

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
BAJA CALIFORNIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
POSGRADO EN OCEANOGRAFÍA COSTERA**



**Estructura genética de las agregaciones de calamar gigante
(*Dosidicus gigas*) en el Golfo de California, México.**

**T E S I S QUE PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
PRESENTA
LUIS MANUEL ENRÍQUEZ PAREDES**



ENSENADA, B.C., JULIO DE 1999

DEDICATORIA

En esta ocasión , va toda a ella.....

A mi Terquedad

Y a todos quienes confiaron plenamente en que a algún lado me llevaría

AGRADECIMIENTOS

Mi más grande y sincero agradecimiento va para el Dr. Jorge de la Rosa Vélez, quien no sólo tuvo a bien aceptarme como estudiante y dirigir este trabajo, sino: compartir la angustia y mi coraje por haberme quedado sin datos; ayudarme a conseguir un nuevo tema de tesis; intrigarse al igual que yo cuando no salía nada bien en el laboratorio; interceder por mí ante el eficientísimo Departamento de Compras; intrigarse de nueva cuenta cuando seguía sin salir nada en el laboratorio; buscar siempre, a toda hora, y en cualquier lugar, la manera de que no faltaran reactivos para poder seguir trabajando; por permitirme hacer, deshacer y rehacer miles de ¡¡“a ver si ahora sí.....!!; por no desesperarse cuando aún seguían sin salir las cosas en laboratorio; por ser uno de los que confiaron en que, en algún momento, ¡¡¡¡esto tendría que funcionar!!!!. Y por si eso fuera poco, aún revisó hasta el cansancio lo que a continuación se van a recetar, aportando valiosísimos comentarios y sugerencias. Y finalmente, lo crean o no, me aceptó como estudiante para continuar el Doctorado en esto del ADN.....En verdad Jorge, por tenerme toda esa confianza y paciencia, muchísimas gracias.

Al Dr. Eduardo Santamaría del Angel, quien motivo el que llegara yo hasta aquí, a la UABC. Siempre me brindó su apoyo y amistad, tanto en lo académico como en lo personal y soportó en más de dos ocasiones encarnizadas discusiones sobre la naturaleza nominal de algunas variables (no, ¡¡no creas que se me olvida!!). Aceptó ser parte de mi comité revisor y aportó valiosas ideas sobre el manejo de los datos. Por todo eso, y las intensas horas de esparcimiento que me proporcionaron todos tus CD's, gracias Eduardo.

Al M. en C. Unai Markaida Aburto, por haberme proporcionado el material biológico y la bibliografía de estos simpáticos animalitos que, dicho en terminos científicos, ¡¡¡¡tienen una proporción bajísima de ADN mitocondrial!!!!. Por su entusiasmo, esfuerzo y disposición para apoyarme desde el momento en que surgió la idea de este trabajo y aceptó formar parte de mi comité, gracias K.

Al Dr. Oscar Sosa, quien aceptó ser parte de mi comité, y también, dejar de serlo. Particularmente, por haberme favorecido con la confianza y el entusiasmo de que el trabajo avanzaba lento...pero seguro. *Domo arigato.*

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por apoyarme durante mis estudios de posgrado con la beca 110222/110247.

Roberto Millán, Irma Soria y Reginaldo Durazo, me brindaron una cantidad inmenable de apoyo ante la abrumadora “simplificación administrativa”, y confiaron en que este trabajo, aunque no lo pareciera, iba avanzando. Gracias a todos, y muy particularmente al Dr. Durazo, pues su computadora, además de aceptar uno que otro virus, se aventó prácticamente el 90% de las horas-cálculo incluidas en esta tesis.

A Armando Jaramillo y a Ernesto Vázquez por todo el apoyo que me brindaron para que éste llegara, acelerada y amablemente, a su culminación. Armando programó los algoritmos necesarios para estimar que 324 calamares con 265 marcadores moleculares y 1500 horas-máquina, equivalen a 0.2288. Ernesto, por su parte, dedicó mucho de su tiempo en editar y darle forma al documento. Carnales, esta tesis en verdad no solo es mía; de no haber sido por ustedes, esto simple y sencillamente no existiría. Gracias por su ayuda y su amistad.

Al Kowalski y su banda (Andrés, Erick y Diego) por su entusiasta ayuda durante el procesado de las muestras. En particular, Kowalski, sacrificó valiosísimas horas que podría haber dedicado a resolver ecuaciones, al ayudarme en el laboratorio y soportar las horas y horas de quejas, corajes y rabiets generadas por el encierro en el Laboratorio de Biología Molecular.

A la Fundación “Chiquis Salinas” y la Fundación “Oaxaca por Flais” por su invaluable amistad y su apoyo en los momentos críticos de la Bolsa de Valores.

A Angélica por tenerme toda la paciencia del mundo y soportar mi despreocupación involuntaria ante los trámites administrativos.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

POSGRADO EN OCEANOGRAFIA COSTERA

Estructura genética de las agregaciones de calamar gigante
(*Dosidicus gigas*) en el Golfo de California, México.

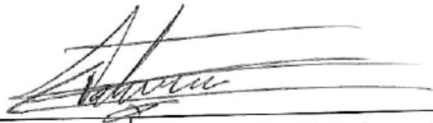
**TESIS QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS PRESENTA:**

Luis Manuel Enríquez Paredes

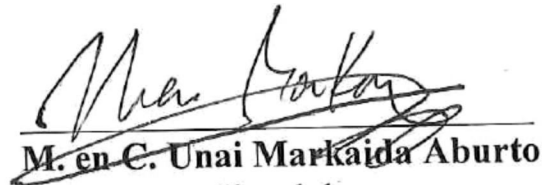
Aprobada por:



Dr. Jorge de la Rosa Vélez
Director de Tesis



Dr. Eduardo Santamaría del Angel
Sinodal



M. en C. Unai Markáida Aburto
Sinodal

RESUMEN

El calamar gigante *Dosidicus gigas* es el segundo recurso pesquero de importancia económica en el Golfo de California, en donde sus capturas artesanales alcanzan las 20000 toneladas anuales. Sus agregaciones se caracterizan por amplias fluctuaciones interanuales en su abundancia y aparentemente los *stocks* reproductivos, localizados cerca de la costa, son los que soportan la pesquería. La escasa información biológica y demográfica con la que se cuenta para la especie, ha promovido una justificada preocupación por parte del Instituto Nacional de la Pesca por no sobreexplotar el recurso. El carácter migratorio de la especie y los problemas de tipo metodológico en el estudio de la dinámica de las poblaciones de los cefalópodos (alta plasticidad morfológica y bajos niveles de variabilidad genética) no han permitido obtener un panorama claro sobre la estructuración de sus poblaciones. Con el reciente avance en el campo de la genética molecular, se cuenta hoy en día con un número importante de marcadores genéticos que ha probado tener gran utilidad en estudios sobre la delimitación de *stocks* pesqueros y procesos de la dinámica de las poblaciones bajo explotación (migración y sistemas de apareamiento). Uno de los marcadores recientemente diseñados y que ha probado tener un alto poder resolutivo, de magnitud comparable a la de los microsatélites, es el RAPD-PCR (amplificación aleatoria de polimorfismos del ADN). En este trabajo se utilizaron 10 cebadores RAPD para amplificar 324 muestras representativas de la captura artesanal del calamar gigante en el Golfo de California. En un primer paso exploratorio para su análisis, se evaluó la reproducibilidad de la técnica bajo diferentes condiciones experimentales, llegando con ello al ajuste de un protocolo estándar para el análisis del ADN de calamar gigante. Se obtuvieron 265 productos de amplificación RAPD y las frecuencias para los alelos nulos se utilizaron para estimar los parámetros genéticos poblacionales. La diversidad genética promedio y la similitud promedio fueron de 0.2206 (C.V. 46.7%) y 0.7104 (C.V. 7.26%), respectivamente. Se detectó la ocurrencia de al menos dos grupos genéticamente diferenciables dentro del Golfo: los enanos, con tallas de madurez menores a los 35 cm de longitud de manto y disimilitud promedio de 0.071%, y un segundo grupo, con tallas de 50 cm y 0.012% de disimilitud. El análisis de la heterocigosidad en exceso a lo largo del periodo de estudio permitió detectar los picos reproductivos y el abatimiento de las poblaciones en la escala anual. El análisis filogenético por parsimonia evidenció una variabilidad genética baja, pero discernible para cada cohorte putativa, que se interpretó como la señal de entrada o salida de calamares al Golfo al contrastarlo con los patrones migratorios sugeridos por el análisis de su estructura espacial y temporal. Las cohortes putativas agruparon individuos con amplias variaciones en talla y de diferentes niveles de madurez sexual. Algunas cohortes aparecen fuera de la temporada reproductiva, pero en general, la señal detectable se pierde después de 6 meses. Se plantea que las poblaciones de calamar del Golfo de California son altamente dependientes de los aportes anuales externos y que estas entradas pueden presentarse a lo largo del año.

