidad genética, daño ecológico y reducción de la productividad (Laikre *et al.*, 2005). Desde una perspectiva de manejo de pesquerías, la determinación de la estructura genética permite conocer las poblaciones entre las cuales está limitado el flujo de genes (Awise, 1994).

Los estudios que evalúan directamente la dispersión de organismos marinos (i.e. estudios de huevos y larvas, de marca y recaptura) pueden proveer criterios valiosos, pero son logísticamente difíciles y han sido relativamente escasos. Además, tales estudios proveen evidencia sobre el movimiento de los individuos pero no necesariamente sobre las consecuencias genéticas de la dispersión. Por estas razones, ha sido de considerable interés el uso de datos genéticos para proveer estimaciones indirectas sobre la dispersión de organismos marinos (Waples, 1998). En este contexto, los marcadores moleculares han tenido importantes aplicaciones y han sido de ayuda en la conservación de peces explotados comercialmente y en el desarrollo de guías para una pesca sustentable (Primmer, 2005). Marcadores genéticos como las aloenzimas, se han aplicado en casi todos los temas de genética de poblaciones y sus ramas. Actualmente, las técnicas basadas en análisis de ADN han ganado terreno sobre las aloenzimas en el campo

de la genética de poblaciones (Silva y Ruso, 2000). Metodológicamente, este desarrollo se ha debido a la creación de tecnologías como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y a la introducción de diferentes tipos de marcadores mitocondriales o nucleares, como es el caso de los microsátélites (Zhang y Hewitt, 2003).

Poco es conocido de la estructura genética de varias especies de peces marinos pelágicos que están ampliamente distribuidas y que habitan aguas superficiales tropicales y subtropicales de los océanos del mundo. Algunas de estas especies como atunes, picudos, pez espada, dorados y varias especies de tiburones soportan extensas pesquerías comerciales y recreativas. Esta información es crítica para delinear unidades administrativas pesqueras, evaluar interacciones en las pesquerías y, sobre una escala de tiempo mayor, conservar la variación genética (Graves, 1998).

El dorado (*Coryphaena hippurus*) es una especie de importancia pesquera a nivel mundial y es explotada en ambos litorales de México. Además de las dificultades para definir los límites de sus poblaciones, existe en el Pacífico mexicano, una pesquería artesanal del dorado, que no permite tener registros sistemáticos de las capturas, pues en México *C. hippurus* está reservado a la pesca deportiva (Madrid y Beltrán-Pimienta, 2001). La investigación sobre su biología se ha desarrollado principalmente en el Océano Atlántico, aunque actualmente en el Pacífico se ha incrementado el número de estudios sobre la especie, lo que revela un interés creciente por este recurso en numerosos campos (reproducción, genética, hábitos alimenticios, etcétera). Este trabajo busca determinar la estructura genética del dorado en un nivel global, con énfasis en localidades del Pacífico Central y Oriental, así como analizar esta información para proponer escenarios que pudieran explicar la evolución de esta especie. Para este fin se utilizó ADN mitocondrial, evaluando la variación del gen para citocromo b mediante la técnica PCR-RFLP.

2. Marco teórico.

2.1 Biología de *Coryphaena hippurus*.

2.1.1 Taxonomía.

Coryphaena es el único género de la familia Coryphaenidae y está compuesto por dos especies: *Coryphaena hippurus* y *Coryphaena equiselis*. Ambas especies son muy similares en apariencia pero se distinguen principalmente por el parche de dientes en la lengua que, en el caso de *C. equiselis*, es amplio y cuadrado y en el de *C. hippurus* es pequeño y oval; y por la profundidad del cuerpo en relación con la longitud estándar, que en *C. hippurus* es menor que el 25% y en *C. equiselis* mayor que este valor (Palko *et al.*, 1982). Otras diferencias importantes son el tamaño, que en *C. hippurus* es de 200 cm máximo con una talla media de 100 cm, y en *C. equiselis* de 75 cm máximo con una talla media de 50 cm (FAO, 1995). *Coryphaena hippurus* se clasifica de la siguiente manera:

Reino:	Animalia
Phylum:	Chordata
Clase:	Osteichthyes
Subclase:	Actinopterygii
Orden:	Perciformes
Suborden:	Percoidei
Familia:	Coryphaenidae
Genero:	<i>Coryphaena</i>
Especie:	<i>Coryphaena hippurus</i>

2.1.2 Morfología externa.

Las características del género *Coryphaena* incluyen una forma del cuerpo comprimida y alargada, con pequeñas escamas cicloideas (Palko *et al.*, 1982). En *C. hippurus* la boca es grande con muchos dientes finos en bandas. La línea lateral se curva hacia la aleta pectoral. La aleta dorsal es muy larga, subiendo sobre la nuca y continuando casi hasta la cola y está compuesta de 52 a 66 rayos blandos en adultos. La aleta anal es cóncava y también es muy larga, empezando detrás del ano, en el punto medio del cuerpo y continuando casi hasta la cola con 25 a 31 rayos blandos. Las aletas pélvicas están debajo de las pectorales y se encuentran dentro de un surco en el cuerpo. Las aletas pectorales tienen de 19 a 21 rayos y su longitud es más de la mitad de la cabeza. La aleta caudal tiene 17 rayos principales y de 10 a 14 rayos secundarios superiores e inferiores y es profundamente furcada. *Coryphaena hippurus* posee 31 vértebras. Los machos maduros poseen una prominente cresta ósea sobre el frente de la cabeza (Figura 1).

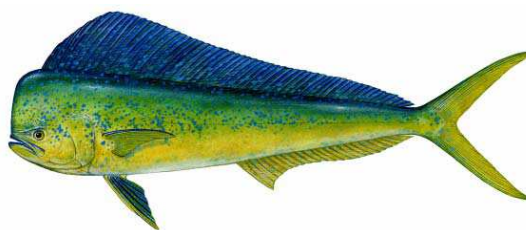


Figura 1. Macho de *Coryphaena hippurus* (Tomado de Marsh y Mazurek, 2007).

En vida, el color de estos animales es de tonalidades doradas sobre los costados, azules y verdes metálicos sobre los lados y parte posterior, con blanco y amarillo sobre la parte de abajo. Algunos presentan puntos negros sobre la cabeza y cuerpo (Palko *et al.*, 1982).

2.1.3 Hábitat y distribución.

El dorado es un pez de nado rápido, principalmente oceánico, distribuido mundialmente en aguas tropicales y subtropicales, el intervalo de *C. hippurus* está limitado por la isoterma de los 20 °C con ocasionales intrusiones dentro de aguas mucho más frías (Figura 2). Scherbachev (1973) reportó que un espécimen fue capturado en 12.4 °C en el Mar de Okhotsk. La distribución puede expandirse debido a variaciones estacionales de temperatura (Palko *et al.*, 1982).

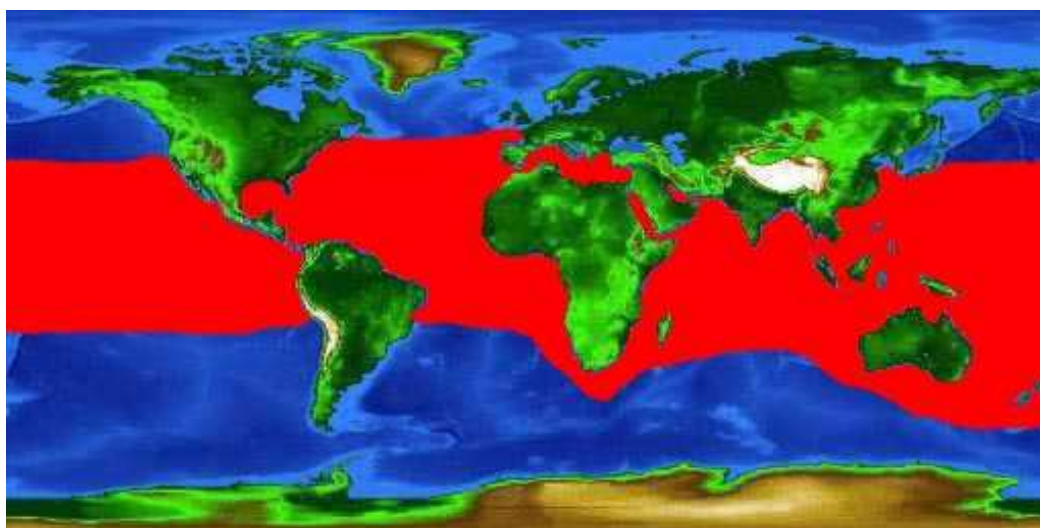


Figura 2. Distribución mundial de *Coryphaena hippurus* (Tomado de <http://www.flmnh.ufl.edu/fish/gallery/descript/dolphin/dolphin.html>).

En el Atlántico Occidental, el dorado ha sido reportado en Nueva Escocia y tan lejos como Río de Janeiro, Brasil. Son abundantes en el Golfo de México, en la Corriente de Florida, América Central y a través del Mar Caribe. En el Atlántico Oriental es encontrado entre la Bahía de Vizcaya y en la desembocadura del Río Congo, y ha

sido reportado tan lejos como la punta sur del continente africano (Palko *et al.*, 1982).

En el Pacífico Oriental ha sido registrado desde Oregón, alrededor de las Islas Galápagos y a lo largo de las costas de Perú, en Bahía Panamá. En el Pacífico Occidental está ampliamente distribuido, ha sido reportado alrededor de las islas Filipinas, a lo largo de la isoterma de 18-19 °C en el Mar de Japón, en aguas adyacentes al oriente de Taiwán, en la parte noroeste de las Islas Batán y en el Mar de Okhotsk.

En el Océano Índico ha sido reportado en las costas de Tangañica y Kenia, y a través del Océano Índico Norte y Central (Palko *et al.*, 1982).

2.1.4 Crecimiento y biología reproductiva.

El dorado crece rápidamente a través de su vida, que en promedio es de aproximadamente cuatro años. Presentan dimorfismo sexual debido a una cresta ósea que se observa en los machos (Palko *et al.*, 1982).

Las hembras producen aproximadamente de 80 000-1 000 000 óvulos por cada desove; posteriormente la agrupación de los adultos de ambos sexos favorece la unión del óvulo con el espermatozoide, que se realiza en el agua (García-Melgar y Ochoa-Báez, 1993). Los dorados tienen estaciones de desove prolongadas y desoves múltiples son comunes. Scherbachev (1973) menciona que los dorados son desovadores intermitentes a lo largo de todo el año en aguas tropicales, pero en la periferia de su intervalo confinan los desoves al periodo de agua cálida del año. También notó que huevos de *C. hippurus* fueron encontrados en aguas japonesas en meses de verano, cuando las temperaturas del agua fueron de 21-29 °C.

2.1.5 Hábitos alimenticios.

Los dorados son depredadores tope muy ágiles y capaces de cazar presas en movimiento, compiten con otros pelágicos depredadores por los mismos organismos en la cadena alimenticia (Palko *et al.*, 1982). En un estudio hecho por Olson y Galván-Magaña (2002) en el Pacífico Oriental, se observó que la dieta de los dorados estuvo dominada por peces voladores, cefalópodos epipelágicos, peces tetraodontiformes, *Auxis* spp. y peces de la familia Gempylidae.

En el Pacífico central está confirmado que los dorados son piscívoros, también mostraron tener otras fuentes importantes de alimento como los camarones peneidos. Los dorados están asociados a restos de naufragio o basura que flota a la deriva (Palko *et al.*, 1982). En localidades del norte del Pacífico mexicano Aguilar-Palomino *et al.* (1998) observaron que el espectro trófico del dorado incluyó 51

especies, 18 de las cuales integraron el 97% de su dieta, por lo cual se le considera una especie no selectiva en cuanto a sus hábitos alimentarios. Las especies más importantes fueron *Dosidicus gigas*, *Pleuroncodes planipes*, *Balistes polylepis*, *Cypselurus callopterus* y *Auxis spp.*, las cuales constituyeron el 70% de la dieta.

2.1.6 Pesquerías.

Las pesquerías regionales del dorado son marcadamente estacionales y esto es presumiblemente resultado de la migración, hay pruebas de que pueden cubrir grandes distancias en sus migraciones, se cree que los dorados migran hacia el norte durante la primavera y el verano. El dorado, al poseer una distribución mundial, es explotado a escala global en los Océanos Atlántico y Pacífico. Según Marsh y Mazurek (2007) las más altas capturas se dan en Japón y Taiwán con 9 278 t y 8 560 t, respectivamente. Estos autores, junto con Lasso y Zapata (1999), también reportan estadísticas sobre un gran número de flotas pesqueras importantes de América Central, Sudamérica, el Mar Mediterráneo y el Caribe.

En México, la Norma Oficial Mexicana NOM-017-PESC-1994, reglamenta que la pesca del dorado está reservada solo para pesca deportiva (Diario Oficial de la Federación, 1995). En Baja California, el dorado es frecuentemente capturado mediante pesca deportiva. Pero a lo largo de las costas de Sinaloa, Oaxaca y Chiapas es uno de los principales recursos en la pesca artesanal (García-Melgar y Ochoa-Báez, 1993).

2.2 Genética de poblaciones.

2.2.1 Definición de stock.

Una manera de unificar esfuerzos en la administración de las especies acuáticas ha sido desarrollar el concepto de "stock", que es popular dentro de los administradores pesqueros, porque puede hacer más efectivos los esfuerzos de conservación y explotación (Waples, 1998). El término stock tiene múltiples acepciones, pero para los administradores pesqueros se define como un grupo de peces explotado en un área específica o por un método específico (Carvalho y Hauser, 1994). La definición biológica más comúnmente aceptada de stock es la propuesta por Ihssen *et al.* (1981 en Begg, 1998): un grupo de apareamiento azaroso, de individuos reproductivamente aislados, de una única especie con integridad temporal y espacial. Esta definición de stock abarca muchos enfoques tales como la demografía, el reclutamiento, la merística, los parásitos y la genética (Begg, 1998; Ward, 2000).

Cabe mencionar que el presente trabajo aborda el enfoque genético, y en este contexto la definición de stock más aceptada es: una unidad aislada reproductivamente, la cual es significativamente diferente de otras (Carvalho y Hauser, 1994).

2.2.2 Estructura genética y filogeografía.

La mayoría de las especies consisten de grupos de individuos que están más o menos aislados uno del otro. Los mecanismos de aislamiento pueden ser geográficos, temporales, ecológicos o etológicos y el grado de aislamiento varía entre las especies y las poblaciones que las componen. Las poblaciones exhiben típicamente algún grado de diferenciación genética, y el modelo de distribución de esas diferencias es referido como la estructura genética de las poblaciones (Ryman, 1997).

Una definición más técnica y que también describe lo que es estructura genética poblacional es la de Heist (1999). Según este autor, cuando miembros de una especie quedan aislados dentro de múltiples stocks reproductivos, la deriva génica causa que las frecuencias de sus alelos en marcadores genéticos neutrales diverjan, de tal forma que esta variación en frecuencia refleja la magnitud del aislamiento. Así, las diferencias en frecuencias alélicas entre muestras geográficas pueden ser usadas para estimar indirectamente modelos de flujo de genes, y por lo tanto para definir la estructura genética poblacional.

La estructura genética de poblaciones en una especie, dentro de un área geográfica particular, puede tomar un gran número de formas, pero en principio puede ser clasificada de manera general en tres tipos básicos: 1) poblaciones diferenciadas, 2) cambio continuo y 3) sin diferenciación (Figura 3).

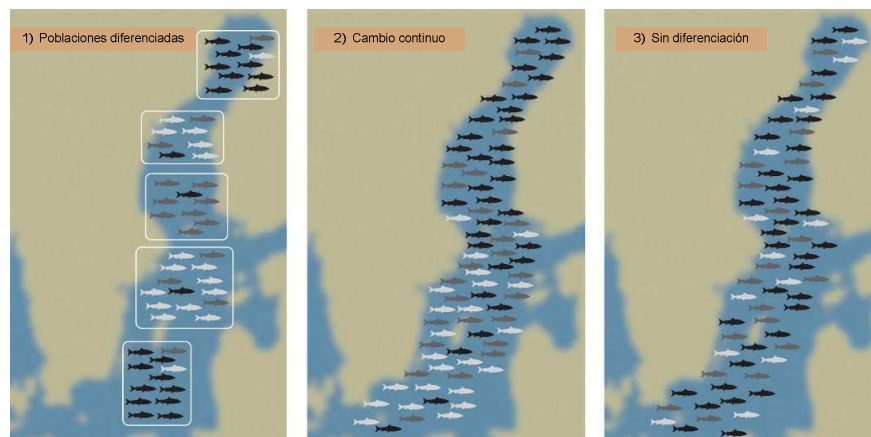


Figura 3. Tipos básicos de estructura genética (Tomado de Laikre *et al.*, 2005).

En estos posibles escenarios, la unidad poblacional básica es el stock; la diferencia fundamental entre los tres tipos de estructura poblacional está determinada por la cantidad de flujo génico entre los stocks (Laikre *et al.*, 2005).

El conocimiento de la estructura genética poblacional permite determinar las unidades entre las cuales está limitado el flujo de genes, y proporciona herramientas para una mejor administración de los recursos biológicos. Por ejemplo, en el caso de una estructura sin diferenciación (panel 3 de la Figura 3), la extinción de una población particular puede tener poco efecto sobre el total de los recursos genéticos de la especie. En contraste, la extirpación de una población que está altamente diferenciada (panel 1 de la Figura 3) implica la pérdida de una porción significativa del acervo de genes de esa especie (Ryman, 1997; Primmer, 2005).

La filogeografía representa una extensión del ámbito de la genética poblacional y se define, en sentido estricto, como el análisis espacial de los linajes génicos (Avice *et al.*, 1987). La filogeografía aplica el análisis de genealogías génicas al estudio de la evolución de las poblaciones y permite sacar conclusiones con respecto a secuencias de colonización, diversificación y extinción de linajes en determinadas áreas. Enfatiza los aspectos históricos de la actual distribución de linajes, por lo cual puede ser considerada como una subdisciplina de la biogeografía histórica que integra conceptos y técnicas de genética molecular, genética de poblaciones, demografía, sistemática filogenética, etología y paleontología (Avice, 1994, 2000).

Por lo anterior, los estudios básicos e integrales sobre aspectos biológicos son cruciales para el entendimiento de la dinámica poblacional de cualquier especie. En el caso del dorado, su carácter migratorio determina que el conocimiento de su estructura genética poblacional sea un factor clave dentro de cualquier plan para su manejo.

2.3 Flujo génico y marcadores moleculares.

2.3.1 Flujo génico.

El flujo génico se refiere a todos los mecanismos que generan movimientos de genes de una población a otra (Slatkin, 1985). Las poblaciones de una especie pueden intercambiar genes en mayor o menor grado, ya sean genes nucleares o genomas uniparentales como la mitocondria o el cloroplasto, debido al movimiento de gametos, semillas, individuos juveniles o adultos (en animales o plantas), así como por eventos de extinción y recolonización de poblaciones enteras (Aguirre-Planter, 2007).

Uno de los problemas en el análisis de la estructura de las poblaciones es determinar la cantidad de flujo génico. El flujo génico es un componente principal de

la estructura poblacional, ya que determina hasta qué punto cada población local de una especie es una unidad evolutiva independiente. Si existe una gran cantidad de flujo génico entre poblaciones locales, entonces todas las poblaciones locales evolucionan juntas; pero si hay poco flujo génico cada población evoluciona en forma casi independiente (Slatkin, 1994).

Se han distinguido dos clases de métodos para estimar los niveles de flujo genético en poblaciones naturales (Slatkin, 1985):

- Los métodos directos son aquellos que dependen de observaciones o experimentos que miden el grado de dispersión. Por ejemplo, los estudios de marcado, liberación y recaptura pueden proveer estimaciones de la distancia promedio entre el punto de liberación y el punto de recaptura. Un método ligeramente diferente, es la utilización de métodos genéticos para la determinación de la paternidad y calcular la distancia entre los progenitores y descendientes (Slatkin, 1994).
- Los métodos indirectos se basan principalmente en observar la distribución espacial de alelos en la población para hacer inferencias en los niveles o patrones de flujo génico en las poblaciones. El método indirecto más comúnmente utilizado se basa en el estadístico F_{st} de Wright, el cual es una medida de la correlación entre los genes en una subpoblación en relación a la población entera (Slatkin, 1985; Slatkin, 1994). Mediante el método indirecto, se realiza la estimación de flujo génico, a partir de la distribución de marcadores genéticos. Los parámetros de flujo génico se definen por modelos demográficos, mientras que los modelos de genética de poblaciones proveen la conexión entre estos parámetros y la distribución de los marcadores genéticos (Neigel, 1997).

2.3.2 Marcadores moleculares.

Hay un conjunto aparentemente desconcertante de técnicas genéticas disponibles para el análisis genético de poblaciones, sin embargo ignorando los detalles técnicos y enfocándose sobre las propiedades importantes, los marcadores genéticos son simplemente secuencias de ADN para las cuales existen múltiples estados de carácter. Todos los marcadores genéticos reflejan diferencias en secuencia del ADN. Loci separados pueden proveer pruebas de hipótesis independientes, el uso de muchos loci juntos entonces pueden proveer una sensibilidad más fina en el estudio. Usualmente la variación genética es organizada de manera jerárquica (dos alelos dentro de un individuo, N individuos dentro de una población y subpoblaciones dentro de una población). Los marcadores pueden proporcionar información útil en

diferentes niveles: estructura de la población, niveles de flujo de genes, relaciones filogenéticas, modelos de biogeografía histórica y análisis de parentesco (Sunnucks, 2000; Féral, 2002).

Entre de los principales marcadores moleculares están las aloenzimas, las cuales son variantes de proteínas que se diferencian electroforéticamente. La simplicidad y aplicabilidad de la técnica, ha hecho de ésta la forma más ampliamente estudiada de variación molecular (Magoulas, 1998). Sin embargo, la técnica de aloenzimas presenta desventajas con respecto a técnicas basadas en ADN, las más importantes incluyen:

- Algunas especies son monomórficas para la mayoría de aloenzimas y el número de aloenzimas que pueden ser investigadas por procedimientos estándar está limitado (Parker *et al.*, 1998).
- Problemas asociados con expresión ambiental y ontogénica en algunos sistemas de enzimas (Lowe y Ashton, 2004).
- Una limitante más es que las aloenzimas pueden diferir en su función metabólica, estas son agrupadas de acuerdo a las vías metabólicas que ellas catalizan, y las diferentes clases tendrán diferentes modelos de expresión dentro de un mismo organismo (Parker *et al.*, 1998; Lowe y Ashton, 2004).
- Muchas aloenzimas son específicas de tejidos, los cuales no siempre estarán fácilmente disponibles (músculo, hígado, nervio óptico) (Ward, 2002).
- Otra inevitable limitante de las aloenzimas es su incapacidad para detectar variación en una secuencia de nucleótidos que no altera la secuencia de aminoácidos. Un polimorfismo es silencioso si está presente en la región codificante pero no altera el péptido producido (Hartl y Clark, 1997).