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN.....	iv
TABLA DE CONTENIDO.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
INTRODUCCIÓN.....	1
Antecedentes	5
AREA DE ESTUDIO	9
MATERIAL Y MÉTODOS	12
Obtención de las muestras.....	12
Extracción del ADN.....	12
Principio de la técnica RAPD y estandarización del método	13
Condiciones de amplificación para los RAPD	14
Análisis exploratorio con los datos genotípicos crudos.....	16
Estimación de los parámetros genéticos poblacionales.....	16
Criterios de selección de los grupos de análisis para las agregaciones de calamar.	17
RESULTADOS.....	19
Condiciones de amplificación para los marcadores RAPD.....	19
Diversidad genotípica.....	23
Diversidad genética y subdivisión poblacional	25
Asociación por clases de tallas para cada zona y año.....	27
Asociación de los grupos de madurez gonadal por temporada y año.....	29
Asociación de los grupos por sexo, localidad y temporada.....	31
Temporalidad de la heterocigosidad y similitud.....	31
Asociación de individuos inferida por el árbol de mayor parsimonia.	35
Estructura temporal de tallas y madurez gonadal de los grupos A-F.....	41
Asociación por la estructura de tallas detectada de los grupos A-F	44
DISCUSIÓN	45
Consideraciones Metodológicas.....	45
Validación del método RAPD-PCR para el calamar gigante	45
Diversidad de los marcadores RAPD para calamar gigante	47
Aspectos sobre la selección de los estimadores adecuados para RAPD.....	47
Asociación entre los grupos comparados	49
El calamar gigante del Golfo de California	50
Estructura de las agregaciones	51
Temporalidad de la heterocigosidad y similitud en las agregaciones.....	52
Asociación de los individuos inferida por parsimonia.	53
CONCLUSIONES.....	58
RECOMENDACIONES.....	61
LITERATURA CITADA.....	62
APÉNDICE A. DATOS MORFOMÉTRICOS Y MERÍSTICOS DE LOS ESPECÍMENES ANALIZADOS	71
APÉNDICE B. MARCADORES RAPD-PCR AMPLIFICADOS POR LA SERIE OPERON C DE CEBADORES DECÁMEROS.....	79
APÉNDICE C. ESTIMADORES DE DIVERSIDAD GENÉTICA Y SUBDIVISIÓN POBLACIONAL....	82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Análisis de varianza de los patrones de bandeo para 20 muestras seleccionadas al azar con dos réplicas para cada tratamiento. Se indican la significancia de la prueba de homocedasticidad de Levene, las varianzas asociadas a los tratamientos, al error, y la significancia del estadístico F.	19
Tabla II. Relación de las muestras de calamar gigante procesadas para la extracción de ADN. Entre paréntesis el número de muestras que no mostraron degradación de ADN y que se incluyeron en los análisis genéticos.	19
Tabla III. Código comercial, secuencia, contenido de guanina-citosina y descripción del ciclo de PCR de los cebadores empleados en el análisis de las muestras de calamar gigante del Golfo de California.	22
Tabla IV. Diversidad genotípica detectada por RAPD con los cebadores de la serie OPC (OPERON Technologies).	23
Tabla V. Estimación de la diversidad genética intrapoblacional (H^2 años) y su varianza asociada usando los tres años de muestreo. La varianza fue calculada a partir de 100 réplicas por bootstrap, efectuando la partición en los componentes asociados al muestreo para los diferentes niveles de comparación empleados y expresada como contribución porcentual relativa (en <i>itálicas</i>). Entre paréntesis se indica el número de individuos comparados.	25
Tabla VI. Estimación de la diversidad genética y de la de similitud interpoblacional usando como grupos de comparación los años de muestreo. El promedio y las medidas de dispersión se calcularon a partir de 100 réplicas por bootstrap. Entre paréntesis el número de individuos de cada grupo.	26
Tabla VII. Asociación por años de muestreo. En la triangular superior las distancias expresadas como 1-Sij, equivalentes al porcentaje de disimilitud. En la triangular inferior y en <i>itálicas</i> los coeficientes de variación. El subíndice indica el número de marcadores incluidos en la comparación. Los valores de Sij y H^2 el número de individuos comparados dentro de cada grupo se indican entre corchetes y entre paréntesis, respectivamente.	26
Tabla VIII. Estimación de la diversidad genética y de la de similitud interpoblacional usando como grupos de comparación las localidades de muestreo. El promedio y las medidas de dispersión se calcularon a partir de 100 réplicas por bootstrap. SROs=Santa Rosalía, Gym=Guaymas Entre paréntesis el número de individuos de cada grupo.	27
Tabla IX. Asociación por tallas (longitud de manto), localidad y año. Distancias expresadas como 1-Sij, equivalente al porcentaje de disimilitud. En la triangular inferior y en <i>itálicas</i> los coeficientes de variación. El subíndice indica el número de marcadores incluidos en la comparación. El valor de similitud y el número de individuos comparados dentro de cada grupo se indican entre corchetes y entre paréntesis, respectivamente. Chicos (C) < 45 cm, grandes (G) > 45 cm, Guaymas (Gym), Santa Rosalía (SRO).	30
Tabla X. Asociación por temporada y madurez gonadal. Distancias expresadas como 1-Sij, equivalente al porcentaje de disimilitud. En la triangular inferior y en <i>itálicas</i> los coeficientes de variación. El subíndice indica el número de marcadores incluidos en la comparación. El valor de similitud y el número de individuos comparados dentro de cada grupo se indican entre corchetes y entre paréntesis, respectivamente. Invierno (Inv) incluye de noviembre a abril, verano (Ver) de mayo a octubre. Inmaduro (inm) < 3, madurando o maduro (mat) >2).	30
Tabla XI. Asociación por sexos en cada localidad y para cada año. Distancias expresadas como 1-Sij, equivalente al porcentaje de disimilitud. En la triangular inferior y en <i>itálicas</i> los coeficientes de variación. El subíndice indica el número de marcadores incluidos en la comparación. El valor de similitud y el número de individuos comparados dentro de cada grupo se indican entre corchetes y entre paréntesis, respectivamente. Machos (M), hembras (H), Guaymas (Gym), Santa Rosalía (SRO).	31