La mayoría de los estudios de aloenzimas son probablemente robustos y hay evidencia sustancial de que la mayoría de la variación observada es neutral. Sin embargo, está claro que el marcador genético ideal es aquel que muestre la variación del ADN (Parker *et al.*, 1998). Las células de la mayoría de los eucariotes contienen ADN nuclear heredado biparentalmente así como también ADN en organelos (mitocondrias y cloroplastos), que es heredado uniparentalmente. Esta diferencia en transmisión y algunas diferencias principales en modelos de evolución, causan que las genealogías de genes en ADN de organelos y ADN nuclear reflejen diferentes aspectos de la biología de las poblaciones y su historia (Sunnucks, 2000). En la década de los 80's, un conjunto de nuevas técnicas moleculares estuvieron disponibles para estudios genéticos de alta resolución, en el nivel de poblaciones. La esperanza de obtener marcadores genéticos que nos proporcionen información valiosa, para seguir la pista a individuos y/o sus genes ha hecho que los

investigadores dirijan la mirada hacia las técnicas basadas en ADN (Parker *et al.*, 1998). La Tabla I muestra la utilidad de diferentes marcadores genéticos en diferentes ámbitos. La utilidad se evalúa en una forma integral; por ejemplo el secuenciamiento de ADN mitocondrial (ADNmt) es una herramienta poderosa para identificación de especies, pero es costosa por lo que se le ubica debajo del análisis de polimorfismo de longitud en fragmentos de restricción (RFLPs) en productos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del ADN mitocondrial.

Tabla I. Utilidad de algunas herramientas genéticas en pesquerías (Modificada de Ward, 2002).

Marcador	Identificación de especies	Genética de poblaciones	Sistemática	Genética en acuicultura
Aloenzimas	++++	+++	+++	+++
ADNmt-RFLP	++++	++	+++	+
ADNmt-PCR-RFLP	+++++	+++	+++	++
Secuenciamiento de ADNmt	++++	++	+++++	+
RAPD	+++	++	+	++
Microsatélites	+	++++	+	+++++
Minisatélites	+	+++	+	++
AFLP	+++?	++	+	+++
EPIC-PCR	++?	+++?	++?	+++?

ADNmt, ADN mitocondrial; RFLP, Polimorfismo de longitud en fragmentos de restricción; PCR, reacción en cadena de la polimerasa; ADNmt-RFLP, RFLPs en el genoma completo del ADNmt; ADNmt-PCR-RFLP, RFLPs en productos de PCR del ADNmt; RAPD, ADN polimórfico amplificado azarosamente; AFLP, Polimorfismo en las longitudes de los fragmentos amplificados; EPIC-PCR, Polimorfismo de longitud en intrones amplificados por PCR. La anotación ? indica que este enfoque ha sido poco explorado, pero que sus resultados probables están basados en las propiedades del marcador.

2.3.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa.

En 1986 se desarrolló una técnica denominada “reacción en cadena de la polimerasa” o PCR por sus siglas en inglés, que amplió enormemente el poder de la investigación del ADN (Klug y Cummings, 1999). La PCR permite la amplificación directa de segmentos de ADN específicos sin clonación y puede utilizarse en fragmentos de ADN que estén presentes inicialmente, en cantidades infinitesimalmente pequeñas. El método de PCR se basa en la amplificación de un segmento de ADN utilizando ADN polimerasa y cebadores, oligonucleótidos que hibridizan con la cadena complementaria a la secuencia que se desea amplificar. Hay tres pasos fundamentales en la reacción de la PCR y la cantidad de ADN producida solo está limitada, en teoría, por el número de veces que se repiten estos pasos. Cada ciclo resulta en una duplicación del número de moléculas. El resultado teórico de n rondas de amplificación es 2^n copias de cada molécula plantilla originalmente presente (Hartl y Clark, 1997; Klug y Cummings, 1999;). La principal limitación de la técnica es que las secuencias de ADN en los extremos de la región a ser amplificada deben ser conocidas, para que los oligonucleótidos puedan ser

sintetizados. Hay muchas aplicaciones en las cuales se puede utilizar la PCR, en genética de poblaciones, por ejemplo, la PCR puede ser usada para detectar diferentes alelos en poblaciones naturales (Hartl y Clark, 1997).

2.3.2.2 Polimorfismo de longitud en fragmentos de restricción.

El polimorfismo de longitud en fragmentos de restricción (RFLP por sus siglas en inglés) es una de las técnicas más ampliamente usadas en genética molecular. En ésta, el ADN es cortado con enzimas de restricción (endonucleasas del tipo II). Las enzimas de restricción cortan la doble hebra en todos los sitios donde hay una secuencia particular de nucleótidos, llamada sitio de restricción de la enzima. La mayoría de las mutaciones que ocurren en sitios de restricción no tiene efecto sobre la estructura primaria de las proteínas. Los polimorfismos que se detectan mediante la técnica RFLP surgen de mutaciones dentro de sitios de restricción, o por mutaciones que crean nuevos sitios de restricción (Lewin, 1997).

Los RFLPs son marcadores genéticos que pueden analizarse tanto en el genoma mitocondrial como en el nuclear; esto permite distinguir la contribución de los genomas paterno y materno, en el caso de los RFLPs nucleares, o solamente del genoma materno en el caso de los mitocondriales. Los RFLPs del genoma nuclear son marcadores codominantes, que se heredan de acuerdo a reglas mendelianas, mientras que los del genoma mitocondrial se heredan vía materna. Como se discutirá en la sección siguiente, el ADN mitocondrial es más fácil de obtener que el nuclear, y esto ha facilitado que los RFLPs de este genoma se hayan usado ampliamente en diversos ámbitos de la genética poblacional (Parker *et al.*, 1998).

Con el advenimiento de la PCR, la técnica RFLP se ha vuelto mucho más simple, únicamente se usan dos pequeños cebadores para amplificar una región de ADN y ésta, pueda entonces ser cortada por la enzimas y analizada en geles de agarosa o poliacrilamida (Silva y Ruso, 2000; Onarici y Sumer, 2003;).

2.3.2.3 ADN mitocondrial.

El genoma mitocondrial consiste de una molécula única de ADN circular denominada ADNmt. El tamaño varía en un rango notablemente estrecho en las diferentes especies de vertebrados (15.7-19.5 kb), promediando alrededor de 16 kb. Una molécula de ADNmt típica contiene una región control para el inicio de la replicación del ADN, genes para dos moléculas de ADN ribosomal, 22 genes para ARN de transferencia y 13 para proteínas; de estas últimas, 12 son subunidades de enzimas complejas que transportan electrones y sintetizan ATP. En el nivel de nucleótidos, las tasas de substitución en el ADNmt son de 5 a 10 veces más grandes que las que

ocurren en genes nucleares de copia única. La razón de la alta sustitución puede deberse a cualquiera de estas dos razones: una alta tasa de incorporación de nucleótidos errónea o una baja eficiencia de reparación de la ADN polimerasa. En el ADNmt, falta la función de reparación (Hartl y Clark, 1997).

El ADNmt animal posee una serie de características que lo hacen un marcador ideal para estudios de evolución y de genética poblacional (Zhang y Hewitt, 2003). Algunas de las ventajas de usar variación en ADNmt son (Hartl y Clark, 1997; Zhang y Hewitt, 2003):

- La molécula de ADNmt en la mayoría de los animales es relativamente pequeña y fácil de aislar.
- Está presente en múltiples copias por célula, es por esto que muestras viejas y menos preservadas, todavía pueden proporcionar información útil.
- El genoma mitocondrial no presenta recombinación, por lo que es más probable que la estructura de ramas en el árbol de genes sea más clara.
- Los genes mitocondriales son más fáciles de amplificar que los genes nucleares y los iniciadores requeridos están ampliamente disponibles.
- El tamaño efectivo poblacional del ADNmt es una cuarta parte del correspondiente al ADN nuclear, y por esto tiene una tasa más acelerada de deriva génica, lo cual a su vez incrementa la posibilidad de detectar diferenciación genética.

Según Hartl y Clark (1997), los principales problemas en el análisis de ADNmt son:

- Los estudios de genética poblacional (genealogía, estructura genética, filogenia) basados en ADNmt, son menos informativos que los basados en ADN nuclear; esto se debe tanto al patrón de herencia materna del ADNmt, como a la ausencia de recombinación de este genoma.
- Diferentes partes del ADNmt mutan en diferentes tasas. La región control es altamente variable, con algunos sitios tan mutables que en ellos ocurren múltiples sustituciones con frecuencia, en estudios de evolución esto puede llevar a que se subestimen tiempos de divergencia. Por otro lado, los genes del ARN ribosomal (ARNr) evolucionan lentamente (Moritz *et al.*, 1987).

El genoma mitocondrial ha sido muy estudiado, y se han desarrollado iniciadores “universales” para algunos genes (Kocher *et al.*, 1989). Se han aplicado exitosamente técnicas basadas en este marcador molecular a cuestiones taxonómicas en peces (Santos *et al.*, 2003). También en el ámbito de peces, el ADNmt ha sido analizado extensivamente para investigar la estructura de stocks (Liu y Cordes, 2004).

2.3.2.4 ADN nuclear.

El ADN nuclear (ADNn) tiene un intervalo de tamaño entre 10^6 (algunas bacterias) y 10^{11} kb (en algunas plantas). Posee regiones codificantes, de evolución comparativamente lenta (exones), las cuales frecuentemente están entremezcladas con regiones no codificantes y más variables (intrones) (Lin y Danforth, 2004). El ADNn contiene regiones de copia única y regiones repetitivas o duplicadas. Las regiones de copia única generalmente codifican para el producto de un gen. El ADN repetitivo consiste de secuencias que están repetidas en varios grados. Estas pueden ser segmentos codificantes de genes de ARN ribosomal, o unidades repetidas en tandem no codificantes. Los últimos son algunos de los marcadores más variables identificados en el genoma de los eucariotas: secuencias de minisatélites y microsátélites (Parker *et al.*, 1998).

Los genes nucleares de locus único, son particularmente útiles para detectar polimorfismos funcionales y estructura poblacional. Nuevos marcadores moleculares basados en análisis de regiones del ADNn, como los microsátélites y los intrones, han revelado elevados niveles de variación genética en relación con los métodos tradicionales (Féral, 2002).

Los marcadores nucleares han sido importantes para inferir estructura genética de poblaciones (Zhang y Hewitt, 2003). Los polimorfismos en el ADN nuclear existen ampliamente en organismos eucarióticos, proveyendo oportunidades ilimitadas para estudiar los mecanismos de evolución. Sin embargo, cuando trabajamos con marcadores nucleares se enfrentan retos en casi todas las etapas de un estudio. Esto incluye recombinación, selección (no neutralidad), heterocigosidad, polimorfismos de inserción/delección, dificultad en la PCR y secuenciación. Algunos de estos aspectos no ocurren en el ADNmt y son por esto, problemas específicos de los marcadores nucleares (Zhang y Hewitt, 2003).

3. Antecedentes.

3.1 Estudios sobre citocromo b en peces.

El citocromo b es una proteína en la cadena transportadora de electrones y solamente el producto del genoma mitocondrial, da un monómero completamente funcional (Park et al., 2000). El gen que codifica al citocromo b (cit-b) contiene regiones conservadas y regiones variables, y dentro de estas últimas, posiciones de codones que evolucionan rápidamente así como lentamente (Farias et al., 2001). El gen evoluciona lentamente en términos de sustituciones no sinónimas, y su tasa de sustitución en posiciones silenciosas es relativamente rápida (Park et al., 2000; Kvist, 2000). Se piensa que el cit-b es lo suficientemente variable para cuestiones a nivel poblacional, y lo suficientemente conservado para clarificar relaciones filogenéticas más profundas (Kvist, 2000). La Tabla II enlista diversos estudios realizados con peces en estos ámbitos, en ella se incluyen dos trabajos con dorado. Uno de estos aborda la diferenciación de especies (Rocha-Olivares y Chávez-González, 2008), y el otro un análisis de estructura genética a nivel global (Reeb y Cann, 1996).

Tabla II. Estudios genéticos realizados con el gen mitocondrial del citocromo b en peces.

Autor	Problemática	Organismos analizados
Finnerty y Block, 1992	Variación genética	<i>Makaira nigricans</i>
Martin y Palumbi, 1993	Evolución	Varias especies de tiburones
Finnerty y Block, 1995	Filogenia	Scombroidei, Istiophoridae y Xiphiidae
Reeb y Cann, 1996	Estructura de la población	<i>Coryphaena hippurus</i>
Orbacz y Gaffney, 2000	Estructura genética	<i>Tautoga onitis</i>
Park et al., 2000	Variación genética	Salmónidos
Farias et al., 2001	Filogenia	Cíclidos
Ishikawa et al., 2001	Variación genética	<i>Conger myriaster</i>
Gharret et al., 2001	Análisis filogeográfico	<i>Oncorhynchus kisutch</i>
Olsen et al., 2002	Variación genética	<i>Theragra chalcogramma</i>
Reed et al., 2002	Filogenia	<i>Carangidae</i>
Santos et al., 2003	Variación genética	<i>Macrodon ancylodon</i>
Bonhomme et al., 2003	Variación genética	<i>Siganus rivulatus</i>
Takehana et al., 2003	Variación genética	<i>Oryzia latipes</i>
Arnason, 2004	Variación genética, genealogía	<i>Gadus morhua</i>
Cheng et al., 2005	Diversidad genética	<i>Rhinogobius maculafasciatus</i>
Ely et al., 2005	Estructura de la población	<i>Thunnus albacares</i> <i>Katsuwonus pelamis</i>
Rahman et al., 2005	Variación genética	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>
Rocha-Olivares y Chávez-González, 2008	Diferenciación de especies	<i>Coryphaena hippurus</i>

3.2 Estudios con marcadores genéticos en dorado.

La Tabla III presenta un resumen de los trabajos que se habían realizado con el dorado, dentro del ámbito de la genética bioquímica y molecular, al momento de iniciar esta tesis. Los estudios en este ámbito han abarcado las últimas dos décadas, y se han desarrollado en diversas escalas geográficas que van desde el nivel regional como el Mar Caribe y el Mar Mediterráneo, pasando por el nivel de las cuencas oceánicas más importantes como son la del Atlántico y la del Pacífico, hasta el nivel global.

Tabla III. Estudios realizados con marcadores genéticos en *Coryphaena hippurus*.

Autor	Marcador empleado	Objetivo	Resultados
Oxenford y Hunte, 1986	Aloenzimas	Determinar estructura genética en el Atlántico Central Occidental	Se sugieren dos stocks en la zona estudiada, uno en el norte y otro en el sur
Rosenblatt y Waples, 1986	Aloenzimas	Inferir estructura genética a escala global	Se encontró diferenciación genética despreciable entre Pacífico Oriental y Atlántico, así como entre Pacífico Oriental y Hawai
Herzig, 1990	Secuencia del gen para citocromo b	Identificar dorado en menús de restaurantes	Se observaron diferencias entre ejemplares capturados en Hawai y Taiwán
Reeb y Cann, 1996	Secuencia del gen para citocromo b	Detectar estructura genética a escala global	No se encontró estructura en 11 zonas alrededor del mundo
Cimmaruta <i>et al.</i> , 1998; citado por Rocha-Olivares <i>et al.</i> , 2006	Aloenzimas	Inferir estructura genética en el Mar Mediterráneo	Se encontró evidencia de dos subpoblaciones diferenciadas
Pla y Pujolar, 1999	Aloenzimas	Determinar estructura genética en el Mar Mediterráneo y el Atlántico Oriental	No se encontró evidencia de estructura genética en el área de estudio
Wingrove, R., 2000	PCR-RFLPs del locus ND-1	Detectar estructura genética en el Atlántico Occidental, incluyendo Golfo de México y Mar Caribe	No se encontró evidencia de estructura genética en el Atlántico occidental
Pujolar y Pla, 2002	Aloenzimas	Diferenciar entre <i>Coryphaena hippurus</i> y <i>C. equiselis</i>	Se logró diferenciar las especies
Chapman, datos no publicados; citado por CRFM, 2006	Cinco loci microsatelitales revelados mediante PCR	Inferir estructura genética en el Atlántico Occidental	Se sugirió la existencia de tres poblaciones: una en la zona oriental del Mar Caribe, otra en el sur de Florida y una tercera en la zona de Carolina y Bermuda
Rocha-Olivares <i>et al.</i> , 2006	PCR-RFLPs del locus ND-1	Determinar la estructura genética en Pacífico Central y Oriental	Se observó heterogeneidad genética en Baja California Sur, Sinaloa y Hawai
Díaz-Jaimes <i>et al.</i> , 2006	Secuencia del locus ND-1	Determinar la estructura genética en el Pacífico mexicano	Se encontró homogeneidad genética espacial y temporal, en el Pacífico Central Oriental (Baja California Sur, Sonora, Sinaloa y Chiapas)
Bobadilla-Jiménez, 2007	Cinco loci microsatelitales revelados mediante PCR	Determinar el grado de diferenciación genética de dorado a distintas escalas geográficas	La hipótesis de panmixia no pudo ser rechazada para el Pacífico mexicano y Hawai, aunque dentro del Pacífico mexicano sí se encontraron diferencias
Rocha-Olivares y Chávez-González, 2008	Haplotipos del gen para citocromo b, revelados mediante PCR multiplex	Diferenciación molecular de <i>Coryphaena hippurus</i> y <i>C. equiselis</i>	Diferenciación de las especies del género <i>Coryphaena</i>
Rosales, 2008	Polimorfismos en el intrón del gen para la hormona de crecimiento, y en un locus nuclear anónimo	Definir estructura genética del dorado en el Pacífico mexicano	Se sugieren dos stocks que podrían tener como zona de transición al Golfo de Tehuantepec

Los marcadores genéticos utilizados en estos estudios abarcan desde los de tipo bioquímico como las aloenzimas, que fueron los primeros utilizados en dorado, hasta varios de tipo molecular, tanto nucleares como mitocondriales, incluyendo PCR-RFLPs, polimorfismos en la longitud de intrones amplificados por PCR, microsátélites, y secuencias de varios loci. A continuación se presentará una breve reseña de estos trabajos.

3.2.1 Aloenzimas.

Se han realizado cinco estudios con aloenzimas, y excepto por uno que tuvo la finalidad de diferenciar especies, todos han abordado cuestiones de estructura genética. El primer estudio realizado en el Atlántico fue el de Oxenford y Hunte (1986), quienes analizaron estructura poblacional principalmente en el Atlántico Central Occidental. En este estudio se muestrearon 1 669 individuos, a los que se les analizaron 22 enzimas que codificaron 55 loci presuntivos. Los polimorfismos identificados condujeron a diferenciar dos poblaciones. En el Pacífico, el primer trabajo fue el de Rossenblat y Waples (1986), y en éste se analizó la estructura de 12 especies de peces transpacíficas (entre ellas el dorado) usando muestras del Pacífico Oriental (6) y Hawai (4), así como del Atlántico Occidental (15). Se estudiaron 24 sistemas de aloenzimas con un promedio de 35 loci presuntivos, y no se detectó estructura dentro de la Cuenca del Pacífico, ni entre cuencas oceánicas. En el Mediterráneo, Cimmaruta *et al.* (1998; citado por Rocha-Olivares *et al.*, 2006) encontraron evidencia de dos subpoblaciones diferenciadas.

Finalmente, se han publicado dos trabajos realizados en el área del Mar Mediterráneo por el mismo grupo de investigación. El primero (Pla y Pujolar, 1999) tuvo como finalidad determinar estructura genética, para lo cual se muestrearon 735 individuos y se analizaron mediante 30 loci presuntivos; se reportó una variabilidad genética moderadamente alta (ocho loci polimórficos) y una ausencia de diferencias entre localidades. El segundo trabajo (Pujolar y Pla, 2002) abordó la diferenciación de las dos especies del género *Coryphaena*. Analizando los mismos loci, se identificaron 11 aloenzimas que permitieron diferenciar las especies y que pueden ser usadas como marcadores genéticos.

3.2.2 ADN nuclear.

Todos los trabajos que han empleado marcadores genéticos basados en ADNn, han tenido como finalidad la determinación de estructura genética. Chapman (citado en CRFM, 2006) trabajó con cinco loci microsateles en la Cuenca del Atlántico. Encontró tres stocks: uno en el Caribe oriental, otro en el sur de Florida y un tercer

stock en el área de Carolina y Bermudas. Bobadilla-Jiménez (2007) también analizó cinco loci microsatelitales (*Chi02*, *Chi023*, *Chi08*, *Chi8A* y *Chi037*), probablemente los mismos del estudio anterior. En este caso se analizaron 412 organismos capturados en el Pacífico Central y Oriental; los loci fueron altamente variables al mostrar entre 12 y 33 alelos. La hipótesis de panmixia no pudo ser rechazada a nivel global, aunque se detectó diferenciación entre poblaciones del Pacífico mexicano. Rosales (2008) analizó 255 individuos colectados en Hawai y en el Pacífico mexicano, mediante dos tipos de marcadores: un tipo fue analizado mediante la técnica EPIC-PCR aplicada al gen de hormona de crecimiento, y el otro tipo consistió en las variantes de tamaño de un locus nuclear anónimo. En el gen de hormona de crecimiento se detectaron dos alelos, y en el locus anónimo cuatro. Estos polimorfismos sugirieron la existencia de al menos dos stocks en el Pacífico mexicano.

3.2.3 ADN mitocondrial.

Los marcadores genéticos de ADNmt que se han estudiado en dorado se han enfocado en dos genes: el gen para la subunidad 1 de la deshidrogenasa de NADH (*ND-1*), y el gen para el citocromo b (*cit-b*). A continuación se presentan los trabajos realizados con cada gen.

ND-1: Wingrove (2000) estudió estructura genética en el Atlántico Occidental, para lo cual amplificó un fragmento del ADNmt que contuvo a *ND-1* completo, y digirió el fragmento mediante cinco endonucleasas de restricción. Se generaron 43 haplotipos compuestos, los cuales se analizaron en 543 individuos. El estudio mostró una alta variabilidad genética en comparación con otros pelágicos, y reportó un único stock. Rocha-Olivares *et al.* (2006) estudiaron estructura genética en el Pacífico Central y Oriental, mediante la misma estrategia metodológica del trabajo anterior. Analizaron 157 individuos mediante las endonucleasas de restricción *Alu I*, *Hae III*, *Rsa I*, *ScrFI* y *Dpn II*, encontrando 38 sitios de restricción y 20 haplotipos compuestos. Esta variación reveló diferencias, sobre todo en escalas geográficas reducidas, encontrándose a las muestras de Baja California Sur y Mazatlán como las más diferenciadas. Díaz-Jaimes *et al.* (2006) analizaron variación espacial y temporal en el Pacífico Oriental, secuenciando un fragmento de *ND-1* de 752 pb. En este trabajo se analizaron 177 organismos que fueron colectados durante cuatro años consecutivos. Se encontraron 93 sitios variables que produjeron 87 haplotipos, y no se encontraron evidencias de diferenciación temporal ni espacial.