Tabla XII. Estimación de la diversidad genética y de la de similitud interpoblacional usando como grupos de comparación los meses de muestreo. El promedio y las medidas de dispersión se calcularon a partir de 100 réplicas por bootstrap. Entre paréntesis el número de individuos de cada grupo.....	32
Tabla XIII. Estimación de la diversidad génica y de la de similitud interpoblacional usando como grupos de comparación los clusters derivados del dendrograma construido por el algoritmo de mayor parsimonia del PHYLIP 95. El promedio y las medidas de dispersión se calcularon a partir de 100 réplicas por bootstrap. Entre paréntesis el numero de individuos de cada grupo.....	36
Tabla XIV. Asociación basada en el árbol de mayor consenso generado por parsimonia. En la triangular superior las distancias expresadas como $1-S_{ij}$, equivalentes al porcentaje de disimilitud y a la heterocigosidad en exceso. En la triangular inferior y en itálicas los coeficientes de variación. El subíndice indica el número de marcadores incluidos en la comparación. El valor de similitud y el número de individuos comparados dentro de cada grupo se indican entre corchetes y entre paréntesis, respectivamente. Los grupos A-F corresponden a los clusters de la Figura 9	38
Tabla XV. Asociación basada en la clasificación tentativa de los grupos de tallas. En la triangular superior las distancias expresadas como $1-S_{ij}$, equivalentes al porcentaje de disimilitud. En la triangular inferior y en itálicas los coeficientes de variación, indicando con el subíndice el número de marcadores incluidos en la comparación. El valor de similitud y el número de individuos comparados dentro de cada grupo se indican entre corchetes y entre paréntesis, respectivamente. Los individuos clasificados como enanos corresponden al grupo A de la Figura 9, mientras que los chicos y los grandes pertenecen a los otros grupos (B-F), pero separados por tallas en: chicos < 55 cm y grandes > 55 cm de longitud de manto.	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización del área de estudio.....	11
Figura 2. Efecto de la degradación del templete de ADN y de la mezcla de PCR empleados para la amplificación de fragmentos RAPD-PCR en el calamar gigante <i>Dosidicus gigas</i> . En (A) se indican los criterios de clasificación del estado de degradación de la muestra: Q1 es un templete sumamente fragmentado que produce un barrido a lo largo del carril, Q5 es un templete integro que se observa como una banda bien definida de alto peso molecular, Q2-Q4 son niveles graduales entre Q1 y Q5. En (B), los patrones de bandas amplificados con el cebador Opc-10: en la línea superior izquierda (1-10) se usó templete Q4, con 3 mM de MgCl ₂ (1-5) y 1.65 mM (6-10); en la superior derecha (1-9) se usó Q5, con 3 mM MgCl ₂ (1-5) y 1.65 mM (6-9); en la línea inferior izquierda (1-10) se usó Q2, con 3 mM MgCl ₂ (1-5) y 1.65 mM (6-10); y finalmente, en la inferior derecha (1-8) se utilizó Q3, con 3mM de MgCl ₂ (1-4) y 1.65 mM (5-8). En los carriles M se corrió una escalera estándar de 500 pb, y en el carril m el estándar de 250 pb.	20
Figura 3. Contraste experimental entre dos grupos de condiciones de amplificación para marcadores RAPD-PCR con la serie de cebadores Opc (OPERON Technologies), en donde la condición A correspondió siempre al primer grupo de valores para las siguientes variables: calidad de ADN (Q5-Q4 y Q3-Q2), cantidad de ADN (4-8 ng y 15-25 ng), periodo de almacenamiento de las muestras (< 2 meses y > 2 meses), tiempo de digestión durante la extracción de ADN (48-72 y 80-120 h), tejido empleado (manto y masa bucal), ciclo de PCR (30°C y 37°C para la incorporación del cebador), aparato termociclador (mismo modelo) y, finalmente, la mezcla de PCR (1.65 mM y 3.0 mM de MgCl ₂).....	21
Figura 4. Variabilidad en los patrones de bandas RAPD-PCR en el calamar gigante del Golfo de California. Los patrones de banda fueron generados por los cebadores OPC-05, OPC-06, OPC-11 y OPC-14. En los carriles externos se colocaron marcadores de 500 pares de bases y en el carril central un marcador de 250 pares de bases. En el resto de los carriles se cargaron las muestras.	24
Figura 5. Secuencia de caracteres binarios de la lectura de las bandas en los geles. La clave contiene la información del sexo y el estadio de madurez (p.e. H2 es una hembra en madurez 2), seguida del número de la muestra (pe. s268 es la muestra No. 268), y la fecha (p.e. Ag96 es agosto 1996). El 1= banda, 0 = sin banda. Los puntos negros representan el límite de cada cebador (sólo se usaron 6 cebadores para mostrar el patrón).	24
Figura 6. Distribución de tallas de los calamares gigantes en el Golfo de California. En (A), a la distribución de la muestra colectada para el estudio morfométrico, y que comprende de noviembre de 1995 a mayo de 1998. (U. Markaida, datos no publicados). En (B) la distribución de tallas de la submuestra que fue utilizada para los análisis genéticos, que incluye solo de marzo de 1996 a mayo de 1998.	28
Figura 7. Asociaciones y distancias genéticas generadas por el algoritmo Fitch-Margoliash del PHYLIP 95 para el promedio de 100 réplicas generadas por bootstrap. En (A) para los grupos de tallas por localidad y año, en (B) para los de madurez por temporada y año, y en (C) para los grupos de sexo por localidad y año.....	33
Figura 8. Variación temporal de la heterocigosidad (H) y la similitud (S) entre los individuos agrupados por meses de muestreo. Los puntos negros son los valores del estimador puntual, los cuadros internos el valor del promedio en 100 réplicas (bootstrap), los cuadros externos los percentiles al 95% y las líneas capitalizadas los valores máximos y mínimos.....	34

Figura 9. Árbol de mayor parsimonia construido a partir de 265 sitios representados por marcadores RAPD-PCR para calamar gigante del Golfo de California. Se usó el algoritmo de parsimonia de Dollo y polimorfismo PHYLIP 95. Los valores sobre los nodos son los índices de similitud y en paréntesis los coeficientes de variación estimados en 100 replicaciones por bootstrap. Las letras bajo las barras en el eje horizontal inferior representan a los grupos que se plantean como posibles cohortes y los subíndices los tamaños de muestra. Las letras pequeñas asociadas a los clusters internos de los grupos representa los subgrupos que se utilizaron en el análisis de la estructura de temporal de tallas y estadios de madurez.....	37
Figura 10. Frecuencias génicas esperadas de los marcadores nulos (homocigotos para la ausencia de banda) para la serie OPc (Operon Technologies), utilizando el estimador insesgado de q (Lynch y Milligan 1994). Las líneas bajo la horizontal inferior, identifican a los marcadores producto de cada cebador. Las letras en las esquinas superiores derechas identifican al grupo para el que se estimó q	39
Figura 11. Asociación y distancia genética entre los grupos de individuos sugeridos por el árbol de mayor parsimonia construido con el PHYLIP 95. Los grupos A-F corresponden a los de la Figura 9.....	40
Figura 12. Ocurrencia y estructura de edades y tallas de los subgrupos de calamar gigante en el Golfo de California. Los subgrupos corresponden a los clusters internos de los grupos generados por el algoritmo Fitch-Margoliash, representados en la Figura 9.....	43
Figura 13. Asociación y distancia genética entre los grupos modales de tallas basados en el agrupamiento de los individuos por parsimonia.....	44
Figura 14. Patrón de movimientos de los cohortes putativos de calamares gigantes del Golfo de California. Los círculos de contorno continuo representan organismos maduros; los círculos punteados, inmaduros. Las flechas de base recta indican aportes sin huella histórica (ascendencia). Las flechas estilizadas en blanco representan ascendencia dudosa, y la grises, ascendencia directa. En la esquina superior derecha, la cohorte. Los círculos no delimitan ninguna zona referenciada geográficamente, sólo señalan una tendencia de agrupamiento.....	57