Cit-b: Se encontraron tres trabajos realizados con este gen, dos de ellos enfocados en marcaje genético y el tercero en la determinación de estructura poblacional. En

cuanto a los trabajos sobre marcaje, Herzig (1990) abordó la necesidad de monitorear filetes de pescado en restaurantes de Hawai para identificar si éstos pertenecían a dorado. Para este fin secuenció un fragmento pequeño del gen (201 pb), lo cual le permitió adicionalmente detectar diferencias entre ejemplares de Hawai y Taiwán. En el segundo trabajo sobre marcaje, Rocha-Olivares y Chávez-González (2008) desarrollaron oligonucleótidos para diferenciar, mediante PCR, a las especies del género *Coryphaena*. Ellos emplearon una variante de PCR llamada multiplex, en la cual la amplificación se lleva a cabo con una mezcla de reacción a la que se han adicionado, simultáneamente, varios oligonucleótidos. Esta estrategia les permitió desarrollar un test de diagnóstico, el cual genera un amplicón que sirve como control positivo, otro que es específico para *C. hippurus*, y un tercero que es específico para *C. equiselis*.

El tercer trabajo sobre análisis de *cit-b* en dorado se reportó en forma de un informe de proyecto, cuyo objetivo fue determinar estructura poblacional a nivel global (Reeb y Cann, 1996). Para este fin se muestrearon, entre 1991 y 1993, 200 organismos en 11 sitios alrededor del mundo. El análisis de 55 de estos ejemplares, mediante secuenciamiento de un fragmento pequeño del gen (270 pb), reveló 13 haplotipos pero no mostró evidencias de estructura genética.

4. Hipótesis.

El desarrollo de esta tesis estuvo sustentado en tres hipótesis principales:

- *Cit-b* es un gen cuyo nivel de variación ha permitido elucidar cuestiones de estructura genética en diversas especies de peces. En el caso del dorado, este gen ha sido secuenciado y se ha encontrado que es polimórfico y por lo tanto potencialmente útil para analizar estructura genética en la especie. Si se toman en cuenta estos hechos entonces el análisis de *cit-b* en dorado, mediante una técnica molecular como PCR-RFLP, debería revelar polimorfismos que permitan estudiar su estructura genética.
- El área de estudio abarcó una extensión amplia de la distribución mundial del dorado, incluyendo localidades tanto del Océano Pacífico como del Océano Atlántico. Si se considera este hecho, entonces los polimorfismos analizados permitirían detectar estructura genética dentro del área estudiada, al menos entre sus extremos geográficos, es decir entre cuencas oceánicas.
- Los RFLPs de *cit-b* son marcadores moleculares que evolucionan a una velocidad comparativamente lenta, y al encontrarse en el genoma mitocondrial constituyen linajes que se heredan vía materna. Si se consideran estas propiedades de los marcadores empleados, así como la extensión del área estudiada, entonces el análisis filogeográfico de los resultados de esta tesis permitiría inferir posibles escenarios de la evolución del dorado.

5. Objetivos.

5.1 Objetivo general.

Determinar la estructura genética de *Coryphaena hippurus* en una escala global mediante el análisis de linajes mitocondriales, y analizar esta información mediante un enfoque filogeográfico para inferir posibles escenarios evolutivos de la especie.

5.2 Objetivos particulares.

- Diseñar iniciadores para amplificar mediante PCR el locus *cit-b* del dorado.
- Revelar la variación en los productos de amplificación de *cit-b* mediante digestión con cuatro endonucleasas de restricción, con el fin de caracterizar los linajes del gen.
- Analizar la distribución de los linajes detectados para inferir la estructura genética del dorado en una escala global, con énfasis en la zona del Pacífico Central y Oriental.
- Evaluar la información anterior mediante un enfoque filogeográfico, para inferir posibles escenarios evolutivos del dorado.

6. Materiales y métodos.

6.1 Área de estudio.

El área de estudio analizó dos escalas geográficas, la primera un estudio global, ya que abarca el análisis de las principales cuencas marinas; y la segunda escala se realizó específicamente dentro de la Cuenca del Pacífico.

6.1.1 Cuencas del Océano Atlántico y Pacífico.

Las corrientes oceánicas son flujos organizados que persisten en regiones y en algunos periodos de tiempo, en las cuales el agua es transportada de una parte del océano a otra. El flujo del agua marina es dominado por cinco grandes giros, los cuales ocurren en el Atlántico Sur y Norte, Pacífico Norte y Sur, y Océano Índico (Figura 4). En el hemisferio norte, el flujo de los giros es en el sentido de las manecillas del reloj, mientras que en el hemisferio sur es en el sentido opuesto. Las contracorrientes fluyen hacia el este, moviéndose en el ecuador entre estos giros.

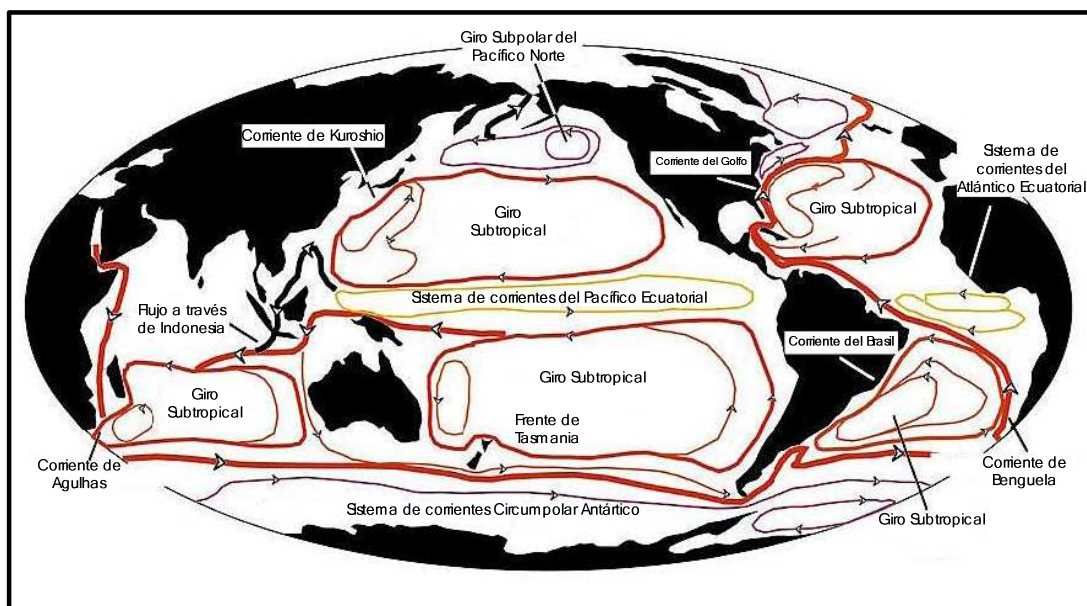


Figura 4. Principales giros oceánicos en el mundo (Tomado de Norris, 2000).

Según Kershaw y Cundy (2000), las principales características de los giros oceánicos son:

- Los giros transportan aguas cálidas de latitudes bajas hacia los polos en las orillas occidentales de las cuencas oceánicas, y agua fría de latitudes altas hacia el ecuador en las orillas orientales de las cuencas oceánicas.
- El flujo de las corrientes en los giros no es uniforme, éste es más fuerte en los segmentos occidentales que en los orientales.
- La falta de barreras terrestres en las aguas meridionales permite la Corriente Circumpolar Antártica, que rodea el Continente Antártico.

Otro factor oceánico que muchas veces actúa como barrera para la dispersión de organismos marinos es la temperatura del agua. La Figura 5 presenta las temperaturas superficiales promedio del mar en una escala global.

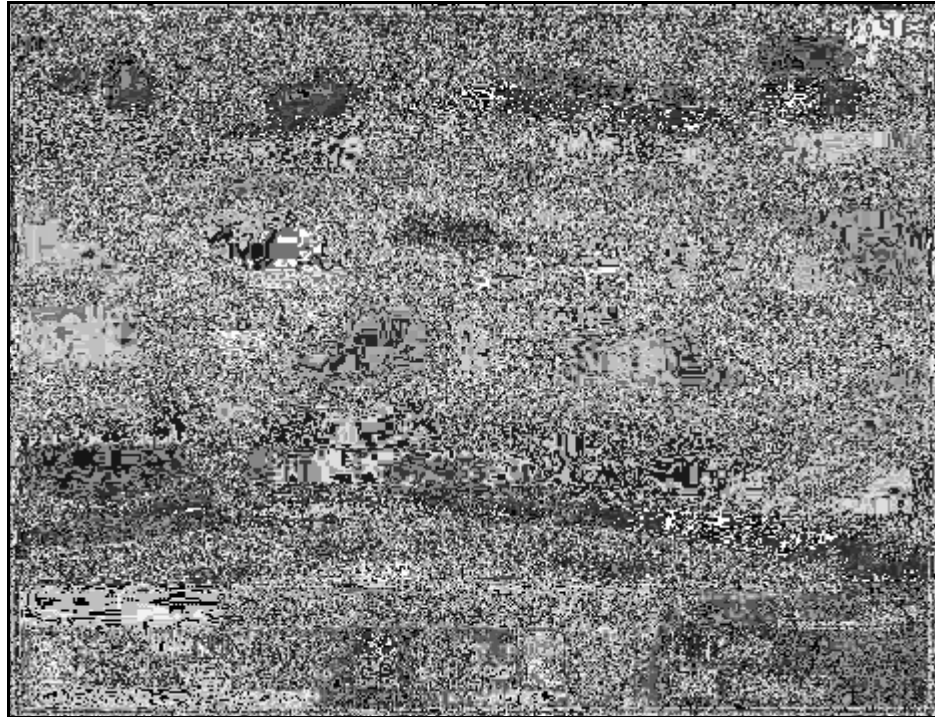


Figura 5. Mapa de isotermas medias anuales (Tomado de Castaño-Fernández y Castaño-Fernández, 2008).

6.1.2 Pacífico Oriental y Central.

El área de estudio para esta escala geográfica se encuentra comprendida dentro del área estadística 77 definida por la FAO, la cual abarca el Pacífico Central y una gran parte del Pacífico Oriental (Figura 6) (Csirke y Tanstad, 2003).

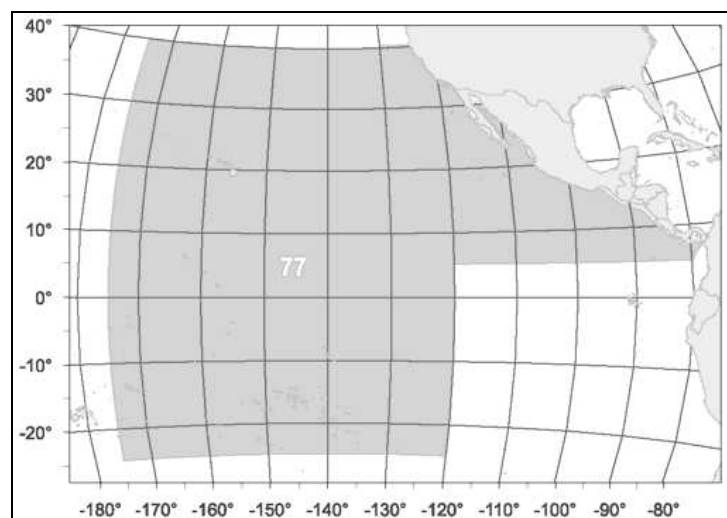


Figura 6. Área estadística 77 de la FAO (Tomado de Csirke y Tanstad, 2003).

Las características de esta zona incluyen una plataforma bastante escarpada, la cual se extiende apenas 20 km más allá de la línea costera, excepto para algunas áreas de la Bahía de San Francisco, El Salvador, Nicaragua y el Golfo de Panamá donde la amplitud es de 60 km. El fondo tiende a ser heterogéneo, con varias áreas adecuadas para arrastres. Hay unas pocas islas pequeñas en el sur de California y Panamá y otros grupos de islas en aguas oceánicas. Estas cadenas de islas, de las cuáles la más grande es Hawai, también tienen plataformas continentales estrechas. El área es influenciada por dos principales sistemas de corrientes superficiales. En el norte la corriente de California, que se extiende desde el norte de California hasta Baja California (Parrish *et al.*, 1983); y en el sur el gran sistema de corrientes superficiales ecuatoriales transpacífico, el cual comprende las Corrientes Ecuatoriales Norte y Sur que fluyen hacia el oeste, y en la región entre ellas la Contracorriente Ecuatorial fluyendo hacia el este (Figura 7) (Bakun *et al.*, 1999). La interacción entre estas corrientes, la topografía y las diferencias en la fuerza del viento generan las principales surgencias en esta zona (Csirke y Tanstad, 2003). Entre las surgencias que ocurren en el Pacífico Oriental, una mención especial merece el Golfo de Tehuantepec, que es una región delimitada al norte por la costa mexicana, al este por el meridiano de los 92° W y al oeste por el meridiano de los 97° W, y cuyo radio es de aproximadamente 200 km. Se le considera una de las tres zonas centroamericanas del Pacífico con altos niveles de productividad primaria, debido a condiciones orográficas que permiten la acción pronunciada de vientos

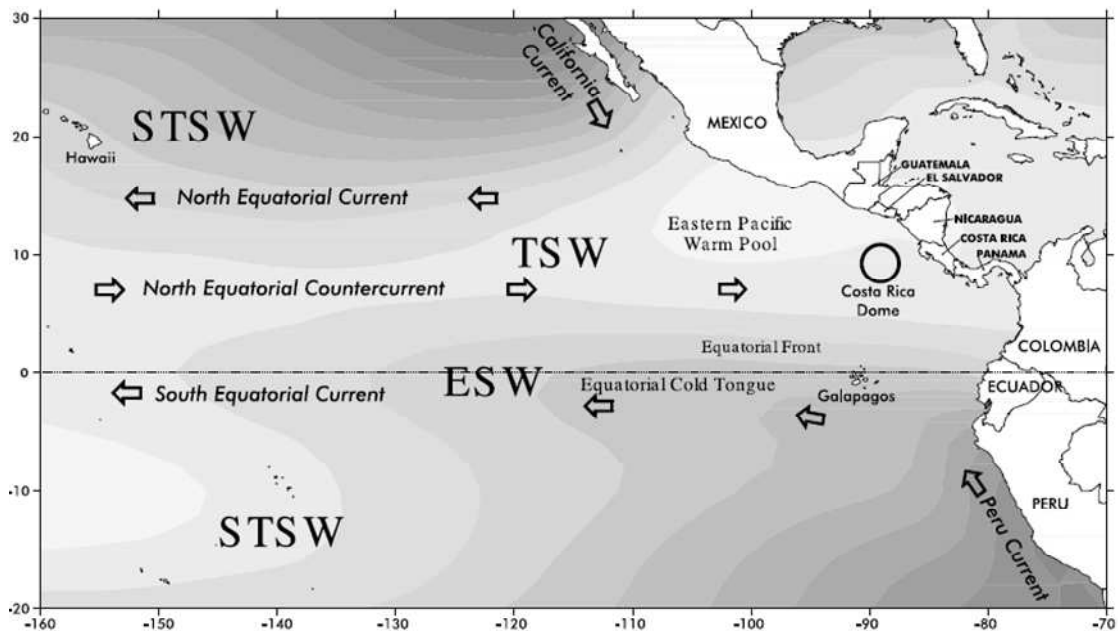


Figura 7. Diagrama de masas de agua superficiales y corrientes en el Océano Pacífico Tropical. STSW, Agua superficial subtropical; TSW, Agua superficial tropical; ESW, Agua superficial ecuatorial. El sombreado representa la temperatura superficial media del mar (más oscuro = agua más fría) (Shea *et al.*, 1992, en Fiedler y Talley, 2006).

invernales intensos producidos por el gradiente de presión atmosférica que se establece entre la zona del Golfo de México y Centroamérica, y que genera importantes procesos de surgencias y mezcla vertical (Ortega-García *et al.*, 2000). Los límites de la zona tropical de interés para este trabajo se localizan en dos zonas de mezcla de aguas de origen ecuatorial y templado, que colindan al norte con la Corriente de California y al sur, con la corriente del Perú (prolongación de la Corriente de Humboldt). El impacto de estas dos corrientes frías, así como la intensidad de la Contracorriente Norecuatorial, varían según el período del año (Figuras 8 y 9) (FAO, 1995).

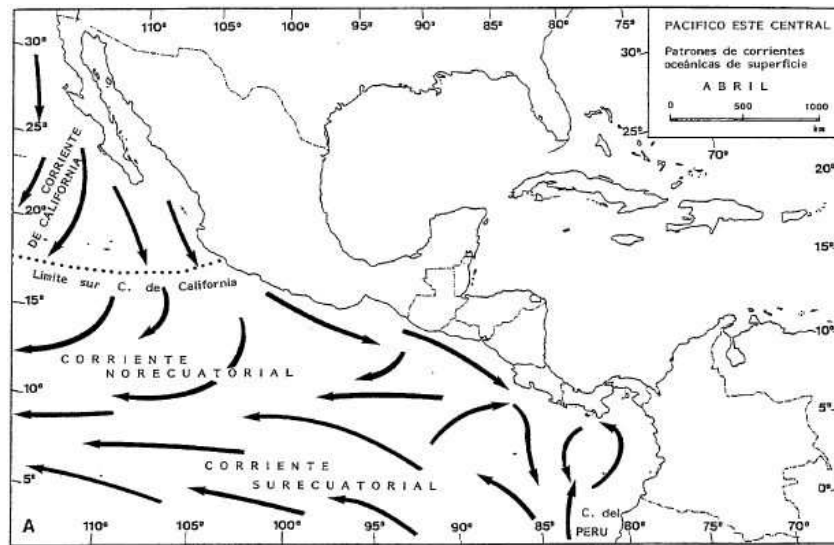


Figura 8. Patrones de corrientes en el Pacífico Oriental Central en abril (FAO, 1995).

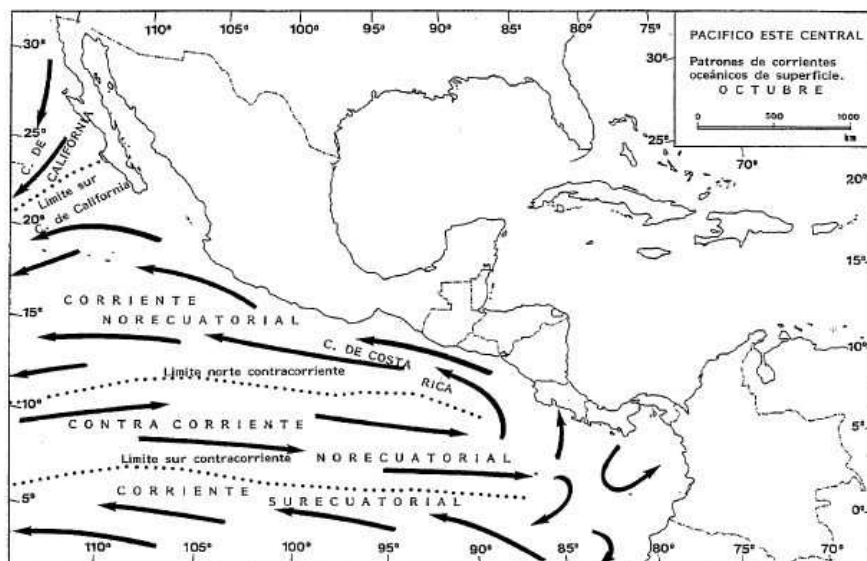


Figura 9. Patrones de corrientes en el Pacífico Oriental Central en octubre (FAO, 1995).

6.2 Muestras.

Los datos moleculares que se analizaron en este estudio provinieron ya sea del procesamiento de muestras biológicas, o de secuencias nucleotídicas disponibles en la base de datos GenBank. Los sitios de colecta para cada caso se muestran en la Figura 10.



Figura 10. Cobertura geográfica del estudio.

En el caso de las secuencias, se usaron todas las que estuvieron disponibles al momento de analizar los datos moleculares (Tabla IV). Las muestras biológicas se colectaron en sitios de desembarque pesquero del Océano Pacífico, y consistieron en tejidos de músculo o aleta (Tabla V).

Tabla IV. Origen geográfico y claves de registro de las secuencias obtenidas del Genbank.

Lugar de origen	Clave
Mar Mediterráneo	EF439512, EF439513, DQ080245
Islas Canarias, España	DQ197936
Archipiélago de Madeira, Portugal	EF439196
Florida, USA	AY050762, AY050761
Taiwán, China	AM265579

Tabla V. Número de muestras biológicas colectadas por localidad.

Localidad	No. de muestras
Puerto Chiapas, Chiapas	34
Salina Cruz, Oaxaca	22
Santa Cruz Huatulco, Oaxaca	11
Puerto Ángel, Oaxaca	23
Puerto Escondido, Oaxaca	40
Mazatlán, Sinaloa	9
Los Cabos, Baja California Sur	15
La Paz, Baja California Sur	11
Hawai	21
Total	186

Las muestras de Oaxaca y Chiapas fueron colectadas de enero de 2004 a agosto de 2005; las de Sinaloa y Baja California de enero de 2003 a agosto de 2004, y las de

Hawai en 2004. Las muestras de Sinaloa, Baja California y Hawai fueron obtenidas como un donativo del Dr. Axayácatl Rocha, del CICESE. Al momento de la colecta, las muestras se preservaron en alcohol al 75% y se mantuvieron en refrigeración hasta su análisis.

6.3 Diseño de iniciadores.

Una secuencia parcial de *cit-b* de dorado, con un tamaño de 1140 nucleótidos (Reed *et al.*, 2002), se analizó con el software Fast PCR (Kalendar, 2006). La lista de iniciadores de tipo directo y reverso que se generó, fue analizada para elegir aquellos que mostraron las estimaciones de eficiencia de amplificación más altas, y que además producirían los amplicones con tamaño más grande. Los iniciadores seleccionados se mandaron a sintetizar al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

6.4 Extracción de ADN.

Un fragmento de aproximadamente 0.5 g de tejido muscular o aleta, se sometió a tres enjuagues de 15 min con agua destilada para eliminar el exceso de alcohol. El tejido lavado se maceró con tierra de diatomita (aproximadamente 0.15 g) y 100 μ L de TNES-Urea (Asahida *et al.*, 1996). Al macerado se le agregó 700 μ L del mismo amortiguador para posteriormente incubar a 48 °C por 15 min. Enseguida se centrifugó por 10 min a 23 183 x g, el sobrenadante se recuperó y la extracción se continuó con acetato de potasio y cloroformo, siguiendo el protocolo de Dellaporta *et al.* (1983).

6.5 Amplificación de ADN.

La amplificación se llevó a cabo empleando los iniciadores diseñados previamente. Se emplearon volúmenes de reacción de 20 μ L, conteniendo $MgCl_2$ 1.75 mM, dNTPs 0.1 mM, iniciadores 0.2 μ M, 0.6 U de polimerasa Taq (REDTaq de Sigma-Aldrich), y aproximadamente 20 ng de ADN, en amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0). El perfil de temperaturas consistió de 1 min a 95 °C; 35 ciclos de 1 min a 95.0 °C, 1 min a 70 °C, 2 min a 72 °C; y 5 min a 72 °C (Kolmodin y Birch, 2002; Kalendar, 2006) en un termociclador (Thermo Electron Corporation, modelo PxE 0.2.).

6.6 Digestión del ADN con enzimas de restricción.

En el caso de los fragmentos amplificados, la digestión del ADN se realizó empleando endonucleasas (Promega Corporation) de acuerdo a los protocolos del

fabricante. Las enzimas probadas fueron *Alu I*, *Dde I*, *Alw26 I* y *Hha I* (claves de catálogo R6281, R6291, R6761, R6441). En el caso de las secuencias de *cit-b*, los sitios de reconocimiento y de corte para cada enzima fueron detectados con la opción de búsqueda del editor de texto Word 2003.

6.7 Electroforesis y visualización de ADN.

Las separaciones electroforéticas se realizaron en dos tipos de matrices, agarosa y poliacrilamida. La agarosa fue empleada para verificar la calidad de los extractos de ADN, y el éxito de las amplificaciones. En estos casos, la electroforesis se efectuó en geles al 1% en un sistema continuo de TBE (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, bromuro de etidio 0.05 mg/ml, pH 8.3). El tiempo de corrida fue de 1 h a 100 V y la visualización se realizó mediante irradiación con luz ultravioleta (302 nm) en un transiluminador (GIBCO BRL, modelo TFX-20M).

La poliacrilamida se empleó para evaluar el polimorfismo del locus de citocromo *b* mediante el patrón de fragmentos de restricción de cada enzima. En este caso se usaron geles desnaturizantes al 4,8%, con tiempos de separación de 2.5 a 4 h. La visualización fue mediante tinción con nitrato de plata (Creste *et al.*, 2001).

Los patrones de bandeo se capturaron con cámara digital (Canon-EOS 20D).

6.8 Estimación del tamaño de bandas.

La estimación de tamaños se realizó mediante análisis de regresión lineal simple, al comparar las bandas de interés con estándares de tamaño. En geles de agarosa se usó un estandar de 1 Kb (GIBCO BRL, clave 10381-010), mientras que para los geles desnaturizantes de poliacrilamida se utilizaron dos: uno de 20 pb (Sigma, clave D 7808) y uno de 100 pb (Sigma, clave D 7808).

6.9 Análisis estadísticos.

Los datos moleculares fueron analizados agrupándolos en formas diferentes; los nombres de algunos grupos indican claramente el origen geográfico de los datos, como es el caso de los grupos Cuenca del Pacífico y Cuenca del Atlántico. La composición de los demás grupos se indica en la Tabla VI.

Tabla VI. Grupos de datos usados en los análisis estadísticos.

Nombre del grupo	Localidades incluidas
Sur del Pacífico mexicano	Puerto Chiapas, Salina Cruz
Puerto Ángel	Puerto Escondido, Puerto Ángel, Santa Cruz Huatulco
Norte del Pacífico mexicano	La Paz, Los Cabos, Mazatlán

6.9.1 Determinación de haplotipos compuestos.

El ADN de cada individuo fue digerido mediante las cuatro enzimas de restricción seleccionadas. El conjunto de polimorfismos revelado mediante estas enzimas, en un individuo particular, es llamado el haplotipo compuesto de ese individuo. Este haplotipo es representado mediante una secuencia de dígitos, cada uno con valor de cero o uno, los cuales representan ausencia o presencia, respectivamente, de sitios de restricción. Las frecuencias de estos haplotipos fueron la base de los análisis estadísticos subsecuentes.

6.9.2 Análisis de diversidad genética.

El programa REAP versión 4.0 (McElroy *et al.*, 1992) fue usado para calcular la diversidad haplotípica (\hat{h}), la diversidad nucleotídica (π) y la divergencia nucleotídica (\hat{d}). A continuación se presentan las definiciones de estos parámetros, y las fórmulas que se emplearon para estimarlos.

6.9.2.1 Diversidad haplotípica.

La diversidad haplotípica (\hat{h}) se puede definir como la probabilidad de que dos individuos escogidos al azar dentro de una población sean diferentes. En una población diploide que se aparee al azar esta probabilidad es equivalente a la heterocigosidad, y puede ser definida en término de frecuencia de genes. Esta medida puede ser usada para cualquier tipo de organismo, no importando si es haploide, diploide o poliploide. También puede ser usada para cualquier tipo de sistema reproductivo (Nei, 1987). Para el caso de genes mitocondriales, esta medida de variabilidad genética puede ser calculada mediante la fórmula que sigue

$$\hat{h} = n(1 - \sum_{i=1}^{i=l} x_i^2) / (n-1)$$

donde x_i es la frecuencia del i ésimo haplotipo en un locus dado, l es el número de haplotipos en el locus, y n es el número de individuos analizados.

6.9.2.2 Diversidad nucleotídica.

La diversidad nucleotídica (π) se define como la proporción de diferencias nucleotídicas entre dos haplotipos escogidos al azar (Nei y Tajima, 1981). Para casos como el de esta tesis, donde no se conoce la secuencia nucleotídica completa

de los haplotipos, sino que estos están definidos por sus patrones de restricción, es decir como haplotipos compuestos, la estimación de este parámetro se realiza según la fórmula

$$\hat{\pi} = \frac{n}{n-1} \sum_{\substack{i=1 \\ j=1}}^{\substack{i=l \\ j=l}} \hat{x}_i \hat{x}_j \pi_{ij}$$

donde l es el número de haplotipos compuestos en un locus dado, $\hat{x}_i \hat{x}_j$ representa el producto de las frecuencias haplotípicas para cada posible par de haplotipos, y π_{ij} es el valor absoluto de la diferencia en el número de sitios de restricción para cada posible par de haplotipos.

6.9.2.3 Divergencia nucleotídica entre poblaciones.

Para un locus dado, la divergencia nucleotídica entre dos poblaciones (\hat{d}) se define como el promedio de sustituciones netas por cada sitio nucleotídico del locus (Nei y Li, 1989). En esta tesis, las sustituciones nucleotídicas fueron detectadas en la forma de diferencias en patrones de restricción. Para este tipo particular de datos moleculares, la divergencia nucleotídica puede ser medida por la siguiente fórmula (Nei y Li, 1989)

$$\hat{d} = \hat{\pi}_{XY} - (\hat{\pi}_X + \hat{\pi}_Y) / 2$$

donde $\hat{\pi}_X$ y $\hat{\pi}_Y$ son los valores de $\hat{\pi}$ para las poblaciones que están siendo comparadas, designadas como poblaciones X y Y , respectivamente; y $\hat{\pi}_{XY}$ es el promedio de las diferencias en sitios de restricción entre dos haplotipos elegidos al azar, uno en la población X y el otro en la población Y .

6.9.3 Análisis de estructura poblacional.

6.9.3.1 Análisis de varianza molecular.

El análisis de varianza molecular (AMOVA) fue desarrollado por Excoffier *et al.* (1992) y estima índices de estructura genética usando información sobre la diversidad de haplotipos, así como sobre las frecuencias de esos haplotipos. En este estudio el AMOVA fue computado por un software especializado en genética de poblaciones, Arlequin versión 3.1 (Excoffier *et al.*, 2006). El programa procesa los datos para generar una matriz de cuadrados de distancias euclidianas, mediante la cual se cuantifica la fuente de varianza en los datos en tres niveles jerárquicos:

- i) Diferencias dentro de una población (σ_c^2).

ii) Diferencias entre poblaciones dentro de un grupo (σ_b^2).

iii) Diferencias entre grupos (σ_a^2).

La varianza molecular total (σ_T^2) es la suma de las tres covarianzas anteriores. La significancia de estas covarianzas es evaluada usando procedimientos no paramétricos de permutaciones. Para evaluar la existencia de estructura genética, los datos se agruparon de manera que pudieran compararse diferentes escalas geográficas.

6.9.3.2 Índices de fijación.

Estos índices representan otra forma de cuantificar el grado de diferenciación entre poblaciones. Fueron originalmente definidos por Wright (1951, 1965) en términos de coeficientes de endogamia, y más tarde por Slatkin (1991) con base en tiempos de coalescencia. Para calcularlos, los componentes de la covarianza descritos en la sección anterior son sustituidos en las ecuaciones siguientes

$$\phi_{CT} = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_T^2} \quad \phi_{SC} = \frac{\sigma_b^2}{\sigma_b^2 + \sigma_c^2} \quad \phi_{ST} = \frac{\sigma_a^2 + \sigma_b^2}{\sigma_T^2}$$

donde ϕ_{CT} , ϕ_{SC} y ϕ_{ST} son análogos de los estadísticos F para tres niveles jerárquicos: dentro de una población, entre poblaciones dentro de un grupo, y entre grupos, respectivamente (Excoffier *et al.*, 1992).

El programa calcula la significancia de los índices mediante un enfoque no paramétrico, que consiste en permutar los datos para recomputar los estadísticos y obtener su distribución nula (Excoffier *et al.*, 2006).

6.9.3.3 Red de expansión mínima.

La construcción de una red de expansión mínima es un problema clásico de optimización combinatoria; la teoría matemática subyacente ha sido descrita por López (2004). El primer ejemplo de construcción de una red de expansión mínima fue formulado por Boruvka (1926), quien lo planteó para resolver el problema de hallar la forma más económica de distribuir energía eléctrica en el sur de Moravia. La formulación de este problema ha sido útil para realizar muchas investigaciones en diversos campos como transporte, electrónica, telecomunicaciones e investigación de operaciones.

El objetivo de este problema es diseñar una red que conecte a un grupo de nodos, en la cual cada conexión tiene un costo que puede estar expresado en tiempo, dinero u otra medida. Lo que se busca es ir asignando conexiones entre nodos, de

manera que todos los nodos estén conectados y no existan caminos que inicien y terminen en el mismo nodo, es decir que no haya ciclos. Debido a estos criterios, la red generada es llamada “de expansión”; el término “mínima” se le asigna porque se busca minimizar la suma total de los costos de las conexiones.

En el ámbito de esta tesis, la construcción de una red de expansión mínima tuvo el fin de mostrar escenarios evolutivos probables. Los nodos representaron los haplotipos compuestos, y la distancia entre cada par de haplotipos representó el número de sitios de restricción que los diferenciaban. Es decir que estos árboles representaron escenarios evolutivos de máxima parsimonia. La interpretación de los árboles estuvo basada en las predicciones de la teoría de la coalescencia (Posada y Crandall, 2001), la cual describe una muestra de un gen o genes selectivamente neutrales mirando hacia atrás en el tiempo. Partiendo del supuesto de que existe una relación directa entre las frecuencias de los haplotipos y sus edades, la teoría de la coalescencia predice varias cuestiones sobre la estructura de un árbol:

- 1 Los haplotipos más ancestrales tendrán una probabilidad mayor de aparecer en posiciones centrales del árbol, es decir que presentarán un mayor número de conexiones mutacionales.
- 2 En promedio, los haplotipos más viejos tendrán una distribución geográfica más amplia.
- 3 Los haplotipos únicos aparecerán conectados con mayor probabilidad a haplotipos no únicos, que a otros haplotipos únicos.
- 4 Los haplotipos únicos aparecerán con mayor probabilidad en las posiciones más externas del árbol.

La construcción de las redes se llevó a cabo mediante el programa Network versión 4.5.1.6 (Fluxus Technology Ltd.).

6.9.3.4 Filogramas.

Los filogramas son diagramas que muestran las relaciones evolutivas entre grupos de organismos. Un filograma está compuesto por líneas llamadas ramas que se intersectan y terminan en nodos. Los nodos en las puntas de las ramas representan los grupos de organismos que están siendo comparados, los cuales pueden ser poblaciones, especies o taxones superiores; los nodos internos representan taxones ancestrales. Los filogramas pueden construirse tomando en cuenta las distancias genéticas entre los grupos analizados, mediante algoritmos de agrupamiento tales como el método de agrupamiento no ponderado por pares utilizando la media aritmética (UPGMA, por sus siglas en inglés) o el método de unión al vecino más

cercano (Neighbor-Joining, por su nombre en inglés). Las distancias genéticas quedan representadas por las longitudes de las ramas del filograma.

En este trabajo se construyeron filogramas con base en los dos algoritmos mencionados, mediante el programa MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2008).

7. Resultados y discusiones.

7.1 Extracción de ADN.

Lo ideal en un proceso de extracción de ADN es obtenerlo en cantidad y pureza suficientes, y lo menos degradado o fragmentado posible. En la Figura 11 se muestra un lote de extractos que fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa, con el fin de evaluar su calidad.

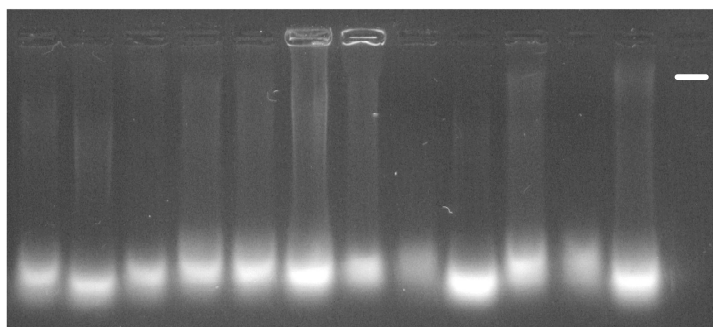


Figura 11. Extractos de ADN obtenidos a partir de tejido muscular y de aleta. La barra indica la región en la que se observaron algunos restos de ADN genómico.

La mayoría de los extractos fueron obtenidos de tejido muscular, y unos cuantos de aleta. En general, las 186 muestras que se procesaron dieron lugar a extractos cuyo ADN nuclear apareció fuertemente fragmentado, lo cual podría reducir la eficiencia de las amplificaciones subsiguientes. No obstante, el interés en esta tesis se centró en la amplificación de un gen mitocondrial y esto permitiría, teóricamente, el uso de extractos cuyo ADN nuclear no se encuentre bien conservado. Esto se debe a que el genoma mitocondrial es relativamente pequeño y está presente en múltiples copias por célula (Hartl y Clark, 1997; Zhang y Hewitt, 2003).

7.2 Diseño de iniciadores.

La Tabla VII muestra los iniciadores con estimaciones más altas para la eficiencia de amplificación. Las dos combinaciones posibles de estos iniciadores, F1-R1 y F1-R2, producirían los amplicones con mayor tamaño estimado (1067 y 1070 pb, respectivamente).

Tabla VII. Iniciadores seleccionados para la amplificación.

Iniciador	Secuencias	Eficiencia de amplificación
F1	tccacacccatctaacatctcggcctgatg	128
R1	aggccatgtttctagtcagccagctagtg	117
R2	tgaaggccatgtttctagtcagccagc	133

La síntesis de los iniciadores seleccionados fue encargada al Instituto de Biotecnología de la UNAM, y su utilidad para amplificar los fragmentos deseados se muestra en la Figura 12.

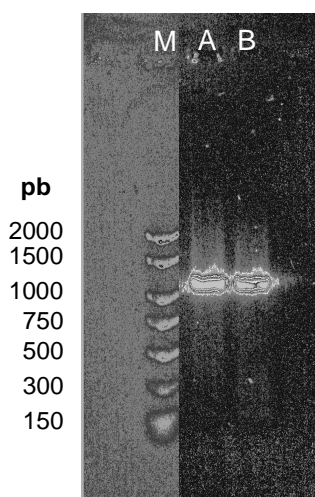


Figura 12. Amplificación de una muestra de ADN de dorado, con los pares de iniciadores F1-R1 (A) y F1-R2 (B). El carril M contiene marcadores de tamaño.

Ambos pares de iniciadores generaron amplificaciones muy específicas, produciéndose una sola banda intensa con tamaño de aproximadamente 1067 pb (Figura 12). Este tamaño concuerda con los tamaños que se esperaban para los dos pares de iniciadores (ver anexo). La eficiencia de la amplificación, evaluada como la intensidad de la banda, fue similar para ambos pares de iniciadores aunque ligeramente mayor para el par F1-R1. En virtud de que el tamaño de ambos amplicones es prácticamente el mismo, y de la mayor eficiencia de amplificación detectada para el par F1-R1, este fue elegido para los análisis subsecuentes.

7.3 Amplificación de ADN.

La Figura 13 presenta un gel de agarosa con una muestra representativa de las amplificaciones realizadas. La mayoría de los extractos produjeron una amplificación eficiente, ya que la tinción con bromuro de etidio fue intensa. También hubo un porcentaje de extractos menor, pero importante, que no amplificó o que dio una amplificación poco eficiente.

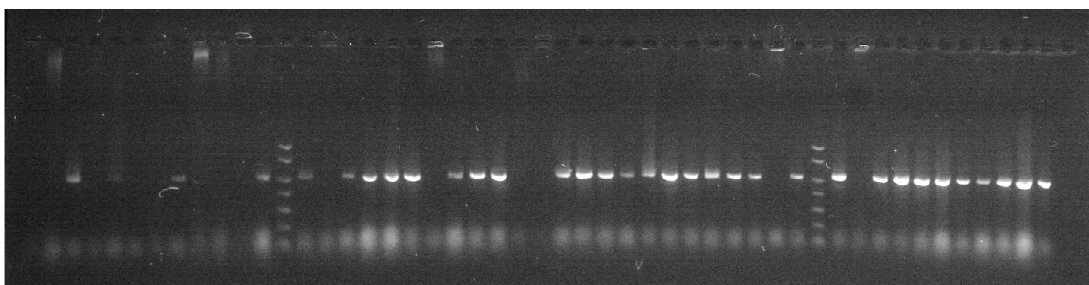


Figura 13. Amplicones generados con el par de iniciadores F1-R1.

Del total de 186 extractos, 165 fueron sometidos a PCR por ser los extractos en mejores condiciones, 136 dieron amplificación detectable y fueron la base de los análisis subsiguientes (Tabla VIII). Este porcentaje de amplificación relativamente bajo (75%) pudo deberse a que la calidad de los extractos no era adecuada.

Tabla VIII. Número de muestras amplificadas por localidad.

Localidad	No. de muestras
Puerto Chiapas, Chiapas	28
Salina Cruz, Oaxaca	16
Santa Cruz Huatulco, Oaxaca	10
Puerto Ángel, Oaxaca	20
Puerto Escondido, Oaxaca	16
Mazatlán, Sinaloa	8
Los Cabos, Baja California Sur	11
La Paz, Baja California Sur	6
Hawai	21
Total	136

7.4 Caracterización de la variación.

Los patrones de restricción que se obtuvieron mediante la digestión de los fragmentos amplificados se ejemplifica en la Figura 14. *Hha* I no mostró sitios de corte, por lo cual fue excluida de los análisis subsecuentes. *Alw26* I generó cinco sitios de restricción, de los cuales cuatro fueron polimórficos. *Alu* I produjo cinco sitios de corte, de los cuales cuatro fueron polimórficos. *Dde* I originó seis sitios de restricción, dos de los cuales fueron polimórficos. Los patrones de restricción que fueron detectados en las secuencias del GenBank se presentan en el anexo. Los mapas de restricción inferidos a partir de estos datos se muestran en la Figura 15. En esta se observa que los sitios de corte, tanto los monomórficos como los polimórficos, se distribuyeron a lo largo del locus analizado permitiendo una cobertura amplia del mismo.

El número total de bases analizadas mediante *Alu* I, *Dde* I y *Alw26* I fue de 69, distribuidas en 16 sitios de restricción. Esto representa un 6.5% de las bases del locus amplificado, cuyo tamaño es de 1067 pb. Tomando en cuenta que estas enzimas revelaron 10 sitios de restricción polimórficos, y que en cada uno de estos sitios debe existir al menos una mutación, se deduce que al menos el 14.5% de los nucleótidos del locus fueron polimórficos. El secuenciamiento del ADN es la técnica molecular más eficiente para revelar polimorfismos nucleotídicos; sin embargo, la técnica de PCR-RFLPs también ha sido usada con éxito para estudiar tasas de

sustitución nucleotídica, evolución y estructura genética de poblaciones (Nei y Tarima, 1981).

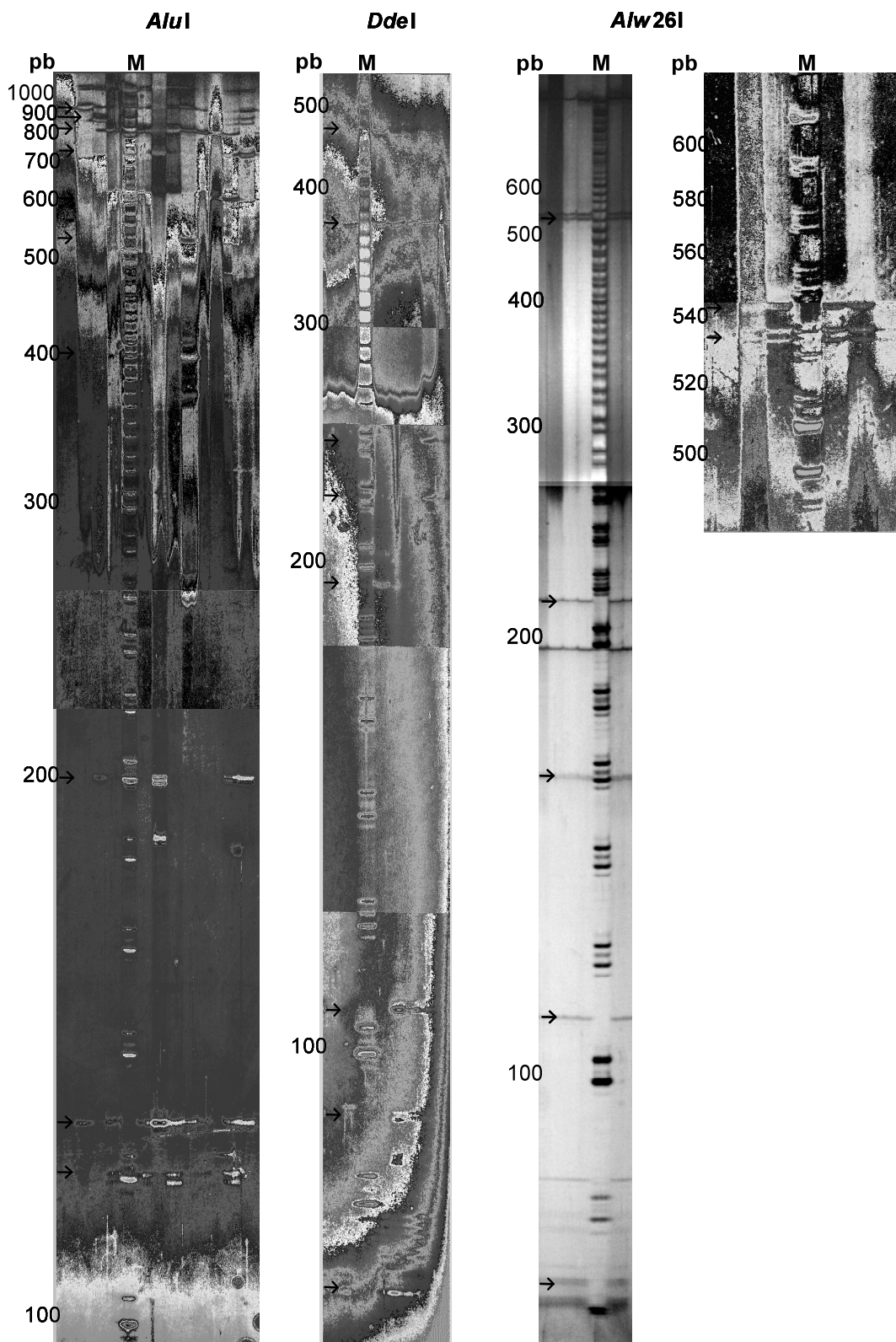
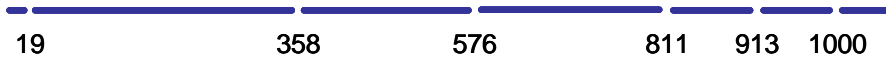


Figura 14. Patrones de bandeo observados en geles de poliacrilamida, con las tres enzimas de restricción que generaron polimorfismos. Las flechas señalan fragmentos polimórficos. Los carriles marcados con "M" contienen marcadores de tamaño.