INTRODUCCIÓN

A pesar de la creciente necesidad del establecimiento de un plan de aprovechamiento integral y racional de los recursos pesqueros a nivel mundial, los esfuerzos del sector científico por obtener información biológica dirigida al entendimiento de la dinámica poblacional de algunas de las especies explotadas (distribución, abundancia, crecimiento, fecundidad y la estructura de sus poblaciones), no han sido suficientes. Existen aún algunos aspectos críticos (p.e. identidad y límites de los *stocks*, naturaleza de las fluctuaciones naturales de las poblaciones) que requieren mayor resolución y que, en teoría, permitirían integrar los parámetros biológicos del recurso a modelos pesqueros de aprovechamiento sustentable (Carvalho y Hauser 1994). Por ello, se presenta no sólo la necesidad de continuar con la investigación científica de los *stocks* pesqueros explotados actualmente y de las tecnologías más viables para su estudio y extracción, sino de la diversificación racional de ambos aspectos orientados al análisis de las perspectivas y proyecciones de los recursos pesqueros (Clark 1976).

En términos de la diversificación tecnológica, el uso de las herramientas analíticas moleculares para el estudio de las pesquerías se ha incrementado de manera importante durante los últimos años, debido principalmente a la acelerada disponibilidad de nueva tecnología y a un incremento en la atención que se le ha dado al valor de los datos genéticos (Park y Moran 1994). Los estudios de biología molecular y genética poblacional han generado tangibles y promisorios resultados en el proceso de caracterización de *stocks*, determinación de flujo génico y establecimiento de relaciones filogenéticas para muchas poblaciones sujetas a explotación (Carvalho y Hauser 1994, Ferguson 1994). Sin embargo, uno de los aspectos más importantes asociados con el uso de esta tecnología es el hecho de que no sólo puede generar una gran cantidad y calidad de información, sino también reduce tiempo y esfuerzo para la obtención de la misma (Weatherhead y Montgomerie 1991). Esto hace de los estudios genéticos en el nivel molecular, una aproximación atractiva para la investigación de la ecología conductual y la biología de poblaciones con potencial pesquero, particularmente en aquellas para las que no ha podido implementarse una metodología de estudio consistente.

El grupo de los cefalópodos constituye uno de los recursos pesqueros masivos que mayor importancia ha cobrado durante los últimos años en el mercado internacional (Worms 1983, Rathjen y Voss 1987, FAO 1988). La biología de este grupo ha planteado, sin embargo, una

problemática muy particular que dificulta el análisis de la estructura y la dinámica de sus poblaciones sujetas a explotación (Shaw 1997). Los calamares exhiben una elevada plasticidad en su morfología externa y tasas de crecimiento (Pierce *et al.* 1994), lo que se ve reflejado en la dificultad de estudiarlos de manera precisa y consistente con base en variables morfométricas o caracteres merísticos morfológicos obtenidos de la captura comercial. Desafortunadamente, la búsqueda de marcadores bioquímicos y moleculares adecuados para el análisis de las poblaciones de cefalópodos mediante técnicas tradicionales de análisis de variabilidad genética también se ha visto limitada de forma considerable, en parte por la extremada baja variabilidad genética del grupo revelada por dichas técnicas, y por otro lado, debido a la inusual dificultad para ajustar las técnicas estándares de extracción y análisis del ADN a estos organismos (Shaw com. pers)¹.

Aunque pocos, los trabajos que incluyen este tipo de marcadores para el estudio de las poblaciones de cefalópodos son en su mayoría análisis de variantes alozímicas. El polimorfismo de alozimas, introducido hace ya más de tres décadas ha probado tener gran valor en la definición de *stocks* pesqueros (identidad génica) y los niveles de estructuración genética de las poblaciones con potencial de pesca (Carvalho y Hauser 1994, Ferguson 1994); este no ha sido el caso para los cefalópodos. Los bajos niveles de variabilidad detectados en muchas especies del grupo sugieren la existencia de poblaciones panmíticas (Carvalho *et al.* 1992, Brierley *et al.* 1993, Katugin 1993, Suzuki *et al.* 1993, Yetman y Benzie 1993, Brierley 1995) en las que la heterogeneidad de los *stocks*, al parecer, es detectable sólo para aquellos casos en los que existe aislamiento geográfico (distribución discreta), siendo además indispensable analizar un número considerable de muestras (Katugin 1999).

Mediante un análisis de restricción del ADN mitocondrial (RFLP), Norman *et al.* (1994) encontraron niveles de variabilidad genética dentro de los cefalópodos, un orden de magnitud mayor a los detectados con alozimas, pero aun así resultaron extremadamente bajos.

La implementación de las técnicas de análisis directo de las variaciones del ADN ha resultado en una herramienta de alto poder resolutivo en la caracterización de *stocks* (identidad y salud genética poblacional), tasas de migración (flujo génico, filopatría), sistemas de apareamiento (pruebas de paternidad), y aspectos evolutivos (diversificación del grupo panmítico, fenómenos de cuello de botella)[Hoelzel y Dover 1991]. Sin embargo, de nueva cuenta los cefalópodos no han mostrado las bondades de otros grupos con respecto a la aplicabilidad de estas técnicas. Esto se debe, en gran medida, al desconocimiento de la secuencia y de mapas genómicos de estas

¹ Paul Shaw. Department of Zoology. Fisheries Genetics Group. University of Aberdeen, UK

especies, así como a algunos problemas asociados con la dificultad de extraer ADN de buena calidad (Shaw 1997).

Carvalho y Hauser (1994) plantean la importancia y la necesidad de aplicar técnicas acordes con los niveles de variabilidad del recurso que se estudia, pues resulta lógico que mientras mas homogénea resulte una población pesquera, mayor poder de detección de la variabilidad debe ser el común denominador al evaluar sus *stocks*. Hoy en día, los marcadores moleculares con mayor resolución son los microsatélites (variaciones en el número de secuencias cortas repetitivas)[Parker *et al.* 1998], su utilidad para el análisis del grupo de los cefalópodos ha sido demostrada recientemente por Shaw (1997) y Shaw *et al.* (1999) quienes evidenciaron niveles de estructuración muy sutiles mediante el diseño y uso de microsatélites en una especie de calamar del Atlántico norte, y señalan que al parecer este tipo de marcadores serán los que permitan el análisis sistematizado y consistente de las poblaciones de cefalópodos. Sin embargo, el uso de estos marcadores pudiera verse limitado por cuestiones intrínsecas al método: sus altos costos, la elevada inversión de tiempo y esfuerzo que requiere, y la necesidad de entrenamiento especializado para su manejo y análisis (Weatherhead y Montgomerie 1991).