Alu I: AGCT



Dde I: CTNAG



Alw26 I: GTCTCN ó NNNNNGAGAC



Todas



Figura 15. Mapas de restricción para las enzimas que revelaron polimorfismos. Para cada enzima se indica la secuencia de reconocimiento y el sitio de corte (bases subrayadas). Los números señalan la posición (pb) de los sitios de corte. Las letras señalan los sitios de corte polimórficos.

La cantidad de *Alw26 I* que estuvo disponible limitó el número de muestras analizadas para las diferentes localidades de colecta. Estos números quedaron como sigue: La Paz, 6; Los Cabos, 9; Mazatlán, 7; Puerto Ángel, 5; Salina Cruz, 16; Puerto Chiapas, 27; Hawai, 11. Los haplotipos detectados en estas muestras, así como en las secuencias nucleotídicas, se presentan en la Tabla IX.

Si se toma en cuenta el número de bases reconocidas por cada enzima de restricción (Figura 15), y el número de sitios de restricción por individuo (monomórficos en Figura 15, polimórficos en Tabla IX), se deduce que los promedios para el número de bases analizadas, y para el número mínimo de polimorfismos, son de 41.9 y 5.1, respectivamente. Esto corresponde a un promedio mínimo de sitios polimórficos equivalente a 14.6%. Esta cifra refleja el nivel de variación de *cit-b* en dorado, siendo mayor que lo reportado para secuencias de *cit-b* de otras especies de peces marinos. Por ejemplo, Lecomte *et al.* (2004) reportaron porcentajes de 7.53 y 9.83 para *Sardinops sagax* y *Engraulis mordax*, respectivamente; Árnason *et al.* (2004) de 9.6 para *Gadus morhua*; Daemen *et al.* (2001) de 11.2 para *Anguilla anguilla*; y Chen *et al.* (2009) de 12.2 para *Engraulis japonicus*. El polimorfismo alto calculado para *cit-b* en dorado no implica que en esta especie existan poblaciones diferenciadas, pero este escenario sí sería compatible con el alto valor estimado.

Un punto de comparación obligado para los resultados de la Tabla IX es el reporte

de Reeb y Cann (1996), quienes estudiaron la estructura genética del dorado en una escala global mediante secuenciamiento de un fragmento de *cit-b*. Los resultados de estas autoras son similares en varios aspectos a los que se muestran en la Tabla IX:

- **Tamaño de muestra y cobertura geográfica.**

Ambos trabajos analizaron varias decenas de ejemplares colectados en varios sitios alrededor del mundo.

- **Polimorfismo observado.**

Las autoras citadas detectaron 13 haplotipos, apenas uno menos que en esta tesis.

- **Frecuencias de los haplotipos.**

Las autoras mencionadas reportaron haber detectado un haplotipo predominante, el cual apareció distribuido alrededor del mundo; sus demás haplotipos fueron descritos como raros. En esta tesis también se encontró un haplotipo predominante (Ch8) que apareció en ambas cuencas oceánicas; excepto por otro haplotipo abundante (Ch1), los demás fueron raros o inclusive únicos.

A pesar de las similitudes descritas, Reeb y Cann (1996) no detectaron estructura genética mientras que la Tabla IX sí muestra algunas evidencias de diferenciación entre poblaciones; dichas evidencias se discuten en los párrafos siguientes.

Con el propósito de tener una idea preliminar sobre la distribución geográfica de la variación haplotípica, la Tabla IX incluyó grupos que representaron localidades de interés, a pesar de que estos contenían pocos individuos; tal fue el caso de Puerto Ángel (n=5) y Taiwán (n=1). Con base en su abundancia, los 14 haplotipos detectados pudieron clasificarse como muy abundantes, con frecuencias cercanas al 30% (Ch1 y Ch8); abundantes, con frecuencias cercanas al 15% (Ch2 y Ch9); y raros o únicos.

Al comparar la distribución de los haplotipos entre las cuencas oceánicas se encontraron diferencias, siendo la más notoria la existencia de haplotipos que aparecieron en el Pacífico de manera exclusiva (Ch01 al Ch07, Ch09 al Ch11) o casi exclusiva (Ch08), o en Atlántico en forma exclusiva (Ch13 y Ch14). Al comparar entre sí a los grupos dentro de la Cuenca del Pacífico, el Sur del Pacífico mexicano apareció diferenciado de manera muy marcada debido a que sus siete haplotipos fueron exclusivos (Ch1, Ch3 al Ch7), o prácticamente exclusivos (Ch2, 10 de 11 individuos). Puerto Ángel, norte del Pacífico mexicano y Hawai fueron parecidos entre sí debido a que Ch8 apareció en todos los casos.

Dentro del Pacífico, el caso de Taiwán fue especial debido a que se tuvo acceso a

una sola secuencia nucleotídica. Taiwán representa al extremo occidental de la Cuenca del Pacífico, y la posibilidad de que dicha secuencia mostrara algún haplotipo particular decidió que se le incluyera como un grupo en la Tabla IX. Este efectivamente presentó un haplotipo diferente a los ya descritos, Ch12, el cual se encontró únicamente en esta secuencia y en otra del Atlántico.

Tabla IX. Haplotipos compuestos y su frecuencia. Los haplotipos indican presencia (1) o ausencia (0) de los sitios de restricción descritos en la Figura 15.

Haplotipo	Sitio de restricción ABCDEFGHIJ	Sur del Pacífico mexicano	Puerto Ángel	Norte del Pacífico mexicano	Hawai	Taiwán	Cuenca del Pacífico	Cuenca del Atlántico	Total
Ch01	0111100001	27	0	0	0	0	27	0	27
Ch02	0111100011	10	0	1	0	0	11	0	11
Ch03	0101100011	2	0	0	0	0	2	0	2
Ch04	0111101001	1	0	0	0	0	1	0	1
Ch05	0101100001	1	0	0	0	0	1	0	1
Ch06	0111100000	1	0	0	0	0	1	0	1
Ch07	0101110001	1	0	0	0	0	1	0	1
Ch08	0010000001	0	2	16	3	0	21	1	22
Ch09	0010000011	0	3	5	6	0	14	0	14
Ch10	0000000011	0	0	0	1	0	1	0	1
Ch11	0010001001	0	0	0	1	0	1	0	1
Ch12	1010000001	0	0	0	0	1	1	1	2
Ch13	1010000011	0	0	0	0	0	0	4	4
Ch14	1010000101	0	0	0	0	0	0	1	1
Total		43	5	22	11	1	82	7	89

La significación de las diferencias y similitudes entre grupos fue evaluada mediante diferentes pruebas estadísticas, cuyos resultados serán discutidos en las secciones siguientes.

7.5 Estructura genética y filogeografía.

7.5.1 Red de expansión mínima.

En la Figura 16 se muestran las relaciones evolutivas entre los 14 haplotipos detectados, y su distribución en el área de estudio. Con base en la teoría de la coalescencia, la red permite realizar varias deducciones:

1. Existen dos linajes, uno más diverso que incluye a siete haplotipos y que tiene a Ch01 como haplotipo más ancestral; y otro donde el haplotipo más ancestral está representado por Ch08.

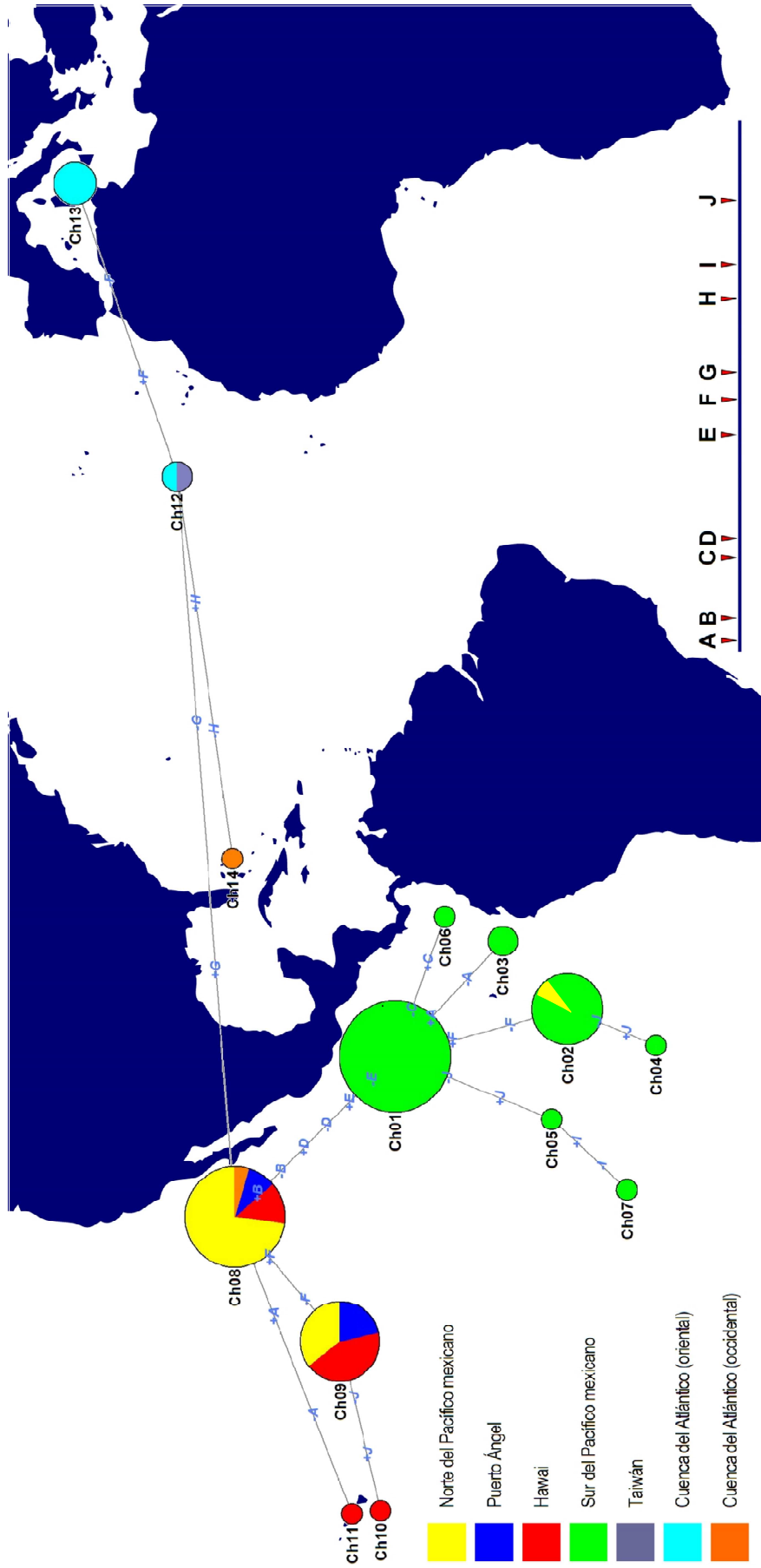


Figura 16. Red de expansión mínima que muestra las mínimas relaciones evolutivas entre los haplotipos detectados, y su distribución en el área de estudio. Los pares de letras en cada conexión indican aparición (+) o de desaparición (-) de sitios de restricción.

2. En ambos linajes, el número de pasos mutacionales entre los haplotipos más ancestrales y los más recientes es de dos. Si se asume que ambos linajes han evolucionado con la misma velocidad, y que no ha habido selección en contra de haplotipos particulares, esto sugeriría que la antigüedad de los linajes Ch01 y Ch08 es similar.
3. La conexión que separa a los haplotipos Ch01 y Ch08 comprende tres pasos mutacionales, y es la más larga de la red. Estos pasos mutacionales estarían representados por haplotipos aparentemente extintos, pues ninguno de ellos fue detectado en los 81 ejemplares y ocho secuencias analizadas.

La segunda inferencia, sobre una antigüedad aparentemente similar de los linajes Ch01 y Ch08, fue sometida a prueba analizando en forma conjunta las ocho secuencias nucleotídicas de *cit-b* que se citan en la Tabla IV, y tres secuencias nucleotídicas del mismo gen pero provenientes de la especie hermana *C. equiselis* (Claves de GenBank DQ080244, EF439194, EF439195). Este trabajo formó parte de un proyecto de Servicio Social desarrollado por la estudiante Nayeli Escudero Castelán, dentro del mismo grupo de investigación en el cual se realizó esta tesis. Los resultados de este análisis muestran que las secuencias de *C. equiselis* presentaron un mismo haplotipo, el cual apareció conectado con el haplotipo Ch08 mediante seis pasos mutacionales. Esto indica que, en *C. hippurus*, el linaje Ch08 es más antiguo que el Ch01. Esto también sugiere que el linaje Ch08 ha experimentado cuellos de botella que han mermado su diversidad.

En cuanto a la distribución geográfica de los haplotipos detectados, la Figura 16 muestra asociaciones claras:

1. El linaje Ch08 tiene una distribución cosmopolita, mientras que el linaje Ch01 fue encontrado únicamente en la Cuenca del Pacífico.
2. El linaje Ch08 presentó dos grupos de haplotipos: uno que fue casi exclusivo del Pacífico, y que contuvo a los haplotipos Ch08 al Ch11 (37 de 38 individuos); y otro que fue casi exclusivo del Atlántico, y que contuvo a los haplotipos Ch12 al Ch14 (6 de 7 individuos).
3. El linaje Ch01 apareció casi en forma única en el Sur del Pacífico mexicano (43 de 44 individuos).
4. Entre los grupos que pertenecieron al linaje Ch08, Hawai fue el más diverso pues presentó cuatro haplotipos: Ch08 al Ch11; estos haplotipos aparecieron distribuidos entre las regiones central y oriental del Pacífico, lo cual sugiere que esta franja oceánica representa un corredor para la especie.
5. Dos individuos mostraron evidencia de flujo génico moderado entre cuencas: el individuo único de Taiwán, el cual fue capturado en el Pacífico Occidental,

presentó el mismo haplotipo (Ch12) que un individuo del Atlántico Oriental; y un individuo del Pacífico Occidental presentó el haplotipo Ch08, el cual fue casi exclusivo del Pacífico.

6. En el Atlántico se observa que los haplotipos Ch13 y Ch14 se originaron a partir de Ch12; esta radiación sugiere un evento de aislamiento.

En conjunto, estas observaciones sugieren que la distribución del linaje Ch01 incluiría al Golfo de Tehuantepec y posiblemente zonas más meridionales; y la del linaje Ch08 incluiría la franja tropical del Pacífico y el Atlántico, abarcando en sus extremos a Puerto Ángel y Florida. Los límites de distribución de estos linajes tendrían que ser determinados mediante muestreos más amplios.

Los resultados de esta tesis muestran al Golfo de Tehuantepec como una zona donde la distribución de los linajes Ch01 y Ch08 presenta un cambio drástico. Los ejemplares de los grupos norte del Pacífico mexicano y los del grupo Puerto Ángel, estos últimos colectados en el extremo occidental del Golfo, pertenecieron al linaje Ch08 únicamente; y los del grupo sur del Pacífico mexicano, que fueron colectados en la zona central del golfo (Salina Cruz) y en su extremo occidental (Puerto Chiapas), pertenecieron al linaje Ch01 únicamente.

Se tiene conocimiento de otras dos tesis sobre estructura genética del dorado, cuya cobertura geográfica también abarcó el litoral del Pacífico mexicano. Los resultados de ambas apoyan el escenario de diferenciación que se encontró en este trabajo para la misma región, en el sentido de que los ejemplares de dorado del sur están bien diferenciados de los del norte. La tesis de Rosales (2008) fue parte del mismo proyecto de investigación en el cual se desarrolló el presente trabajo, y estuvo basada en el análisis de loci nucleares (intrones del gen para hormona de crecimiento, y un locus anónimo); concluyó que las diferencias más grandes y significativas se dieron entre las regiones norte (Sinaloa, B.C.S.) y sur (Salina Cruz, Puerto Chiapas). En esta tesis también se analizaron las muestras de Hawaii que se incluyeron en el presente trabajo, concluyendo igualmente que esta región es más parecida al norte del Pacífico mexicano que al sur de este litoral. La otra tesis (Bobadilla-Jiménez, 2007) se basó en el análisis de cinco loci microsatelitales nucleares, y en general encontró diferencias someras; sin embargo, los valores más altos y significativos correspondieron a comparaciones entre muestras del sur (Oaxaca, Chiapas) y del centro-norte (Colima, B.C.S.).

Un trabajo reciente sobre estructura genética de la macarela sierra del Pacífico (*Scomberomorus sierra*), basado en secuenciamiento de la región de control, mostró un patrón de diferenciación muy similar al que se encontró en esta tesis (Domínguez-López *et al.*, 2010). En este trabajo se encontraron dos stocks, uno en

el norte localizado en la boca del Golfo de California (Sinaloa), y otro en el Golfo de Tehuantepec (Oaxaca). Al igual que el dorado, la especie estudiada es pelágica y está distribuida en zonas tropicales y subtropicales, pero su distribución está limitada al Pacífico Oriental; los autores propusieron como posibles causas para su diferenciación a factores como desove estacional en varias áreas a lo largo de su intervalo de distribución, aunado a una dispersión limitada de sus poblaciones.

La aparente ausencia de traslapes en los límites de distribución de los linajes mitocondriales Ch01 y Ch08 podría estar influenciada por factores oceanográficos, o intrínsecos a la biología de estos organismos. En el caso de las variables oceanográficas, un estudio reciente demostró una fuerte sensibilidad de la distribución del dorado a las temperaturas y las concentraciones de clorofila en la superficie del mar (Farrell, 2009). Estos dos parámetros presentan una gran variabilidad interanual en el Golfo de Tehuantepec, debido principalmente a los intensos nortes que soplan cada invierno de octubre a marzo, y que resultan en el mezclado de las aguas en la capa oceánica superior (Trasviña *et al.*, 2000). Estos eventos forman “lenguas de agua fría”, que se extienden hasta 500 km hacia afuera de la costa, y se reflejan en el enfriamiento relativo de las aguas del golfo.

Los factores biológicos que podrían estar influyendo en la distribución de los linajes Ch1 y Ch8 incluyen al comportamiento de retorno a sitios particulares. Este comportamiento ha sido estudiado por Kingsford y Defries (1999), en el ámbito de los objetos flotantes, mediante estudios de marca y recaptura. En su trabajo se marcaron 12600 peces y se registraron 119 retornos. El porcentaje de recapturas fue bajo, pero la mayoría de éstas se hicieron en el mismo punto de la liberación. El estudio no es concluyente, pero demuestra que este comportamiento está presente en el dorado. En el mismo contexto, el marcaje de peces mediante emisores de sonido, aunado al monitoreo de las señales sonoras, ha demostrado que las asociaciones del dorado con los objetos flotantes pueden durar hasta dos semanas (Taquet *et al.*, 2007). Farrell (2009) demostró asociación del dorado con tapetes de sargazo en el Atlántico, y aunque no la cuantificó mediante captura y recaptura, la cobertura y duración de estos tapetes podrían afectar a los patrones de distribución de la especie.

Otro tipo de comportamiento de retorno que podría influir en la distribución de los linajes mitocondriales del dorado, es la fidelidad al sitio de desove. Este comportamiento no ha sido documentado en el dorado, pero estudios recientes han demostrado su importancia como factor determinante de estructura genética en especies como la corvina (*Cynoscion regalis*) (Thorrold *et al.*, 2001), el atún aleta azul (*Thunnus thynnus*) (Rooker, *et al.*, 2008) y el bacalao (*Gadus morhua*), esta

última de interés especial debido a que la fidelidad al sitio de desove es señalada como su principal factor de diferenciación genética (Svedäng *et al.*, 2007).

Para el caso del dorado no se encontraron reportes que señalen con claridad la existencia de sitios de desove definidos. Un trabajo de Palko *et al.* (1982) presenta un mapa de distribución de larvas y juveniles, el cual incluye la zona del Pacífico Tropical Oriental y muestra que estos estadios se encuentran a lo largo de todo el litoral, con los tamaños más pequeños asociados a dos zonas: una enfrente de la entrada al Golfo de California, y otra enfrente del Golfo de Tehuantepec. También se ha reportado que los sistemas lagunares y ecosistemas de manglar en los estados de Oaxaca y Chiapas sirven como zonas de alimentación, reproducción y crianza del dorado (Contreras, 1988). En conjunto, estos hechos sugieren que, en caso de que el dorado presentara fidelidad al sitio de desove, la estructura genética de la especie podría estar asociada con la distribución de estuarios y/o manglares.

La contribución relativa de estos factores a los patrones de estructura genética del dorado es desconocida, y su elucidación representa un reto para el futuro de las investigaciones sobre esta especie.

7.5.2 Diversidad genética.

El valor de h para la Cuenca del Pacífico (0.782) fue mayor que para la Cuenca del Atlántico (0.714), lo cual refleja el mayor polimorfismo detectado en la primera. El promedio de h para ambas cuencas fue de 0.748, y este valor es similar a lo reportado para otras especies de peces que también son cosmopolitas y presentan una distribución continua (Tabla X).

Tabla X. Diversidad haplotípica (h), diversidad nucleotídica (π) y divergencia nucleotídica (d) reportadas para peces marinos cosmopolitas con distribución continua, a partir del análisis de RFLPs mitocondriales.

Especies	h	π	d	Referencia
<i>Thunnus albacares</i>	0.82-0.87	0.28-0.39	0.01-0.10	
<i>Makaira nigricans</i>	0.58-0.97	0.14-0.80	0.15	Graves, 1998
<i>Istiophorus platypterus</i>	0.28-0.73	0.22-0.66	0.27	
<i>Isurus oxirynchus</i>	0.507 - 0.909	0.176 - 0.512	0.039 - 0.128	Heist <i>et al.</i> , 1996
<i>Xiphias gladius</i>	0.702 - 0.962	No reportado	No reportado	Chow <i>et al.</i> , 1997
<i>Coryphaena hippurus</i>	0.714 - 0.782	0.138	0.058	Esta tesis

El valor de π entre cuencas fue de 0.138, un poco más bajo que los valores calculados para las cinco especies de la Tabla X. El valor de d fue de 0.058 y estuvo ligeramente dentro de los rangos calculados para las mismas especies.

Dos estudios sobre estructura genética del dorado también incluyeron muestras del Pacífico y el Atlántico, y ninguno encontró evidencias de diferenciación entre cuencas; el primero fue realizado por Rosenblat y Waples (1986) mediante aloenzimas, y el otro fue desarrollado por Reeb y Cann (1996) mediante secuenciamiento de *cit-b*. Comparativamente, el análisis de aloenzimas es menos eficaz para detectar variación que el secuenciamiento de ADN. En el trabajo con aloenzimas, la dificultad para detectar diferencias fue mayor debido a que se compararon solamente 10 individuos del Pacífico y 15 del Atlántico. En el trabajo basado en secuenciamiento no se especificaron los tamaños de muestra, pero estos debieron ser pequeños pues se menciona haber analizado 55 individuos que aparentemente fueron colectados en 11 sitios alrededor del mundo.