Bajo el esquema planteado, el entendimiento de la dinámica de las poblaciones de cefalópodos se encuentra limitado por la escasez de variables y metodologías de estudio adecuadas, y dado que el grupo presenta diversas características que lo hacen de central interés para el sector pesquero, queda claro que gran parte del esfuerzo deberá orientarse a la búsqueda de las alternativas más viables de estudio.

Particularmente en México, la pesquería del calamar gigante *Dosidicus gigas* en el Golfo de California promete ser una de las que se desarrollarán y tecnificarán muy rápidamente debido a la gran abundancia del recurso y al interés naciente del producto en el mercado internacional (Klett 1996). Lo anterior, aunado a las amplias fluctuaciones interanuales en su abundancia, a la escasa y dispersa información con la que se cuenta sobre el estado actual y la naturaleza de sus agregaciones, e incluso sobre su ciclo de vida y biología básica (Instituto Nacional de la Pesca 1992), hacen del calamar del Golfo de California un candidato prioritario para que su estructura y dinámica poblacional sean estudiadas.

El análisis morfométrico de las capturas de esta especie en aguas del Golfo ha generado una considerable cantidad de información biológica que ha permitido explorar los aspectos básicos de

la biología del recurso, así como la detección de puntos clave en la planeación y el manejo de la pesquería del mismo (Klett 1996). Pero aún cuando este tipo de estudios continúen, el conocimiento necesario sobre las agregaciones actualmente explotadas, y de aquellas consideradas como potenciales para su incorporación a las operaciones de pesca, no avanzará sin un incremento substancial, dirigido, intenso y coordinado en el trabajo de campo. Por otra parte, y como se mencionó anteriormente, existe evidencia de que en otras especies del grupo, este tipo de estudios no parecen suficientemente sólidos para explicar, por sí solos, la dinámica de las agregaciones. Queda entonces manifiesta la necesidad de buscar estrategias distintas para su análisis.

Con el creciente y acelerado desarrollo de nuevas tecnologías para el diseño de marcadores moleculares se han abierto puertas hacia una nueva serie de herramientas de análisis genético. Uno de los ejemplos más recientes y con un potencial de resolución comparable al de los microsátélites, es el de los marcadores RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA by Polymerase Chain Reaction). Desde que Williams *et al.* (1990) y Welsh y McClelland (1990) demostraron su potencial como mapeador génico y como alternativa al “fingerprint”, se ha venido desarrollando todo un trasfondo teórico sobre su aplicabilidad en la determinación de identidad taxonómica (Lynch y Milligan 1994), análisis de parentesco (Lynch 1990, Lynch y Milligan 1994), y para el diseño de sondas génicas específicas (Caetano-Anollés *et al.* 1991^b). Así, aunque aún en desarrollo, el uso de marcadores RAPD-PCR plantean una prometedora fuente de información genética que deberá ser evaluada y validada para poder así remitir su aplicabilidad en el análisis de la estructura y dinámica de los recursos naturales (Williams *et al.* 1990, Welsh y McClelland 1990, Caetano-Anollés *et al.* 1991^a, Parker *et al.* 1998).

Basado en un principio muy sencillo, los RAPD-PCR representan fragmentos genómicos amplificados aleatoriamente, cada uno de los cuales puede ser interpretado como un *locus* con un sistema de dos alelos (presente o ausente). Una de las consideraciones más relevantes, en cuanto al uso de estos marcadores, es su carácter de dominancia; esta condición impide discernir entre marcadores homocigóticos y heterocigóticos. Si bien esto no limita la estimación de las frecuencias alélicas necesarias para el análisis genético de las poblaciones, sí reduce la precisión con la que ésta puede ser medida al contrastarla con marcadores codominantes (p.e. alozimas, RFLP, microsátélites) [Lynch y Milligan 1994].

Entre las principales ventajas de esta técnica tenemos que: (a) Hace posible trabajar con genomas

poco conocidos; (b) requiere cantidades mínimas de ADN (nanogramos); (c) permite el análisis de una cantidad considerable de muestras en cuestión de horas y, quizá la más importante de todas, (e) poseen una alta eficiencia en la detección de variabilidad genética críptica con una considerable reducción en los costos al comparar con cualquier otro marcador bioquímico o molecular disponible hasta la fecha (Hadrys *et al.* 1992, Clark y Lanigan 1993, Tingey y Del Tufo 1993, Parker *et al.* 1998). Pero si bien son muchas las ventajas y la diversidad que presenta el uso de los RAPD, existen también ciertas dificultades y limitaciones que deben ser consideradas. Hadrys *et al.* (1992) destacan que el tamaño del cebador, la sensibilidad a cambios mínimos de las condiciones de reacción, la posibilidad de que el PCR genere bandas no homólogas que comigren en el gel, y la ocurrencia de productos de amplificación no reproducibles, atribuibles a la formación de estructuras secundarias entre los cebadores, son algunos de los factores que deben ser minuciosamente probados para validar la aplicación del método (Rabouam *et al.* 1999).

El potencial de resolución y las aparentes ventajas del uso de los marcadores RAPD motivó a que en este trabajo se evaluara la aplicabilidad de estos marcadores para la obtención de información genética de las agregaciones de calamar gigante del Golfo de California. Esto con el objeto de integrarla y contrastarla con la información existente obtenida de las capturas en la búsqueda de un panorama más claro de la estructura y la dinámica poblacional de un recurso pesquero con proyecciones inmediatas de explotación.

Antecedentes

El calamar gigante (*Dosidicus gigas*) es una de las siete especies de cefalópodos de importancia comercial que se distribuyen en aguas del Pacífico mexicano (Voss 1979). *D. gigas* es una especie oceánica gregaria y migratoria del Pacífico Oriental. Se distribuye desde Monterey, Cal. E.U.A., hasta el norte de Chile (Nesis 1983, Wormuth 1976). Alcanza tallas superiores a los 70 cm de longitud de manto, aunque las capturas predominantes corresponden a individuos de 30 a 45 cm de longitud de manto. La pesca del calamar se realiza generalmente durante la noche, con líneas de potera operadas manual o electromecánicamente (actualmente en el Golfo se realiza sólo en forma manual), previa atracción luminosa del recurso (Klett 1996).

En el Golfo de California se ha identificado un solo *stock* compuesto de varios cohortes, con elevadas tasas de crecimiento ($k \sim 0.25$) y mortalidad natural (0.1 mes^{-1}), cuyas principales zonas de agregación, y por ende de pesca se localizan principalmente frente a la costa oriental de la Península de Baja California en primavera-verano, y la porción oriental del Golfo en invierno

(Klett 1981). Actualmente, la pesquería de esta especie en aguas del Golfo representa el segundo recurso pesquero en cuanto a la derrama económica y al tonelaje bruto de captura, superado sólo por el camarón y la sardina, respectivamente (Instituto Nacional de la Pesca 1998).

De 1974 a 1977 el recurso se explotó artesanalmente frente a las costas de Loreto y Santa Rosalía, B.C.S., pero a partir de 1978 la flota incrementó su poder de pesca con la incorporación de embarcaciones mayores introducidas, en su mayor parte, por inversionistas extranjeros atraídos por el éxito alcanzado en la pesquería (Sato 1976, Klett 1996). La producción máxima se alcanzó en 1980 con un total de 22,464 toneladas, para colapsarse en 1982 debido, en apariencia, a una excesiva presión de pesca sobre los componentes reproductores de la población, en combinación con condiciones ambientales desfavorables generadas por el ENSO 1982-1984 (Ehrhardt y Jaquemin 1983). De 1982 a 1989 el recurso se aprovechó sólo en forma artesanal, a pequeña escala y por embarcaciones menores, destinando el producto para consumo local. Como resultado de las actividades prospectivas efectuadas en 1989 por las instancias gubernamentales, y que abarcaron la mayor parte de la Zona Económica Exclusiva, se detectaron concentraciones importantes frente a Bahía Magdalena, B.C.S. y en la Boca del Golfo de California que generaron una producción de 5,000 toneladas, en 1994, y de 25,000 toneladas en 1995 (Sánchez-Juárez 1991, De la Rosa *et al.* 1992). Considerando las capturas de 1990-1991, De la Rosa *et al.* (1992), estimaron una población de 175 millones de individuos y un reclutamiento promedio de 100 millones de individuos. El potencial pesquero del recurso se ha estimado en 22,000 toneladas para el Golfo de California y 210,000 toneladas para el área comprendida entre la boca del Golfo hasta las Islas Revillagigedo, en el Pacífico Mexicano (Leal-Ocampo 1994).

Debido principalmente a problemas metodológicos, mucha de la información sobre esta especie es aún fragmentaria. A pesar de la información generada referente a su crecimiento (Ehrhardt y Jaquemin 1982^a) y de reproducción (Nesis 1970, Klett 1981, Ehrhardt *et al.* 1986, y Michel *et al.* 1986), no se conocen aun muchos aspectos sobre la dinámica de la población del calamar gigante en el Golfo de California. La mayor parte del conocimiento sobre el ciclo de vida de esta especie está basado en observaciones muy localizadas en tiempo y espacio, además de que la información con la que se cuenta, resulta paradójica.

Con base en la secuencia estacional de los índices y tallas de captura del recurso, Klett (1981) describe el proceso migratorio dentro del Golfo de California y determina que tiene un carácter estacional. De acuerdo con sus observaciones, durante la primavera los calamares inician su

desplazamiento desde la región oceánica hacia las zonas costeras, para concentrarse frente a Guyamas, Son., y Santa Rosalía, Bahía Concepción y Loreto, B.C.S. En el verano el recurso alcanza un máximo de abundancia frente a Santa Rosalía, aparentemente asociado con sus actividades de reproducción. Durante el otoño, las capturas disminuyen debido a la dispersión post-reproductiva del recurso hacia la zona central y hacia afuera del Golfo. En el invierno, el recurso se encuentra concentrado en la región de la boca del Golfo para posteriormente desplazarse a lo largo de la costa oriental del mismo. Este patrón ha sido confirmado por las observaciones de Ehrhardt *et al.* (1986), que sugieren que la presencia y abundancia de la especie en el Golfo de California es altamente dependiente de los aportes poblacionales procedentes del exterior.

La situación planteada arriba se complica al considerar que el *stock* de calamar gigante del Golfo de California contiene entre dos y cuatro cohortes, con patrones de migración, tasas de crecimiento y mortalidad natural aparentemente independientes (Ehrhardt y Jaquemin 1982^a, Ehrhardt *et al.* 1986, Guerrero *et al.* 1992). De acuerdo con Ehrhardt y Jaquemin (1982b^b) el reclutamiento de estos componentes poblacionales sucede entre enero y abril, lo que podría explicar la prolongada y extensiva actividad reproductiva del recurso caracterizada por la presencia de al menos tres picos anuales: de diciembre a enero, de mayo a junio, y de septiembre a octubre (Klett 1981, Ehrhardt *et al.* 1986, Michel *et al.* 1986).

Existe, sin embargo, un controversial desconocimiento sobre la distribución de los jóvenes de la especie, que aunado al supuesto carácter semélaro de la especie (Markaida, com. pers²), complica la dilucidación de si los individuos de mayor talla son animales de edad avanzada que han alcanzado por primera vez la madurez sexual, o si pudieran estarse reproduciendo más de una vez durante su vida. Resulta difícil de entender cómo es que algunos individuos de *D. gigas* con una longevidad máxima de 14 meses (evaluada mediante anillos de crecimiento en estatolitos), alcanzan tallas de hasta 65 cm sin haber aún madurado sexualmente, mientras que otros maduran apenas rebasados los 30 cm. Consecuentemente, ante la imposibilidad actual de definir estos últimos dos aspectos, las estimaciones de producción, crecimiento y reclutamiento realizadas previamente pierden confiabilidad.

En resumen, debido a las amplias fluctuaciones observadas en los niveles de disponibilidad del recurso, sus elevadas tasas de crecimiento y mortalidad natural, su potencial interacción con otras

pesquerías (Ehrhardt 1991), y su tendencia a concentrarse en áreas cercanas a la costa, el calamar gigante ha sido clasificado como un recurso con una dinámica poblacional compleja y altamente inestable, especialmente en el contexto de una explotación comercial a gran escala (Klett 1996). No obstante, los volúmenes de captura obtenidos artesanalmente con un esfuerzo pesquero de mediana escala constituyen un importante foco de interés tanto para pescadores ribereños como para pequeñas compañías pesqueras, pues ofrece una alternativa ante la ausencia o excesivo esfuerzo dedicado a la captura de otros recursos pesqueros. Ésto ha promovido un creciente aprovechamiento del recurso y una justificada preocupación por parte del Instituto Nacional de Pesca por no llegar a la sobreexplotación del mismo, en particular por el hecho de que las agregaciones del recurso, que incrementan la disponibilidad hacia el arte de pesca, aparentemente están relacionadas con actividades de tipo reproductivo.

Destacan entonces dos aspectos de relevancia que deberán ser evaluados con el objeto de definir la situación actual del recurso calamar gigante: la estructura de sus agregaciones y su migración. Para tal efecto diversos grupos de investigación, principalmente de los CRIP (Centro Regional de Investigación Pesquera) y del CICESE (Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada) han venido desarrollando diversas investigaciones con el objeto de localizar, tanto en tiempo como en espacio, las agregaciones de calamar gigante; incluyendo estudios sobre su abundancia, biología básica (edad, crecimiento y reproducción) y demografía (densidad, crecimiento poblacional, mortalidad y sobrevivencia, etc.). Como ya se comentó, para obtener información confiable sobre la estructura de dichas agregaciones mediante el análisis de la distribución y abundancia de clases de edad y talla, se requeriría de un esfuerzo intenso y coordinado para evaluar la composición de las capturas comerciales y artesanales de la especie. Un estudio de esta naturaleza llevaría implícito una fuerte inversión de tiempo y que arrojaría dichos resultados sólo a mediano plazo. Si además de lo anterior consideramos los problemas metodológicos asociados con el análisis de las variables morfométricas en los cefalópodos planteados anteriormente, resulta obvio que deben aplicarse metodologías de estudio que permitan una obtención de resultados prácticos a menor plazo; la implementación del uso de marcadores genéticos podría ser la alternativa.

² M. en C. Unai Markaida Aburto. Laboratorio de Pesquerías. CICESE, Ensenada, B.C.

AREA DE ESTUDIO

El Golfo de California es un mar marginal que se localiza entre la Península de Baja California y la porción continental del territorio nacional, en el Noroeste de México, comunicado con el Océano Pacífico en su extremo sur.