Un trabajo reciente también muestra falta de diferenciación genética entre individuos de dorado colectados en una escala geográfica amplia, en este caso los extremos opuestos del Océano Índico (Zemlak *et al.*, 2009). Este trabajo es de interés especial debido a que se enfoca en la zona de tránsito del dorado entre las Cuencas del Pacífico y el Atlántico. En él también se analizaron tamaños de muestra reducidos, cinco individuos de África del Sur y cinco de Australia, pero se empleó una técnica muy poderosa para detectar diferencias genéticas, el llamado “DNA barcoding”, que consiste en secuenciar un segmento específico del gen para citocromo oxidasa.

La magnitud de la diferenciación genética entre las muestras del Pacífico y el Atlántico, cuantificada mediante los valores de π y d , sugiere que existe poca variación entre los ejemplares de dorado de estas cuencas oceánicas. Esta observación se ve apoyada por los resultados de los trabajos discutidos, y señala a las muestras del Pacífico, cuya cantidad es considerablemente mayor que las del Atlántico, como un acervo genético donde sería más probable detectar variación.

Los análisis de diversidad genética dentro del Pacífico muestran que Hawai presentó los valores de h y π más altos (Tabla XI).

Tabla XI. Diversidad haplotípica (h) y diversidad nucleotídica (π) para los grupos del Pacífico.

Localidad	h	π
Sur del Pacífico mexicano	0.5604	0.0189
Puerto Ángel	0.6000	0.0335
Norte del Pacífico mexicano	0.4372	0.0348
Hawai	0.6727	0.0520

Esto corrobora en forma cuantitativa la alta diversidad que se observó para este grupo en la Figura 16, y que se expuso en la sección anterior. El grupo Hawai estuvo

integrado por muestras oceánicas solamente, y su diversidad comparativamente alta podría ser un indicio de que la región del Pacífico Central forme parte de un corredor que estaría comunicando las poblaciones de dorado del Océano Índico y el Pacífico Occidental.

La Tabla XII muestra los valores de π y d entre los grupos estudiados. En cuanto a diversidades nucleotídicas, las comparaciones entre los grupos Puerto Ángel, norte del Pacífico mexicano, Hawai y Cuenca del Atlántico, los cuales pertenecen al linaje Ch8, mostraron valores comparativamente bajos y en el intervalo de 0.0364 a 0.0860. En cambio, las comparaciones que incluyeron al grupo sur del Pacífico mexicano, el cual pertenece al linaje Ch1, mostraron valores de dos a cinco veces más altos.

Tabla XII. Valores de diversidad nucleotídica (π) (diagonal superior) y divergencia nucleotídica (d) (diagonal inferior) entre los grupos estudiados.

	1	2	3	4	5
1		0.1791	0.1736	0.1866	0.1946
2	0.1529		0.0364	0.0402	0.0719
3	0.1467	0.0022		0.0464	0.0823
4	0.1488	-0.0048	0.0007		0.0860
5	0.1581	0.0282	0.0379	0.0307	

1, Sur del Pacífico mexicano; 2, Puerto Ángel; 3, Norte del Pacífico mexicano; 4, Hawai; 5, Cuenca del Atlántico.

En relación con las divergencias nucleotídicas, las comparaciones pareadas de la Tabla XII muestran valores que pueden agruparse en tres clases:

- 1) Divergencias muy bajas, cercanas a cero, que corresponden a las comparaciones entre los grupos Puerto Ángel, Norte del Pacífico mexicano y Hawai.
- 2) Divergencias intermedias, en un rango de 0.0282 a 0.0379, correspondientes a las comparaciones entre el grupo Cuenca del Atlántico y los demás grupos del linaje Ch08.
- 3) Divergencias muy altas, en un intervalo de 0.1467 a 0.1581, que corresponden a todas las comparaciones que incluyen al grupo sur del Pacífico mexicano.

Estas clases podrían corresponder a clados con grados variables de diferenciación, que van desde muy baja hasta muy alta. Tales clados serían el grupo sur del Pacífico mexicano, el grupo Cuenca del Atlántico, y el conjunto de grupos Puerto Ángel, norte del Pacífico mexicano y Hawai. La divergencia nucleotídica entre el grupo sur del Pacífico mexicano, el cual pertenece al linaje Ch01, y los demás grupos, todos los cuales pertenecen al linaje Ch08, es en promedio de 15.2%. Zemplak *et al.* (2009) consideran que divergencias nucleotídicas cercanas al 5% son típicas para especies del mismo género, por lo cual la divergencia tan alta que se

encontró entre los linajes Ch01 y Ch08 sugiere muy fuertemente que estas poblaciones representan especies diferentes. Lo anterior corrobora en forma cuantitativa lo que se dedujo a partir de la red de expansión mínima (Figura 16). Las relaciones entre los posibles clados se muestran en la Tabla XIII.

La variación genética fue cuantificada en los siguientes niveles jerárquicos: 1) entre los grupos Cuenca del Pacífico y Cuenca del Atlántico; 2) entre los grupos Cuenca del Atlántico, Hawai, norte del Pacífico mexicano, Puerto Ángel, y sur del Pacífico mexicano; y 3) dentro de los grupos anteriores. La mayor parte de la variación se dio en el segundo nivel jerárquico, y esto fue confirmado por el índice de fijación Φ_{SC} , el cual presentó un valor de 0.759 ($P = 0.000$). Los valores de estos índices se interpretan normalmente según las siguientes pautas: de 0 a 0.05, poca variación genética; de 0.05 a 0.15, variación moderada; 0.15 a 0.25 diferenciación alta; mayor a 0.25, diferenciación muy alta (Graves y McDowell, 2003). Esto indica que las diferencias entre los grupos Cuenca del Atlántico, Hawai, norte del Pacífico mexicano, Puerto Ángel, y sur del Pacífico mexicano, son muy grandes; mientras que la diferencia entre las cuencas oceánicas es bastante más baja. El valor tan alto de Φ_{SC} refleja que su cálculo se basó en la comparación de grupos que pertenecen al linaje Ch01 o al Ch08, los cuales ya fueron señalados como muy diferentes tanto por la red de expansión mínima como por sus divergencias nucleotídicas.

Tabla XIII. AMOVA realizado en tres niveles entre Pacífico y Atlántico.

Nivel jerárquico	Índices de Fijación	Variación	Porcentaje de la variación	<i>P</i>
1) Entre cuencas	$\Phi_{CT} = -0.016$	0.026	1.66	1.000
2) Entre grupos	$\Phi_{SC} = 0.759$	1.155	74.28	0.000
3) Dentro de grupos	$\Phi_{ST} = 0.755$	0.374	24.06	0.000

Las relaciones genéticas entre los grupos analizados se presentan gráficamente en los filogramas de la Figura 17. Los dos algoritmos que se usaron para construir los filogramas revelaron relaciones genéticas prácticamente idénticas, y corroboraron la existencia de los clados que se propusieron en párrafos anteriores. Se observan dos clados bien diferenciados, uno que reúne a todos los grupos que pertenecen al linaje Ch08 y otro cuyo único miembro es el grupo que pertenece al linaje Ch01. El clado que contiene al linaje Ch08 se divide a su vez en dos clados bien definidos, uno que contiene a los individuos del Atlántico y otro que contiene a los del Pacífico.

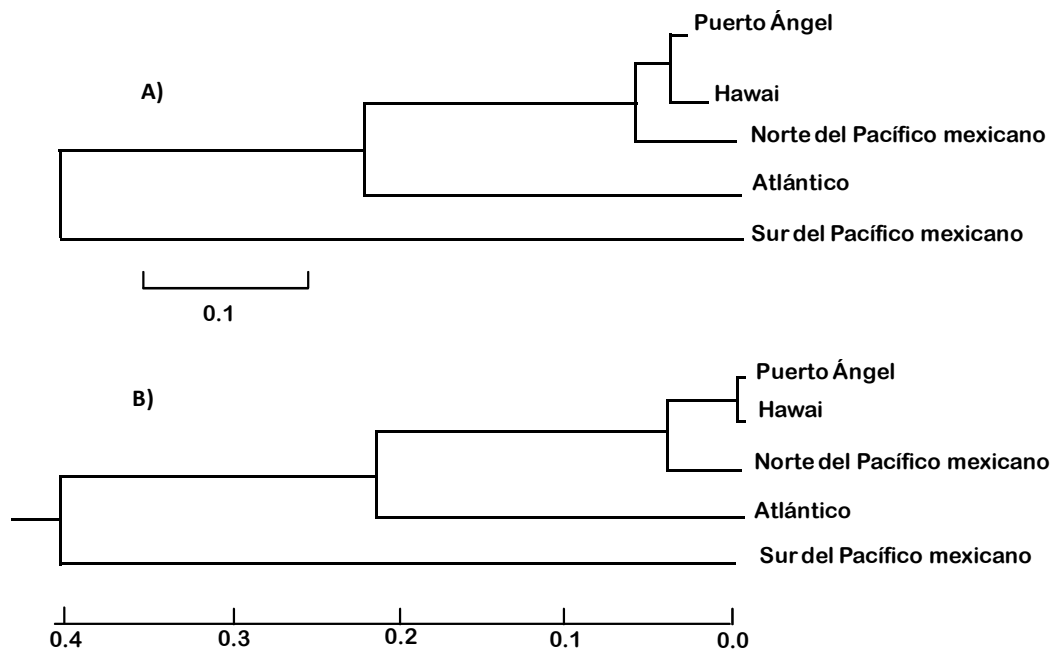


Figura 17. Filogramas para los grupos analizados, construidos mediante los algoritmos de unión al vecino más cercano (A) y de agrupamiento no ponderado por pares utilizando la media aritmética (B).

En conjunto, las diversidades y divergencias nucleotídicas, el AMOVA y los filogramas, corroboran en una forma clara y cuantitativa el escenario de variación inferido a partir de la red de expansión mínima. Tal variación es consistente con los resultados de otros autores (Bobadilla-Jiménez, 2007; Rosales, 2008) en el sentido de que existen diferencias genéticas entre los ejemplares de dorado del norte y el sur del Pacífico mexicano, y sugieren que las capturas de esta especie en el país están incidiendo sobre al menos dos stocks, los cuales incluso podrían tratarse de dos especies o subespecies.

7.5.3 Filogeografía.

El análisis filogeográfico de los datos generados en esta tesis debe tomar en cuenta la distribución geográfica de los linajes detectados, las relaciones evolutivas entre estos, y los escenarios evolutivos que pudieran explicar estos datos. Los primeros dos aspectos fueron presentados y discutidos en las secciones anteriores, aquí ambos serán analizados de manera global junto con posibles escenarios evolutivos. Las divergencias nucleotídicas entre los clados más diferenciados son, en promedio, de 3.2% para el par Cuenca del Atlántico – Cuenca del Pacífico; y de 15.2% para el par linaje Ch01 – linaje Ch08. Una tasa mutacional para regiones codificantes del ADNmt, la cual es comunmente usada para realizar cálculos aproximados de tiempos evolutivos, considera un 2% de sustituciones nucleotídicas por sitios nucleotídicos analizados, por cada millón de años (Brown *et al.*, 1979). Con base en

este reloj molecular, los tiempos de divergencia para los pares de clados mencionados, expresados en millones de años, serían de 1.6 (Atlántico – Pacífico) y 7.6 (linaje Ch01 – linaje Ch08). Estos tiempos caen dentro de un intervalo de fechas geológicas correspondientes a eventos que han sido señalados como causantes de vicarianza en organismos marinos (Bowen *et al.*, 2001; Wörheide *et al.*, 2008):

- 1) Emergencia del fondo marino en el Istmo de Centroamérica hasta un punto en que las aguas se volvieron someras, hace seis a siete millones de años (Figura 18).
- 2) Enfriamiento del mar y disminución en su nivel, debidos a glaciaciones que han venido ocurriendo en forma cíclica desde hace aproximadamente 14 millones de años. Durante estos ciclos, las aguas frías y la plataforma continental expuesta han formado barreras entre el Océano Índico y el Pacífico (Figura 19), así como entre el Océano Atlántico y el Índico, en el sur de África.
- 3) Surgimiento del sistema de surgencias de Benguela, en el sur de África, hace 2.0 a 2.4 millones de años (Figura 20).

Estas coincidencias sugieren fuertemente que la diversidad genética mitocondrial actual del dorado se ha originado, al menos en parte, como consecuencia de aisalamientos vicariantes. Bajo un enfoque filogeográfico, cualquier escenario evolutivo debe tomar en cuenta todos los hechos hasta ahora expuestos, a saber: 1) la diversidad de haplotipos y su distribución geográfica; 2) las relaciones evolutivas entre los haplotipos detectados; 3) los clados identificados y sus distancias genéticas; 4) los tiempos de divergencia entre los clados, estimados mediante un reloj molecular. En este contexto, se plantea el siguiente escenario evolutivo:

- a) Hace aproximadamente ocho millones de años, el linaje Ch01 no existía, y el Ch08 tenía una distribución cosmopolita. Los organismos se desplazaban libremente entre el Océano Atlántico y el Pacífico, a través del Istmo de Centroamérica; entre el Pacífico y el Índico, a través del norte de Australia y de los mares que rodean a las islas y archipiélagos del sureste de Asia; y entre el Índico y el Atlántico, a través del sur de África.
- b) Hace cinco a siete millones de años, debido a la emergencia del suelo marino en el Istmo de Centroamérica, y a enfriamiento y descenso en el nivel del mar, poblaciones del linaje Ch08 quedaron aisladas en tres regiones: el Pacífico, el Índico, y el Atlántico.

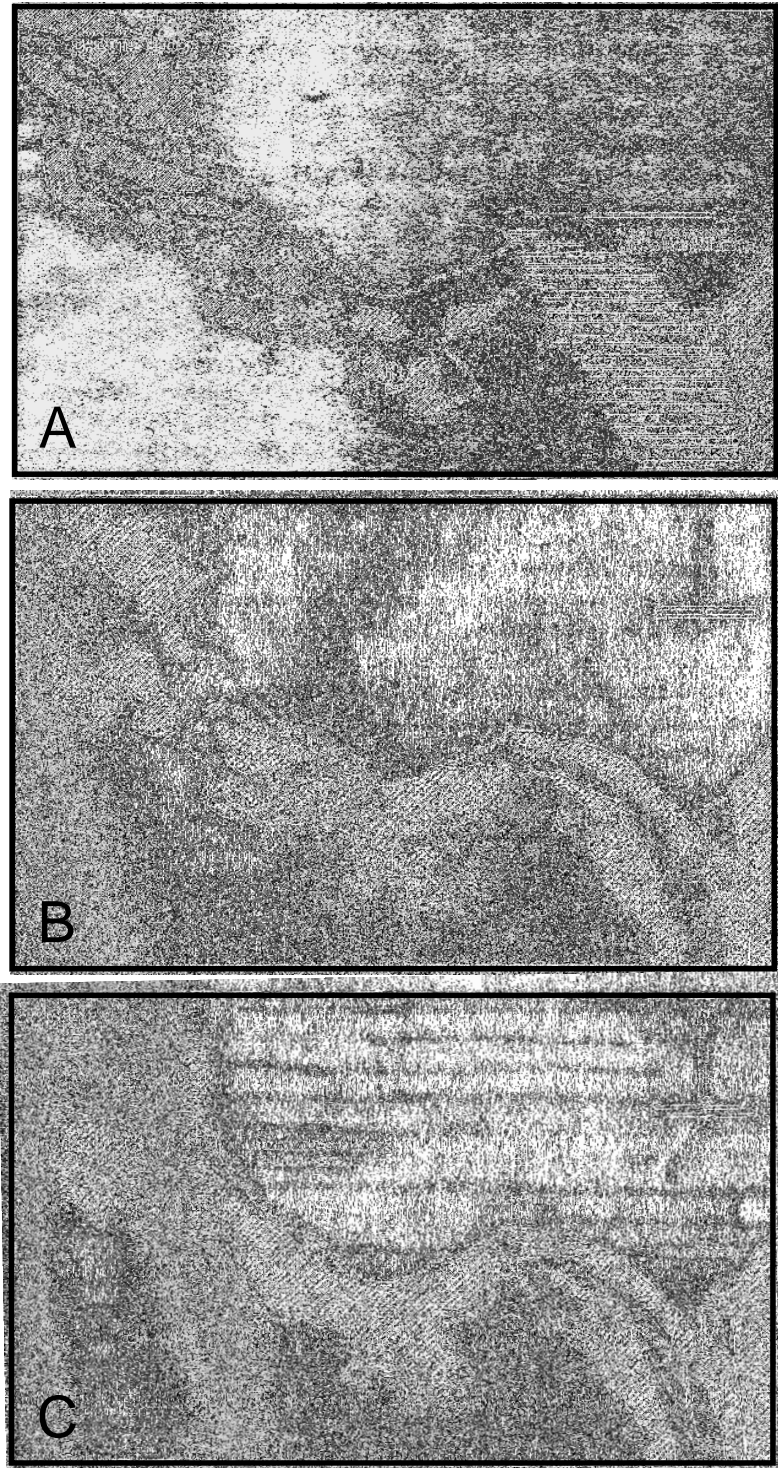


Figura 18. Istmo de Centroamérica a mediados del Mioceno (hace 15 a 16 millones) (A), finales del Mioceno (hace 6 a 7 millones de años) (B), y finales del Plioceno (hace aproximadamente 3 millones de años) (C). Las líneas paralelas oblicuas representan masas de tierra emergentes; las zonas punteadas señalan aguas someras; las líneas paralelas horizontales representan aguas oceánicas profundas (Tomado de Coates y Obando, 1996).

- c) El aislamiento entre el Atlántico y el Pacífico ha perdurado, propiciando que las poblaciones con menos posibilidad de contacto fueran las de estas cuencas oceánicas. Esto coincide con el hecho de que, en la actualidad, la divergencia genética más alta se observa entre una población del Pacífico, el linaje Ch01, y una del Atlántico que pertenece al linaje Ch08. Esto también sugiere que el linaje Ch01 surgió en el Pacífico como consecuencia de aislamiento vicariante, y que el linaje Ch08 reingresó a esta cuenca en tiempos geológicos recientes.
- d) Las otras dos barreras, es decir la que se formaba entre el Pacífico y el Índico, y la que aparecía entre el Índico y el Atlántico, han desaparecido y se han restablecido en forma cíclica debido a glaciaciones, y más recientemente, debido a la formación del sistema de surgencias de Benguela. Sin embargo, la divergencia genética tan alta entre el linaje Ch01 y el Ch08, en comparación con la divergencia del linaje Ch08 entre el Pacífico y el Atlántico, sugiere que la barrera entre el Pacífico y el Índico impidió el flujo de organismos por un tiempo más largo que la barrera entre el Índico y el Atlántico.
- e) El aparente evento de especiación que estaría representado por el linaje Ch01 podría haber seleccionado alguna característica biológica en esta población, como la fidelidad al sitio de desove o una preferencia por aguas más cálidas, la cual estaría restringiendo su distribución a latitudes más bajas del Pacífico Oriental.

El escenario propuesto plantea la influencia de por lo menos dos aislamientos vicariantes en la historia evolutiva del dorado. El impacto de uno de estos eventos habría sido suficientemente profundo como para dar lugar a la formación de una nueva especie o subespecie, con una distribución más meridional. La evidencia genética para proponer a un nuevo grupo taxonómico dentro del género *Coryphaena* es sumamente fuerte. Sin embargo, la definición de especie es un tema que genera bastante controversia, por lo cual se requeriría la obtención de sustento adicional en este sentido.

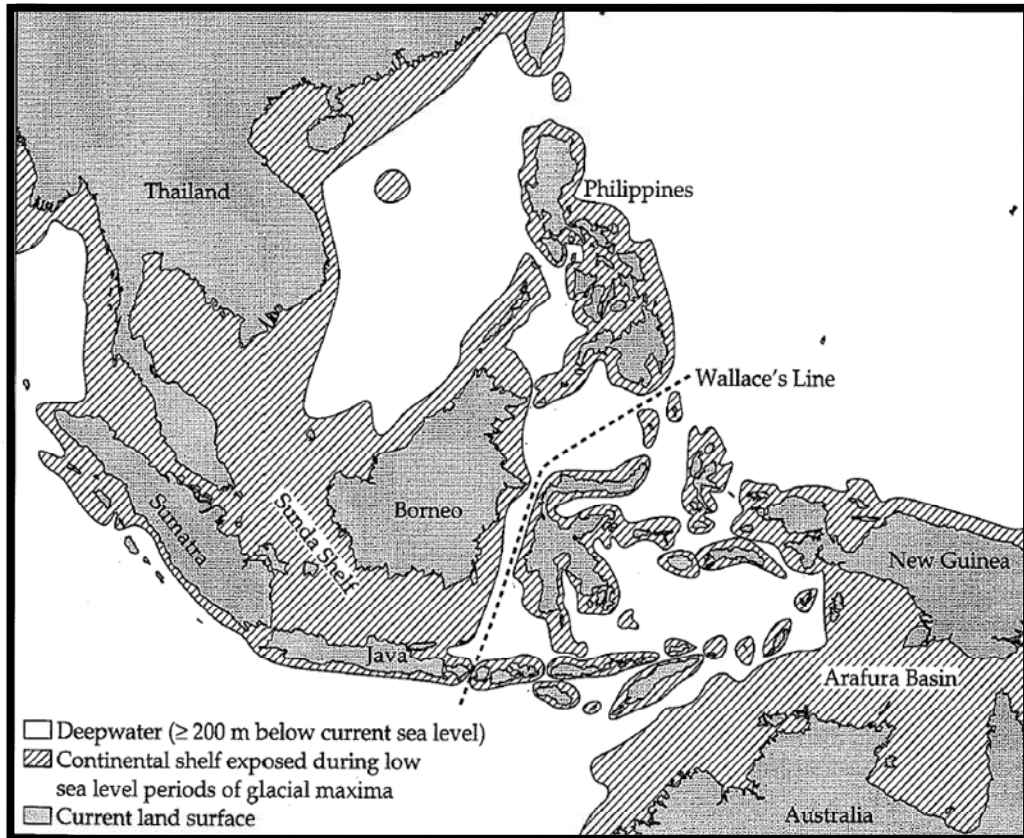


Figura 19. Región del Océano Indo-Pacífico durante el Pleistoceno (Tomado de Brown y Lomolino, 1998).

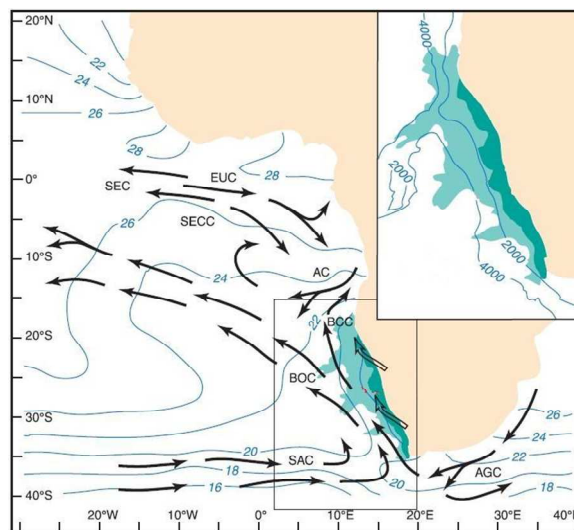


Figura 20. Mapa de corrientes e isotermas en el extremo austral del continente africano. Las flechas abiertas indican la dirección de los vientos alisios, y las sólidas las corrientes. Las zonas en verde representan el sistema de surgencias de Benguela, las cuales aparecen en el inserto relacionadas con isobatas. AC, Corriente de Angola; AGC, Corriente de Agulhas; BCC, Corriente Costera de Benguela; BOC, Corriente Oceánica de Benguela; EUC, Subcorriente Ecuatorial; SAC, Corriente del Atlántico Sur; SEC, Corriente Ecuatorial del Sur; SECC, Contracorriente Ecuatorial del Sur. Así como las surgencias que se dan en la Corriente de Benguela (Tomado de Marlow *et al.*, 2000).