El elevado y extenso sistema montañoso de la Península de Baja California, establece una barrera hacia el efecto moderador del Océano Pacífico, lo que promueve un clima mucho más continental que oceánico dentro del Golfo. Dadas sus dimensiones (210,000 km²) y su situación geográfica, dentro de una región predominantemente árida, el Golfo constituye una gran cuenca de evaporación en la que las condiciones meteorológicas presentan amplias variaciones diarias y estacionales de la temperatura, baja humedad y fuerte irradiación solar (Roden 1964). Las temperaturas superficiales del Golfo, comparadas con las de las masas de aguas vecinas del Pacífico, son más cálidas de abril a septiembre y similares el resto de año. Las variaciones de la temperatura superficial promedio van desde los 9°C en la región de la boca, incrementándose hasta los 22°C en la cabeza. El promedio anual de la temperatura es relativamente alto (24°C) y fluctúa entre los 19 y los 30 °C (Roden y Emilsson 1979).

Debido a la evaporación, la salinidad promedio en el Golfo es entre 1 y 2 ‰ más elevada que en aguas de latitudes comparables (Alvarez-Borrego y Lara-Lara 1991).

El efecto de las mareas, los vientos, el calentamiento por irradiación y la interacción con el O. Pacífico, producen una circulación vigorosa en el Golfo (Badán-Daugón *et al.* 1985). La masa de agua de la región norte es de origen local, formada por enfriamiento y evaporación excesiva en el invierno, y por calentamiento y evaporación durante el verano. En cambio, la masa de agua de la porción sur es más parecida a la del océano adyacente, pero modificada en la superficie por la evaporación excesiva comparables (Alvarez-Borrego y Lara-Lara 1991, Santamaría del Angel *et al.* 1994). Durante el invierno, y a principios de primavera, agua del Pacífico Oriental Tropical ocupa la porción de la boca del golfo, invadiendo gradualmente hacia el interior desde principios de primavera y hasta el otoño, sin alcanzar a rebasar la región de las islas Tiburón y Angel de Guarda (Roden 1958).

En términos de productividad, en el Golfo se presentan valores excepcionalmente altos para una

región subtropical. Masas de agua pobres en oxígeno y con concentraciones elevadas de nutrientes se encuentran en los estratos superficiales de la columna de agua, y se requiere relativamente poca energía para llevarlas a la zona eufótica. Esto, aunado al patrón de vientos, en el que predominan los noroestes durante invierno-primavera y los surestes durante verano-otoño, permiten una amplia ocurrencia de eventos de surgencia en las costas oriental y occidental del Golfo (Alvarez-Borrego y Lara-Lara 1991).

En el Golfo operan elevadas tasas de mezcla a diferentes escalas temporales, pero a pesar de ello puede considerarse que la producción orgánica, y de ahí el contexto ecológico, presenta una modulación biestacional, con condiciones de invierno operando desde finales de noviembre y hasta mediados de junio, y condiciones de verano durante el resto del año (Badán-Dangón *et al.* 1985, Santamaría del Angel *et al.* 1994).

La porción central del Golfo de California es el área en donde ocurren las mayores agregaciones de calamares gigantes en el Golfo de California (Figura 1). Particularmente Guaymas, en Sonora, y Santa Rosalía, en Baja California Sur, son las localidades de mayor importancia en cuanto a la abundancia del recurso y, por ende, donde se concentra el esfuerzo pesquero (Klett 1996). Es en esta porción en donde se presentan algunas de las mayores profundidades del Golfo (García-Silva *et al.* 1996), y eso aunado a la topografía de la zona costera, con plataformas continentales pronunciadas a pocos metros de la costa (Nava-Sánchez *et al.* 1998), y a la presencia de sistemas insulares, muy probablemente favorezcan un aporte sostenido y renovado de agua rica en nutrientes durante los eventos de surgencia. El potencial pesquero de la zona, que incluye importantes capturas de sardina y camarón, además de las de calamar gigante, bien pudiera ser reflejo de la importancia ecológica la misma.

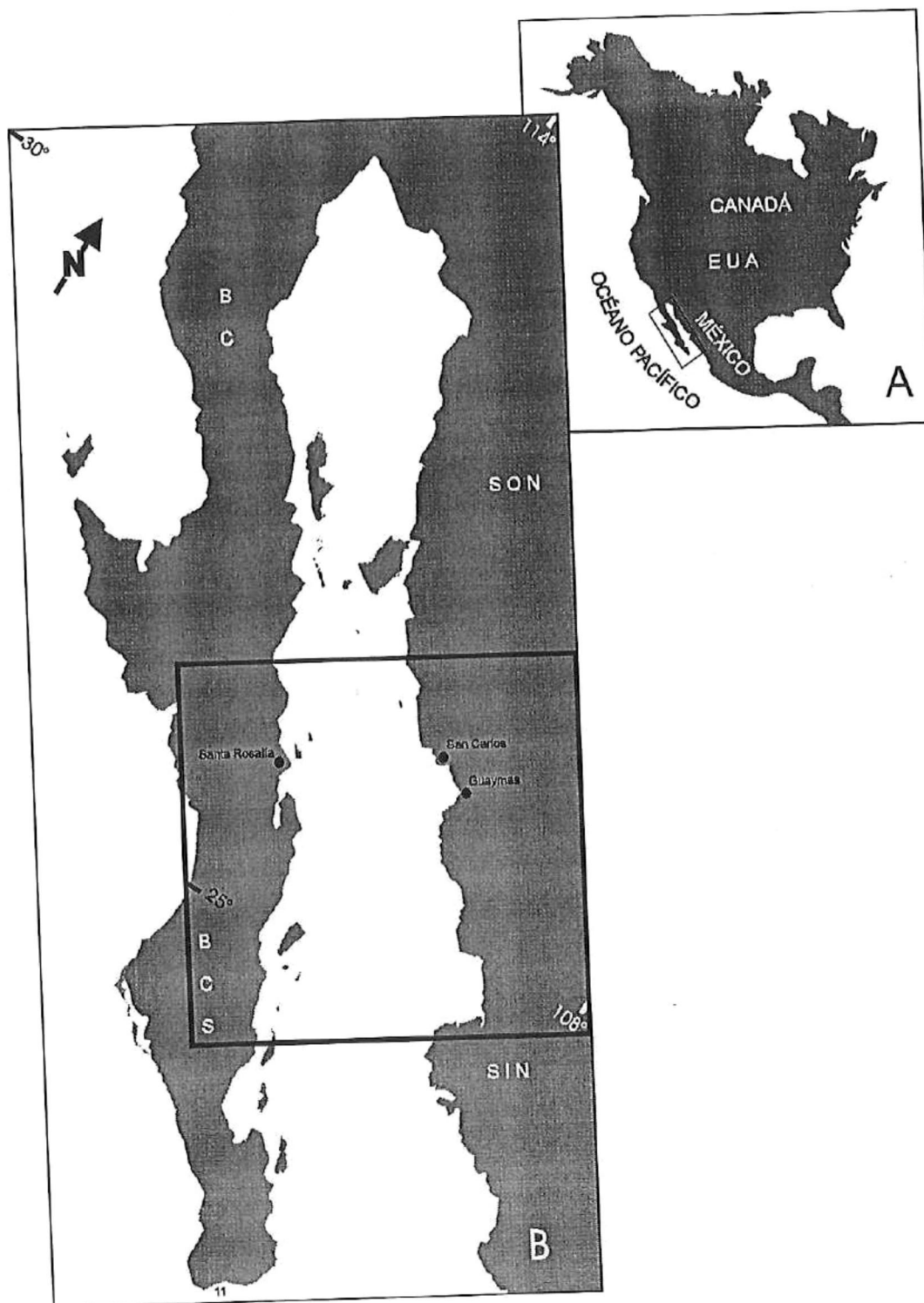


Figura 1. Localización del área de estudio

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de las muestras

El presente trabajo se planteó como parte integral del proyecto “La biología del calamar gigante *Dosidicus gigas* en el Golfo de California, México”, investigación que se ha venido desarrollando en el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada desde 1995. De las visitas mensuales realizadas a las zonas de captura comercial se cuenta con una base de datos que incluye los datos morfométricos y las observaciones macroscópicas del sistema reproductivo que permitieron la identificación del sexo y la asignación del estadio de madurez de las gónadas. Las categorías de madurez gonádica se determinaron de acuerdo con el criterio propuesto por Lipinski (1979).