El escenario evolutivo planteado tomó en cuenta la coincidencia entre tiempos de eventos geológicos conocidos y tiempos de divergencia genética basados en un reloj molecular, la actual distribución geográfica de linajes, y las relaciones evolutivas entre tales linajes. En conjunto, estas líneas de evidencia sugieren fuertemente que el fenómeno de vicarianza ha jugado un papel importante en moldear la actual variación genética del dorado, y esta tesis representa el primer reporte en este ámbito. En el contexto más restringido de la genética poblacional, se detectó una estructura genética clara dentro de la especie.

Los resultados de esta tesis son comparables con los de un análisis de RFLPs del genoma mitocondrial de especies con historias de vida similares a la del dorado: el marlín azul (*Makaira nigricans*), y el pez vela (*Istiophorus platypterus*) (Graves, 1998). En este trabajo, el Atlántico estuvo caracterizado por una alta diversidad, debida principalmente a dos linajes mitocondriales, uno de los cuales solo apareció en el Pacífico. Este trabajo sugiere que el flujo de genes ocurre del Pacífico hacia el Atlántico.

Estudios recientes sobre estructura genética de otras especies de peces marinos con distribución cosmopolita han demostrado que también existe conectividad entre poblaciones del Pacífico y el Atlántico, y que esta se debe a migraciones a través de la corriente de Agulhas, en el sur de África (Figura 19) (González *et al.*, 2008; Brendtro *et al.*, 2008).

Se han propuesto teorías para explicar escenarios de conectividad o aislamiento entre poblaciones, como las de Heads (2005) quien identifica a la dispersión fundadora y a la vicarianza como fuentes de diferenciación, por una interrupción o suspensión del movimiento de individuos y del flujo de genes. Este autor concluye que la dispersión (o migración), la cual incrementa el intervalo de distribución, podría alternar en tiempo con la ausencia de dispersión, lo cual permite que la vicarianza tome su lugar. En la dispersión fundadora, la interrupción es causada por “azar”. En la vicarianza, la interrupción es causada por un cambio geológico u otro factor ambiental. Los dispersionistas generalmente han considerado que el Pleistoceno es el tiempo durante el cual las modernas distribuciones y taxa se formaron. Graves y McDowell (2003) mencionan que barreras de aguas frías que se formaron en el pleistoceno, se han relajado en tiempos recientes, y lo sustentan con estudios sobre especies cosmopolitas como es el caso de los picudos, en las que encontraron haplotipos idénticos para el Atlántico y el Pacífico.

8. Conclusiones.

A continuación se presentan las conclusiones principales de esta tesis, agrupadas según su relación con las hipótesis planteadas:

Hipótesis No. 1: El análisis de *cit-b* en dorado, mediante una técnica molecular como PCR-RFLP, debe detectar polimorfismos que permitan estudiar su estructura genética.

La hipótesis fue aceptada debido a que se detectó variación genética que hizo posible los análisis de estructura genética. Tal variación se manifestó en diferentes niveles:

- Tres de las cuatro endonucleasas probadas generaron sitios de restricción polimórficos, a saber *Alu* I cuatro, *Dde* I dos, y *Alw26* I cuatro.
- Los 10 sitios de restricción anteriores dieron lugar a 14 haplotipos compuestos.
- Las relaciones evolutivas entre los haplotipos anteriores revelaron dos linajes mitocondriales, el linaje Ch01 y el Ch08.

Hipótesis No. 2: Los haplotipos analizados deben detectar estructura genética, al menos entre las Cuencas del Pacífico y el Atlántico.

La hipótesis sí se cumplió pues se encontraron tres poblaciones altamente diferenciadas. Las diferencias se encontraron no solamente entre el Pacífico y el Atlántico, sino también dentro del Pacífico:

- Todas las pruebas señalaron la existencia de tres clados claramente diferenciados: el linaje Ch01, y dos grupos de haplotipos del linaje Ch08.
- La distribución del linaje Ch01 aparentemente está restringida al Pacífico, concretamente al Golfo de Tehuantepec y posiblemente zonas más meridionales; y la del linaje Ch08 es circuntropical, con un grupo de haplotipos característico del Pacífico y otro del Atlántico.
- El Golfo de Tehuantepec aparece como una zona donde la distribución de los linajes Ch01 y Ch08 presenta un cambio drástico. La aparente ausencia de traslapes en los límites de distribución de los linajes podría estar influenciada por factores como la alta variabilidad ocenográfica en la zona de estudio; o intrínsecos a la biología de la especie, como comportamientos de retorno a

sitios de alimentación y resguardo, y la fidelidad al sitio de desove.

- Se detectaron evidencias de conectividad entre las poblaciones de dorado del Atlántico y el Pacífico. Estas estuvieron representadas por dos individuos: uno del Atlántico que presentó un haplotipo característico del Pacífico, y otro del Pacífico que presentó un haplotipo característico del Atlántico. Tal conectividad estaría ocurriendo a través de la corriente de Agulhas, en el sur de África.

Hipótesis No. 3: El análisis de los resultados bajo un enfoque filogeográfico permitiría inferir posibles escenarios para la evolución del dorado.

La hipótesis fue aceptada debido a que se logró plantear un escenario que compaginó las conclusiones ya expuestas con la aplicación de un reloj molecular, y con los tiempos de eventos geológicos conocidos:

- La actual diversidad genética mitocondrial del dorado ha sido moldeada por eventos evolutivos que parecen haber incluido al menos dos eventos de aislamiento vicariante.
- Los tiempos de divergencia entre clados se ajustan bien a la datación de tres eventos geológicos causantes de vicarianza en organismos marinos, sugiriendo su participación en la historia evolutiva de la especie. Estos eventos son la emergencia del Istmo de Centroamérica durante finales del Mioceno; enfriamiento del mar, y descenso en su nivel para formar un puente de tierra entre Australia y el sureste asiático, debido a glaciaciones cíclicas desde finales del Mioceno hasta el Pleistoceno; y enfriamientos del mar en el sur de África debidos a las mismas glaciaciones, culminando en tiempos geológicos recientes con la formación del sistema de surgencias de Benguela.
- Los aislamientos vicariantes descritos propiciaron la diferenciación de tres clados: el linaje Ch01, que sería el más reciente en la historia evolutiva del dorado y que se habría originado en la cuenca del Pacífico; y dos variantes del linaje Ch08, la más ancestral que es característica del Pacífico y la más reciente que es característica del Atlántico.
- Desde el punto de vista de la genética molecular, el linaje Ch01 presenta una diferenciación tan alta que lo señala como una posible nueva especie o subespecie del género *Coryphaena*.

9. Literatura citada.

- Aguilar-Palomino, B., F. Galván-Magaña, A. L. Abitia-Cárdenas, A. F. Muhlia-Melo y J. Rodríguez-Romero. 1998. Aspectos alimentarios del dorado *Coryphaena hippurus* Linnaeus 1758 en Cabo San Lucas, Baja California Sur, México. *Cienc. Mari.* 24: 253-265
- Aguirre-Planter, E. 2007. Flujo Genético: Métodos para estimarlo y marcadores moleculares. Páginas 49-61. En *Ecología Molecular*. Compiladores Eguiarte, L., V. Souza, y X. Aguirre. Eds. SEMARNAT, INE, UNAM y CONABIO. México
- Árnason, E. 2004. Mitochondrial cytochrome b DNA variation in the high-fecundity atlantic cod: trans-atlantic clines and shallow gene genealogy. *Genetics* 166: 1871–1885
- Asahida, T., T. Kobayashi, K. Saitoh y I. Nakayama. 1996. Tissue preservation and total DNA extraction from fish at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. *Fish. Sci.* 62: 727-730
- Avise J.C. 1994. *Molecular markers, natural history and evolution*. 1ª. edición. Chapman and Hall. USA
- Avise, J.C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, USA
- Avise, J. C., J. Arnold, R. M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J. E. Neigel, C. A. Reeb, and N. C. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. System.* 18: 489-522
- Bakun, A., J. Csirke, D. Lluch-Belda, y R. Steer-Ruiz. 1999. The Pacific Central american coastal LME. Páginas 268-280. En: *Large marine ecosystems of the Pacific*. Eds. K. Sherman y Q. Tang. Cambridge, Blackwell Science
- Begg, G. 1998. A review of stock identification of Haddock, *Melanogrammus aeglefinus*, in the Norwhest Atlantic Ocean. *NOAA*. 60: 1-15
- Bobadilla-Jiménez, M. 2007. Estructura Genética del dorado (*Coryphaena hippurus*) en distintas escalas geográficas del Pacífico Nororiental. Tesis para Maestro en ciencias, 68 pp. CISESE. México
- Bonhomme, F., A. Baranes, D. Golani y M. Harmelin-Vivien. 2003. Lack of mitochondrial differentiation between Red Sea and Mediterranean populations of the lessepien rabbithfish, *Siganus rivulatus* (Perciformes: Siganidae). *Sci. Mar.* 20: 1279-1291
- Boruvka, O. 1926. «O jistém problému minimálním (About a certain minimal problem). *Práce mor. přírodověd. spol. v Brně* III 3: 37–58.
- Bowen, B. W., A. L. Bass, L. A. Rocha, W. S. Grant, y D. R. Robertson. 2001. Phylogeography of the Trumpetfishes (*Aulostomus*): ring species complex on a global scale. *Evolution* 55: 1029–1039

- Brendtro, K. S., J. R. McDowell y J. E. Graves. 2008. Population genetic structure of escolar (*Lepidocybium flavobrunneum*). Mar. Biol. 155: 11-22
- Brown, J. H. y M. V. Lomolino. 1998. Biogeography. 2a. Edición. Ed. Sianuer Associates, Inc. Publishers, Massacusetts. E.U.A.
- Brown, W., M.M. George y A.C. Wilson. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 76: 1967–1971
- Castaño-Fernández, M. y M. Castaño-Fernández . Curso la atmósfera y el clima. http://teleformacion.edu.aytolacoruna.es/AYC/document/atmosfera_y_clima/temperatura/isotermas.htm Accesado, 20 de octubre de 2008
- Carvalho G. y L. Hauser. 1994. Molecular genetics and the stock concept in fisheries. Rev. Fish Biol. Fisher. 4: 326-350
- Chen, C. S., C. H. Tzeng y T. S. Chiu. 2009. Morphological and molecular analyses reveal separations among spatiotemporal populations of anchovy (*Engraulis japonicus*) in the Southern East China Sea. Zool. Stud. 49: 270-282
- Cheng, H., S. Huang y S. Lee. 2005. Phylogeography of the endemic goby, *Rhinogobius maculafasciatus* (Pisces: Gobiidae), in Taiwan. Zool. Stud. 44: 329-336
- Chow, S., H. Okamoto, Y. Uozumi, Y. Takeuchi y H. Takeyama. 1997. Genetic stock structure of the swordfish (*Xiphias gladius*) inferred by PCR-RFLP analysis of the mitochondrial DNA control region. Mar. Biol. 127: 359-367
- Coates, A. G. y J. A. Obando. 1996. The geologic evolution of the Central American Isthmus En: Evolution and environment in tropical America. Páginas: 21-56. Eds. Jackson, J. B. C., A. F. Budd y A. G. Coates. The University of Chicago Press.
- Contreras, E. F., 1988. Las lagunas costeras mexicanas. CECODES-SEPESCA. México
- Creste, S., A. Tulman, N. Neto y A. Figueira. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. Plant Mol. Biol. Rep. 19: 299–306
- CRFM FISHERY REPORT. 2006. Report of Second Annual Scientific Meeting–Port of Spain. Volume 1. Trinidad and Tobago
- Csirke, J. y M. Tanstad. 2003. Eastern Central Pacific, *Statistical Area 77*. FAO, Paginas: 113-120. en: Marine Resources Service, Fishery Resources Division, FAO
- Daemen, E., T. Cross, F. Ollevier y F. A. M. Volckaert. 2001. Analysis of the genetic structure of european eel (*Anguilla anguilla*) using microsatellite DNA and mtDNA markers. Mar. Biol. 139: 755-764
- Dellaporta, S. L., J. Wood y B. J. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation: Version II. Plant Mol. Biol. Rep. 1: 19-21
- Diario Oficial de la Federación. 1995. Norma Oficial Mexicana NOM-017-pesc-1994. Para regular las actividades de la pesca deportiva en las aguas de la

- jurisdicción federal de los Estados Unidos Mexicanos. Tomo No. 15-19. México
- Díaz-Jaimes, P., M. Uribe-Alcocer, S. Ortega-García y J. Domnique-Durand. 2006. Spatial and temporal mitochondrial DNA genetic homogeneity dolphinfish populations (*Coryphaena hippurus*) in the Eastern Central Pacific. *Fish. Res.* 80: 333-338
- Domínguez-López, M., M. Uribe-Alcocer y P. Díaz- Jaimes. 2010. Phylogeography and historical demography of the Pacific sierra mackerel (*Scomberomorus sierra*) in the Eastern Pacific. *BMC Genetics* 11: 34
- Ely, B., J. Viñas, J. Alvarado-Bremer, D. Black, L. Lucas, K. Covello, A. Labrie y E. Thelen. 2005. Consequences of the historical demography on the global population structure of two highly migratory cosmopolitan marine fishes: the yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) and the skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *BMC Evol. Biol.* 5: 1-9
- Etorneau J., P. Martinez, T. Blanz y R. Schneider. 2009. Pliocene–Pleistocene variability of upwelling activity, productivity, and nutrient cycling in the Benguela region. *Geology* 37: 871-874
- Excoffier, L., Smouse, P. y J. Quattro. 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., G. Laval y S. Schneider. 2006. Arlequin ver. 3.1: An integrated software package for populations genetics. Computational and Molecular Population Genetics Lab. Institute of Zoology, University of Berne, Switzerland
- FAO, 1995, W. Fischer, F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K Carpenter y V. Niem, redactores técnicos. Pacífico Centro-Oriental, Vol. 1. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, 1995
- Farias, I., G. Ortí, I. Sampaio, H. Schneider y A. Meyer. 2001. The cytochrome b as a phylogenetic marker: the limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes. *J. Mol. Evol.* 53: 89-103
- Farrell E. R. 2009. The habitat, movements, and management of dolphinfish, *Coryphaena hippurus*, in the Western North Atlantic, Caribbean, and Gulf of Mexico. Tesis de maestría. Duke University
- Féral J. 2002. How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity. *J. Exp. Mar Biol. Ecol.* 268: 121-145
- Fiedler, P. y L. Talley. 2006. Hidrography of the eastern tropical Pacific: A review. *Prog. Oceanogr.* 69: 143-180
- Finnerty, J. y B. Block. 1992. Direct sequencing of cytochrome b reveals highly divergent haplotypes in blue marlin, *Makaira nigricans*. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 1: 206-214
- Finnerty, J. y B. Block. 1995. Evolution of cytochrome b in the Scombroidei (Teleostei): molecular insights into billfish (Istiophoridae and Xiphiidae) relationships. *Fish. Bull.* 93:78-96

- Florida Museum of Natural History. Dolphinfish. Accesado el 24 de mayo de 2010 en <http://www.flmnh.ufl.edu/fish/gallery/descript/dolphin/dolphin.html>
- Fluxus Technology LTD. 2009. Network versión 4.5.1.6. Reconstrucción de árboles y redes filogenéticas. <http://www.fluxus-technology.com/>
- García-Melgar, G. y R. I. Ochoa-Báez. 1993. Los dorados. CICIMAR, Boletín No 26
- Gharrett, A., A. Gray y V. Brykov. 2001. Phylogeographic analysis of mitochondrial DNA variation in Alaskan coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. Fish. Bull. 99: 528–544
- Gonzalez E. G., P. Beerli y R. Zardoya. 2008. Genetic structuring and migration patterns of Atlantic bigeye tuna, *Thunnus obesus* (Lowe, 1839) BMC Evol. Biol. 8:252. <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/8/252>. Accesado 01 de enero de 2010
- Graves, J. 1998. Molecular insights into the population structures of cosmopolitan marine fishes. J. Hered. 89: 427-437
- Graves, J. y J. McDowell. 2003. Stock structure of the world's siliophorid billfishes: a genetic perspective. Mar. Freshwater Res. 54: 287-298
- Gray K. N., J. R. McDowell, B. B. Collette y J. E. Graves. 2009. An investigation of the global population structure of the marlin sucker (*Remora osteochir*) inferred from mitochondrial control region DNA sequence analysis. Bull. Mar. Sci. 84: 25-42
- Hartl, D. y A. Clark. 1997. Principles of populations genetics. 3ª. Edición. Sinauer Associates. Inc. Canadá
- Heads, M. 2005. Towards a panbiogeography of the seas. Biol. J. Linn. Soc. 84: 675-723
- Heist, E., J. Musick y J. Graves. 1996. Genetics population structure of the shortfin mako (*Isurus oxyrinchus*) inferred from restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 53: 583-588
- Heist, E. J. 1999. A review of population genetics in sharks. American Fisheries Society Symposium 23:139-146
- Herzig, C. E. 1990. Mitochondrial DNA used to track the dispersal of a preferred menu item in Waikiki restaurants: Mahimahi as an example of genetic tagging with mtDNA. Pac. Sci. 44: 186-187
- Ishikawa S., Y. Kimura, T. Tokai, K. Tsukamoto y M. Nishida. 2001. Genetic variation in the mitochondrial and nuclear DNA of the Japanese conger *Conger myriaster*. Fish. Sci. 67: 1081–1087
- Kalendar, R. 2006. Fast PCR version 3.8.84. Institute of Biotechnology. University of Helsinki. Finlandia
- Kershaw, E. Y A. Cundy. 2000. Oceanography, an earth science perspective. Ed. Routledge, Taylor and Francis group
- Kingsford, M. y A. Defries. 1999. The Ecology of and fishery for *Coryphaena* spp. in the waters around Australia and New Zealand. Sci. Mar. 63: 267-275

- Klug, W. y M. Cummings. 1999. Conceptos de Genética. Prentice Hall. 5ª. Edición. Madrid, España
- Kocher T., W. Thomas, A. Meyer, S. Edwards, S. Pääbo, F. Villablanca y C. Wilson. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. P. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 6196-6200
- Kolmodin, A. I. y Birch, E. D. 2002. Polymerase chain reaction: basics principles and routine practice. en: Bing-Yuan, C y W. J. Harry, PCR Cloning Protocols. 2ª. edición. Human Press
- Kvist, L. 2000. Phylogeny and phylogeography of european parids. Disertación académica. Departamento de biología. Universidad de Oulu. <http://herkules.oulu.fi/isbn9514255364/html/index.html> Accesado 20 de Junio del 2008
- Laikre, L., S. Palm y N. Ryman. 2005. Genetic population structure of fishes: Implications for coastal zone management. Ambio. 34: 111-119
- Lasso, J. y L. Zapata. 1999. Fisheries and biology of *Coryphaena hippurus* (Pisces: Coryphaenidae) in the Pacific coast of Colombia and Panama. Sci. Mar. 63: 387-399
- Lecomte, F., W. S. Grant, J. J. Dodson, R. Rodríguez-Sánchez y B. W. Bowen. 2004. Living with uncertainty: genetic imprints of climate shifts in East Pacific anchovy (*Engraulis mordax*) and sardine (*Sardinops sagax*). Mol. Ecol. 13: 2169–2182
- Lewin, B. 1997. Genes VI. Oxford University. New York, U.S.A
- Lin Ch. P. y B. Danford. 2004. How do insect nuclear and mitochondrial gene substitution patterns differ? Insights from Bayesian analyses of combined datasets. Mol. Phylogenet. Evol. 30: 686-702
- Liu, Z. J. y J. F. Cordes. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquaculture 238: 1-37
- López, R. F. 2004. Diseño de un algoritmo para optimización de ubicaciones en redes de distribución. Tesis de Licenciatura. Universidad de las Américas Puebla. México
- Lowe, S. y P. Asthon. 2004. Ecological genetic: design, analysis and application. 1ª. edición. Reino Unido.
- Madrid, J. y M. Beltrán-Pimienta. 2001. Length, weight and sex of the dolphin fish *Coryphaena hippurus* (Perciformes: Coryphaenidae), of the littoral of Sinaloa, Nayarit and Baja California Sur, Mexico. Rev. Biol. Trop. 49: 931-938
- Magoulas, A. 1998. Application of molecular markers to aquaculture and broodstock management with special emphasis on microsatellite DNA . Paginas:153-168 en: Genetics and breeding of mediterranean aquaculture species. Bartley, D. y B. Basurco. Eds. Zaragoza: CIHEAM-IAMZ, 1998
- Marlow, J. R., C. B. Lange, G. Wefer y A. Rosell-Melé. 2000. Upwelling intensification as part of the Pliocene-Pleistocene climate transition. Science 290: 2288-2291.

- Marsh, J. y R. Mazurek. 2007. MBA Seafood watch dolphinfish Final Report. Monterey Bay Aquarium.
- Martin A. y S. Palumbi. 1993. Protein evolution in different cellular environments: cytochrome b in sharks and mammals. *Mol. Biol. Evol.* 10: 873-891
- McElroy D, P. Moran, E Bermingham y I. Kornfield. 1992. The restriction enzyme analysis package (REAP). *Heredity* 83: 157–158
- Moritz, C., T. Dowling, y W. Brown. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematic. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18:269-292
- Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Ed. Columbia University Press. E.U.A
- Nei, M. y F. Tajima. 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics*. 97:145-163
- Nei, M. y J. Li. 1989. Variances of the average numbers substitutions within and between populations. *Mol. Biol. Evol.* 6: 290-300
- Neigel, J. 1997. A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. *Annu. Rev. Syst.* 28:105-128
- Norris, R. 2000. Pelagic species diversity, biogeography and evolution. *Paleobiology*. 26: 236-258.
- Olsen ,J., S. Merkouris y J. Seeb. 2002. An examination of spatial and temporal genetic variation in walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) using allozyme, mitochondrial DNA, and microsatellite data. *Fish. Bull.* 100:752–764
- Olson, R. y F. Galván-Magaña. 2002, Food habits and comparison rates of common dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) in the eastern Pacific Ocean. *Fish. Bull.* 100: 279-298
- Onarici, S. y S. Sumer. 2003. Protein and DNA in systematic biology. *Turk J. Biol.* 27: 47-55
- Orbacz, E. y P. Gaffney. 2000. Genetic structure of tautog (*Tautoga onitis*) populations assayed by RFLP and DGGE analysis of mitochondrial and nuclear genes. *Fish. Bull.* 98:336–344
- Ortega-García, S., J. A. Treigueros-Salmerón, R. Rodríguez Sánchez, S. Lluch-Cota y H. Villalobos. 2000. El Golfo de Tehuantepec como un centro de actividad biológica y su importancia en pesquerías. Paginas: 335-355 en BAC, Centros de actividad biológica en el Pacífico mexicano. Eds. D. Lluch-Belda, J. Elorduy-Garay, S. E. Lluch-Cota y G. Ponce-Díaz. CIBNOR, CICIMAR, CONACYT
- Oxenford, H. y W. Hunte. 1986. A preliminary investigation of the stock structure of the dolphin, *Coryphaena hippurus*, in the western central Atlantic. *Fish. Bull.* 84: 451-460
- Palko, B., G. Beardsley y W. Richards. 1982. Synopsis of the biological data on dolphins-fishes, *Coryphaena hippurus* Linnaeus and *Coryphaena equiselis* Linnaeus. NOAA. Technical Report NMFS circular 443

- Park, J., H. Lee, W. Kim, J. Lee, y K. Min. 2000. Mitochondrial cytochrome b sequence variation in Korean salmonids. *J. Fish Biol.* 56: 1145–1154
- Parker P., A. Snow, M. Schug, G. Booton y P. Fuerst. 1998. What molecules can tell us about populations: Choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79: 361-382
- Parrish, R.H., A. Bakun, D.M Husby y C.S. Nelson. 1983. Comparative climatology of selected environmental processes in relation to eastern boundary current pelagic fish reproduction. Páginas: 731-778. en G.D. Sharp y J. Csirke, eds. *Proceedings of the Expert Consultation to examine changes in abundance and species of neritic fish resources.* San José, Costa, Rica
- Pla, C. y J. Pujolar. 1999. Genetic homogeneity of dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) in the western Mediterranean and eastern Atlantic. *Sci. Mar.* 63: 337-341
- Posada, D. y K. Crandall. 2001. Intraespecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends Ecol. Evol.* 16: 37-45
- Primmer. C.R. 2005. Genetic characterisation of populations and its use in conservation decision making in fish. *The Role of Biotech.* 5: 137-142
- Pujolar, J. y C. Pla. 2002. Occurrence of dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) and pompano dolphinfish (*Coryphaena equiselis*) in the Canary Islands revealed by genetic analysis. *New. Zealand. J. Mar. Freshwater Res.* 36: 339-343
- Rahman K., M. Arai, K. Kuroda, K. Umino, y H. Nakagawa. 2005. Genetic variation of Japanese loach inferred from restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA. *Afr. J. Biotech.* Vol. 4: 318-325
- Reeb, C. y R. Cann 1996. Population structure and dynamics in mahimahi (*Coryphaena hippurus*) as Inferred through analysis of mitochondrial DNA. PFRP. <http://imina.soest.hawaii.edu/PFRP/genetics/reeb.html>. Accesado 12 de Junio de 2008
- Reed. D., E. Kent y M. de Gravelle. 2002. Molecular systematics of the jacks (Perciformes: Carangidae) based on mitochondrial cythochrome b sequences using parsimony, likelihood, and Bayesian approaches. *Mol. Phylogenet. Evol.* 23: 513-524
- Rocha-Olivares, A., Bobadilla-Jiménez, M., Ortega-García, S., Saavedra-Sotelo, N. y J. Sandoval-Castillo. 2006. Variabilidad mitocondrial del dorado *Coryphaena hippurus* en poblaciones del Pacífico. *Cienc. Mari.* 32: 569-578
- Rocha-Olivares, A. y J. Chávez-González. 2008. Molecular identification of dolphinfish (genus *Coryphaena*) using multiplex haplotype-specific PCR of mitochondrial DNA. *Ichthiol. Res.* DOI 10.1007/s10228-008-0040-7
- Rohlf, F. 1973. Algorithm 76. Hierarchical clustering using the minimum spanning tree. *Comput. J.* 16: 93-95
- Rooker J. R., D. H. Secor, G. DeMetrio, A. J. Kaufman, A. Belmonte-Ríos y V. Ticina. 2008. Evidence of trans-Atlantic movement and natalhoming of bluefin tuna from stable isotopes in otoliths. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 68: 231–239

- Rosales, A., 2008, Estructura genética del dorado (*Coryphaena hippurus* Linnaeus, 1758) en el Pacífico mexicano, inferida mediante marcadores de ADN nuclear. Universidad del Mar. Tesis para Licenciatura
- Rosenblat, R. y R. Waples. 1986. A genetic comparison of allopatric populations of shore fish species from the Eastern and Central Pacific: dispersal or vicariance. *Copeia*. 2:275-284
- Ryman, N. 1997. Salmon biology: genetic population structure. en: Genetic effects of straying of non-native hatchery fish into natural populations: Proceedings of the workshop. Grant, S. Eds. U.S. Dep. Commer., NOAA Tech. Memo. NMFS-NWFSC-30
- Santos, S., H. Schneider e I. Sampaio. 2003. Genetic differentiation of *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae, Perciformes) populations in Atlantic coastal waters of South America as Revealed by mtDNA analysis. *Genet. Mol. Biol.*. 26: 151-161
- Scherbachev, Y. 1973. Biología y distribución de los corifénidos (Pisces: Coryphaenidae). *Vop. Ikhtiologika*. 13:219-230
- Shevenell, A., P. J. Kenneth y D. W. Lea 2004. Middle Miocene Southern Ocean cooling antarctic cryosphere expansion. *Science*. 305: 1766-1770
- Silva, E. y A. Russo. 2000. Techniques and statistical data analysis in molecular population genetics. *Hidrobiología*. 420: 119-135
- Slatkin, M. 1985. Gene flow in natural populations. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 16: 393-430
- Slatkin, M. 1991. Inbreeding coefficients and coalescence times. *Genet. Res.*. 58:165-167
- Slatkin, M. 1994. Gene flow and population structure. Páginas 3-18. en: *Ecological genetics*. Eds. L. Real. Princeton University Press
- Sunnucks, P. 2000. Efficient genetic marker for population biology. *TREE*. 15: 199-203
- Svedäng, H., D. Righton y P. Jonsson. 2007. Migratory behaviour of Atlantic cod *Gadus morhua*: natal homing is the prime stock-separating mechanism. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 345:1-12
- Takehana, Y., N. Nagai, M. Matsuda, K. Tsuchiya y M. Sakaizumi. 2003. Geographic variation and diversity of the cytochrome b gene in Japanese wild populations of Medaka, *Oryzias latipes*. *Zool. Sci.* 20: 1279-1291
- Tamura, K., J. Dudley, N. Masatoshi y S. Kumar. 2008. MEGA, Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Versión 4. Center of Evolutionary Functional Genomics, Biodesign Institute, Arizona State University
- Taquet, M., L. Dagorn, J.C. Gaertner, Ch. Girard, R. Aumerruddy, G. Sancho y D. Itano. 2007. Behavior of dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) around drifting FADs as observed from automated acoustic receivers. *Aquat. Living Resour.* 20: 323-330

- Thorrold, S. R., C. Latkoczy, P. K. Swart y C. M. Jones. 2001. Natal homing in a marine fish metapopulation. *Science*. 291: 297-299
- Trasviña, A., D. Lluch-Cota, A. E. Filonov y A. Gallegos. 2000. Oceanografía y el Niño. en: Los impactos de el Niño en México. Centro de Ciencias de la atmosfera. UNAM.
- Wingrove, R. 2000. Population structure of dolphin, *Coryphaena hippurus* L. 1758, in the west central Atlantic, eastern Caribbean Sea, and Gulf of Mexico inferred from mitochondrial DNA variation. Tesis para maestro en ciencias. Graduate Program in Marine Biology. The Graduate School - College of Charleston
- Wörheide, G., L. S. Epp y L. Macis. 2008. Deep genetic divergences among Indo-Pacific populations of the coral reef sponge *Leucetta chagosensis* (Leucettidae): Founder effects, vicariance, or both? *BMC Evolut. Biol.* 8:24
- Ward, R. 2000. Genetics in fisheries management. *Hydrobiologia*. 420: 191-201
- Ward, R. 2002. Genetic of fish populations. Páginas: 201-219. en: Fish biology and fisheries; eds. Hart, P y J. Reynolds, Blackwell Publishers
- Waples, R. 1998. Separating the wheat from the chaff: Patterns of genetics differentiation in high gene flows species. *J. Hered.* 89:438-450
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Ann. Eugenics*. 15: 323-354
- Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*. 19: 395-420
- Zhang, D. y G. Hewitt. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Mol. Ecol.* 12: 563-584
- Zemlak, T., R. D. Ward, , A. D. Connell, B. H. Holmes, y P. D. Hebert. 2009. DNA barcoding reveals overlooked marine fishes. *Mol. Ecol. Res.* 9 (Suppl. 1). 237-242

Anexo.

Análisis de restricción para las secuencias nucleotídicas analizadas

En cada secuencia, los pares de bases resaltados con colores señalan sitios de restricción de las enzimas que revelaron polimorfismos, según la clave siguiente:

Alu I: ■ *Dde* I: ■ *Alw*26 I: ■

Los tamaños (pb) de los fragmentos que se generarían se señalan al pie de las secuencias.

CLAVE DE REGISTRO: EF439513

tccacaccatctaacatctcagcctgatgaaatttcggctcactcctgggaatttgtcttc
tcacccaaatcttgacaggactcttcctggcaatacactacacagcagacattgccacggct
ttccctccgctcgcccatatttgccgggatgtaaactacggatgactaatccgtaacctaca
tgctaacggagcttcattcttctttatctgtgttacttccacattggctcgaggcctgtact
atgggtcctacctatacaaggaaacctgaaacatcggagtagttctcctcttacttcttata
ggtaccgcctttgtagggttacgtcctaccttgaggacaaatcattctgaggggcaacagt
cattaccaaccttatactgctgtaccttacattggggacaccctcgtacaatgaatttggg
gaggcttctccgtagacaatgctactcttaccgattcttcgcatccacttctccttccg
tttgtcattctagcaaccactttagtgcacctcttattctccacgagacagggctacaaca
ccccactggattaaactctgactctgacaaaattccggtccaccatactctcatacaag
acatccttggctttacagttctctttgttttctttcatcaattgctctattcgccccaaac
gtgctcggagatccagataacttcaccctgctaaccctcttggtactccgccccacattaa
accagaatgatatttcttatttgctacgcaattctccgctcaattcctaacaaggctagggg
gagtcttagcacttcttttctctatcctgatccttataattggtccattcctccatacatcc
aatcaccgaggccttacgttccgcctccaacacaaatcctctctgagctttaattgcaga
cgtactggtcctcacatggattgggggacttctggtgaagccccattcgtcttcattggcc
aagtggcctcagtaatttactttgactgttcttagtatttattccactagctggctggcta
gaaaacatggcct

Alu I: 197 + 602 + 118 + 126 + 24
Dde I: 19 + 339 + 453 + 102 + 87 + 67
Alw 26 I: 536 + 531

CLAVE DE REGISTRO: EF439512

tccacaccatctaacatctcagcctgatgaaatttcggctcactcctgggaatttgtcttc
tcacccaaatcttgacaggactcttcctggcaatacactacacagcggacattgccacggct
ttccctccgctcgcccatatttgccgggatgtaaactacggatgactaatccgtaacctaca
tgctaacggagcttcattcttctttatctgtgttacttccacattggctcgaggcctgtact
atgggtcctacctatacaaggaaacctgaaacattggagtagttctcctcttacttcttata
ggtaccgcctttgtagggttacgtcctaccttgaggacaaatcattctgaggggcaacagt
cattaccaaccttatactgctgtaccttacatcggggacaccctcgttcaatggatttggg
gaggcttctccgtagacaatgctactcttaccgattcttcgcttccacttctccttccg
tttgtcattctagcaaccactttagtgcacctcttattctccacgagacagggctacaaca
ccccactggattaaactctgactctgacaaaattccggtccaccatactctcatacaag
acatccttggctttacagttctctttgttttctttcatcaattgctctattcgccccaaac
gtgctcggagatccagataacttcaccctgctaaccctcttggtactccgccccacattaa
accagaatgatatttcttattcgctacgcaattctccgctcaattcctaacaaggctagggg
gagtcttagcacttcttttctctatcctgatccttataattggtccattcctccatacatcc
aatcaccgaggccttacgttccgcctccaacacaaatcctctctgagctttaattgcaga
cgtactggtcctcacatggattgggggacttctggtgaagccccattcgtcttcattggcc
aagtggcctcagtaatttactttgactgttcttagtatttattccactagctggctggcta
gaaaacatggcct

Alu I: 197 + 602 + 118 + 126 + 24
Dde I: 19 + 339 + 453 + 102 + 87 + 67
Alw 26 I: 536 + 531

CLAVE DE REGISTRO: DQ080245

tcccacaccatctaacatctcagcctgatgaaatttcggctcactcctgggaatttgtcttc
tcacccaaatcttgacaggactcttcctggcaatacactacacagcagacattgccacggct
ttccctccgctcgcccatatttgccgggatgtaaactacggatgactaatccgtaacctaca
tgctaacggaagcttcattctctttatctgtgtctactccacattggctcgaggcctgtact
atgggtcctacctatacaaggaaacctgaaacatcggagtagttctcctcttacttcttata
ggtaccgcctttgtaggttacgtcctaccttgaggacaaatcattctgaggggcaacagt
cattaccaaccttatactgctgtaccttacattggggacaccctcgtacaatgaatttggg
gaggcttctccgtagacaatgctactcttaccgattcttcgcattccacttctcctccg
tttgtcattctagcaaccacttagtgacactcttattctccacgagacagggctaaaca
cccactggattaaactctgactctgacaaaattccggtccaccatacttctcatacaaag
acatccttggctttacagttctctttgttttctttcatcaattgctctattcgccccaaac
gtgctcggagatccagataaactcaccctgctaaccctctgttactccaccacacattaa
accagaatgatatttcttattcgctacgcaattctccgctcaattcctaacaagctagggg
gagtcttagcacttctttctctatcctgatccttataattggtccgctcctccatacatcc
aaccaccgaggccttacgttccgacctcaacacaaatcctctctgaagctttaattgcaga
cgtactggctcctacatggattgggggacttctggtgaagccccattcgtcttcatggcc
aagtggctcagtaatttactttgactggtcctagatatttattccactagctggctgacta
gaaacatggcct

Alu I: 197 + 602 + 118 + 126 + 24
Dde I: 19 + 339 + 453 + 102 + 87 + 67
Alw 26 I: 536 + 531

CLAVE DE REGISTRO: DQ197936

tcccacaccatctaacatctcagcctgatgaaatttcggctcactcctgggaatttgtcttc
tcacccaaatcttgacaggactcttcctggcaatacactacacagcagacattgccacggct
ttccctccgctcgcccatatttgccgggatgtaaactacggatgactaatccgtaacctaca
tgctaacggaagcttcattctctttatctgtgtctactccacattggctcgaggcctgtact
atgggtcctacctatacaaggaaacctgaaacatcggagtagttctcctcttacttcttata
ggtaccgcctttgtaggttacgtcctaccttgaggacaaatcattctgaggggcaacagt
cattaccaaccttatactgctgtaccttacattggggacaccctcgtacaatgaatttggg
gaggcttctccgtagacaatgctactcttaccgattcttcgcattccacttctcctccg
tttgtcattctagcaaccacttagtgacactcttattctccacgagacagggctaaaca
cccactggattaaactctgactctgacaaaattccggtccaccatacttctcatacaaag
acatccttggctttacagttctctttgttttctttcatcaattgctctattcgccccaaac
gtgctcggagatccagataaactcaccctgctaaccctctgttactccaccacacattaa
accagaatgatatttcttattcgctacgcaattctccgctcaattcctaacaagctagggg
gagtcttagcacttctttctctatcctgatccttataattggtccgctcctccatacatcc
aaccaccgaggccttacgttccgacctcaacacaaatcctctctgaagctttaattgcaga
cgtactggctcctacatggattgggggacttctggtgaagccccattcgtcttcatggcc
aagtggctcagtaatttactttgactggtcctagatatttattccactagctggctgacta
gaaacatggcct

Alu I: 197 + 602 + 118 + 126 + 24
Dde I: 19 + 339 + 453 + 102 + 87 + 67
Alw 26 I: 536 + 531

CLAVE DE REGISTRO: EF439196

tcccacaccatctaacatctcagcctgatgaaatttcggctcactcctgggaatttgtcttc
tcacccaaatcttgacaggactcttcctcgcaatacactacacagcagacattgccacggct
ttccctccgctcgcccatatttgccgggatgtaaactacggatgactaatccgtaacctaca
tgctaacggaagcttcattctctttatctgtgtctactccacattggctcgaggcctgtact
acgggtcctacctatacaaggaaacctgaaacatcggagtagttctcctcttacttcttata
ggtaccgcctttgtaggttacgtcctaccttgaggacaaatcattctgaggggcaacagt
cattaccaaccttatactgctgtaccttacattggggacaccctcgtacaatgaatttggg
gaggcttctccgtagacaatgctactcttaccgattcttcgcattccacttctcctccg
tttgtcattctagcaaccacttagtgacactcttattctccacgagacagggctaaaca
cccactggattaaactctgactctgacaaaattccggtccaccatacttctcatacaaag
acatccttggctttacagttctctttgttttctttcatcaattgctctattcgccccaaac
gtgctcggagatccagataaactcaccctgctaaccctctgttactccgccccacatcaa

accagaatgatatttcttattcgcctacgcaattctccgctcaattcctaacaaactagggg
gagtcttagcacttcttttctctatcctgatccttataattggtccattcctccatacatcc
aatcaccgaggccttacgttccgacctccaacacaaatcctcttctgagctttaattgcaga
tgtactggctcctcacatggattgggggacttctggttgaagccccattcgtcttcatggcc
aagtggcctcagtaatttactttgcactggtcctagatattattccactagctgggctgacta
gaaaacatggcct

Alu I: 197 + 720 + 126 + 24
Dde I: 19 + 339 + 453 + 102 + 87 + 67
Alw 26 I: 536 + 531

CLAVE DE REGISTRO: AY050761

tcccacaccatctaacatctcagcctgatgaaatttccggctcactcctgggaatttgtcttc
tcacccaaatcttgacaggactcttccctcgcaatacactacacagcagacattgccacggct
ttcccctccgctcgcccatatttgccgggatgtaaactacggatgactaatccgtaacctaca
tgctaacggaagcttcttcttcttctctggtgctacttccacattggctgaggcctgtact
acgggtcctacctatacaaggaaacctgaaacatcggagtagttctcctcttacttcttata
ggtagcgcctttgtaggttacgtcctaccttgaggacaaatcattctgaggggcaacagt
cattaccaaccttatactgctgtaccttacattggggacacctcgtacaatgaatttgag
gaggcttctccgtagacaatgctactcttaccgattcttccgattccactttctccttccg
tttgtcattctagcaaccactttagtgacctcttattctccacgagacagggcttaacaa
cccactggattaaactctgactctgacaaaattccggtccaccatacttctcatacaaag
acattctggctttacagttctctttgttttctttcatcaattgctctattcgccccaaac
gtgctcggagaccagataaacttcacccctgtaaccctctgttactccgccccacatcaa
accagaatgatatttcttattcgcctacgcaattctccgctcaattcctaacaaactagggg
gagtcttagcacttcttttctctatcctgatccttataattggtccattcctccatacatcc
aatcaccgaggccttacgttccgacctccaacacaaatcctcttctgagctttaattgcaga
tgtactggctcctcacatggattggaggacttctggttgaagccccattcgtcttcatggcc
aagtggcctcagtaatttactttgcactggtcctagatattattccactagctgggctgacta
gaaaacatggcct

Alu I: 197 + 720 + 126 + 24
Dde I: 19 + 339 + 453 + 102 + 87 + 67
Alw 26 I: 536 + 148 + 383

CLAVE DE REGISTRO: AY050762

tcccacaccatctaacatctcggcctgatgaaatttccggctcactcctgggaatttgtcttc
tcacccaaatcttgacaggactcttccctcgcaatacactacacagcagacattgccacggct
ttcccctccgctcgcccatatttgccgggatgtaaactacggatgactaatccgtaacctaca
tgctaacggaagcttcttcttcttctctggtgctacttccacattggctgaggcctgtact
atggatcctacctatacaaggaaacctgaaacatcggagtagttctcctcttacttcttata
ggtagcgcctttgtaggttacgtcctaccttgaggacaaatcattctgaggggcaacagt
cattaccaaccttatactgctgtaccttacattggggacacctcgtacaatgaatttgag
gaggcttctccgtagacaatgctactcttaccgattcttccgattccactttctccttccg
tttgtcattctagcaaccactttagtgacctcttattctccacgagacagggcttaacaa
cccactggattaaactctgactctgacaaaattccggtccaccatacttctcatacaaag
acattctggctttacagttctctttgtcttctttcatcaattgctctattcgccccaaac
gtgctcggagaccagataaacttcacccctgtaaccctctgttactccgccccacattaa
accagaatggatatttcttattcgcctacgcaattctccgctcaattcctaacaaactagggg
gagtcttagcacttcttttctctatcctgatccttataattggtccattcctccatacatcc
aatcaccgaggccttacgttccgacctccaacacaaatcctcttctgagctttaattgcaga
tgtactggctcctcacatggattgggggacttctggttgaagccccattcgtcttcatggcc
aagtggcctcagtaatttactttgcactggtcctagatattattccactagctgggctgacta
gaaaacatggcct

Alu I: 197 + 720 + 126 + 24
Dde I: 358 + 453 + 102 + 87 + 67
Alw 26 I: 536 + 531

CLAVE DE REGISTRO: AM265579

tccacaccatctaacatctcagcctgatgaaatttcggctcactcctgggaatttgtcttc
tcacccaaatcttgacaggactcttcctcgcaatacactacacagcagacattgccacggct
ttccctccgtcgccccatattgcccgggatgtaaactacggatgactaatccgtaacctaca
tgctaacggagcctcattctctttatctgtgtctacttccacattggctcgaggcctgtact
atgggtcctacctatacaaggaaacctgaaacatcggagtagttctcctcttacttcttata
ggtaccgcctttgtaggttacgtcctaccttgaggacaaaatcattctgaggggcaacagt
cattaccaacctatatactgctgtaccttacattggggacaccctcgtacaatgaatttgag
gaggcttctccgtagacaatgctactcttaccgattcttcgcattccacttctccttccg
ttgtcattctagcaaccactttagtgcacctcttattctccacgagacagggctcaacia
ccccactggattaaactctgactctgacaaaattccggtccaccatattctcatacaaaag
acatccttggctttacagttctctttgttttctttcatcaattgctctattcgccccaaac
gtgctcggagatccagataacttcaccctgctaaccctcttgttactccgccccacattaa
accagaatggatcttattcgctacgcaattctccgctcaattcctaacaaactagggg
gagtcttagcacttctttctctatcctgatccttataattggtccattcctccatacatcc
aatcaccgaggccttacgttccgccctccaacacaaatcctctctgaaccttaattgcaga
tgtactggctcctcacatggattgggggacttctgttgaagccccattcgtcttcattggcc
aagtggcctcagtaatttactttgcactgttcttagtatttattccactagctggctgacta
gaaaacatggcct

Alu I: 197 + 720 + 126 + 24
Dde I: 19 + 339 + 453 + 102 + 87 + 67
Alw 26 I: 536 + 531