Se colectaron estómagos, gónadas y estructuras duras (*gladium*, estatolitos y picos), que se analizaron para determinar los hábitos alimenticios, estrategias reproductivas y estimar edad y crecimiento de la especie, respectivamente. Este material fue procesado en el laboratorio tiempo después de la colecta y análisis de las capturas comerciales, por lo que las masas bucales, la porción cefálica y parte del manto se mantuvieron congelados a -20°C , y los estómagos y gónadas se preservaron en etanol al 70%. Para efectuar los análisis moleculares se tomó una pequeña porción de músculo esquelético del manto o masa bucal de 400 calamares gigantes colectados en dos localidades del Golfo de California, en las que se concentró el esfuerzo de pesca artesanal de calamar gigante durante 1995 - 1998: Guaymas, Son. y Santa Rosalía, B.C.S.. Aproximadamente, 1 g de tejido de cada espécimen se transfirió a microtubos plásticos de 1.5 ml, los cuales fueron etiquetados y se almacenaron a -70°C hasta el momento en que se procesaron.

Extracción del ADN

De 20-30 mg de músculo esquelético de cada muestra fueron homogenizados manualmente sobre un portaobjetos con ayuda de una hoja de bisturí esterilizada, y transferidos a otro tubo para digerir el tejido. La digestión se efectuó por 48-120 h a 27°C en 250 μL de buffer TEN (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, y EDTA 1 mM en H_2O) conteniendo 5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de Proteinasa K y 1% de SDS. Para el aislamiento y purificación del ADN se llevó a cabo una primera extracción en un volumen de fenol equilibrado (pH 8.1), seguida de dos extracciones en un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y, por último, un lavado en un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Para la precipitación de ADN-ARN se usaron 2 volúmenes de etanol al 99% y se realizó un lavado final en etanol al 70%. Invariablemente se centrifugó a 12,000 rpm y a temperatura ambiente.

El precipitado de ácidos nucleicos se secó durante 8 h a temperatura ambiente y se resuspendió por 12 horas en 20 μl de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM) a 37°C. Mediante una electroforesis preparativa se evaluaron la cantidad y la calidad relativas de la extracción. Se utilizaron geles de agarosa al 0.8% con una concentración de 0.5 μg de bromuro de etidio por mililitro de gel (0.8 % Agarosa_{EtBr}). Se cargaron en el gel 2 μl del producto de la extracción ADN-ARN y se corrieron durante 45 min a 80 V, visualizando el rendimiento de la extracción en una mesa de luz UV. Debido a la alta concentración de ARN en las muestras (ca. 300 mg ml⁻¹), se agregaron 0.001 mg ml⁻¹ de ARNasa A SIGMA® y se incubaron por 24 h a 37°C.

Principio de la técnica RAPD y estandarización del método

Para amplificar ADN genómico (PCR), esta técnica utiliza un solo oligonucleótido cebador, cuya secuencia es aleatoria y sin extremos complementarios. La amplificación resulta positiva para aquellas regiones del genoma flanqueadas por un par de sitios con la orientación apropiada para el anclaje del cebador y cuya posición no exceda las 5000 pb (distancia entre los sitios). Los productos amplificados se separan por electorforesis y las diferencias observadas en los patrones de los fragmentos se interpretan como polimorfismos en el ADN. Los fragmentos pueden ser manejados como marcadores genéticos dado que su heredabilidad sigue los principios de segregación Mendelianos (Williams *et al.* 1990), y su análisis se realiza considerando cada marcador como sistemas locus de dos alelos en los que sólo pueden distinguirse los homocigotos para el marcador nulo (Lynch y Milligan 1994).

La validación del uso de los fragmentos RAPD como marcadores genéticos puede ser sustentada sólo mediante un procesado sistemático y preciso de las variables que intervienen en la amplificación por PCR. La calidad (integridad y peso molecular) y concentración del templete de ADN, la proporción cebador-templete, la precisión en la preparación de la mezcla de PCR y en los ciclos de temperatura durante la incubación, así como la alta sensibilidad de la técnica a la contaminación (ADN exógeno) e incluso al tipo de microtubo empleado son, *a priori*, las variables que merecen mayor atención y que requieren ser controladas concienzudamente antes de poder usar los fragmentos RAPD en la estimación de parámetros genéticos; variaciones mínimas en el procesamiento de las muestras limitan la reproducibilidad del método, y por ende, la confiabilidad de los resultados así obtenidos.

Aunado a los cuidados mencionados anteriormente, existen, *a posteriri*, ciertos métodos de

comprobación que recomendablemente deben seguirse para reducir las fuentes de sesgo y no dar una interpretación errónea de los patrones de bandas observados (p.e. hibridación por southern blotting). El uso sistemático de estos métodos, ampliaría el conocimiento sobre la naturaleza de la información que generan los RAPD, ya que factores tales como los rearrreglos del templete o de los cebadores durante la amplificación del ADN y la potencial formación de fragmentos comigrantes no homólogos, introducen un sesgo de magnitud desconocida que desafortunadamente no puede ser controlado (Hadrys *et al.* 1992, Clark y Lanigan 1993, Isabel *et al.* 1999, Rabouam *et al.* 1999).

Con el objeto de excluir al máximo las fuentes de variación “*a priori*”, se llevaron a cabo una serie de pruebas sistemáticas en las que se evaluó la reproducibilidad de los patrones de bandas generados por RAPD-PCR y que se utilizarían, en una segunda etapa, como marcadores genéticos. Cada prueba se realizó por duplicado y las diferencias para cada tratamiento se contrastaron por medio de un ANOVA (Sokal y Rohlf 1981). Las pruebas que se efectuaron consistieron en:

- (a) Evaluar el efecto de la calidad del templete en grupos de muestras con diferentes niveles de degradación del ADN. Se consideraron como posibles fuentes de degradación: el tiempo (fecha de colecta) y el estado de preservación de la muestra, el tiempo que estuvo sujeto el tejido a las enzimas digestoras durante el proceso de extracción, el periodo de congelamiento de las muestras de ADN, y por último, las posibles diferencias relacionadas con el origen del tejido muscular empleado (manto o masa bucal).
- (b) Evaluar las variaciones en las condiciones de la amplificación debidas a cambios en la concentración de los componentes de la mezcla de reacción (Mg, dNTP, Taq polimerasa, cebador y templete).
- (c) Evaluar el rendimiento de diferentes condiciones de amplificación (termociclos) y de la optimización por reducción del tiempo total de procesado en el termociclador. Asimismo, se compararon los patrones de bandas generados al emplear diferente aparato termociclador.

Condiciones de amplificación para los RAPD

Se utilizaron oligonucleótidos cebadores (10 bases) de la serie comercial Operon-C (OPERON TECHNOLOGIES) diseñados con el contenido específico de G+C requerido para RAPD. Las reacciones de amplificación se efectuaron con el mismo lote comercial de microtubos de 0.5 ml (GeneAmp® PCR Reaction Tubes) y en termocicladores Perkin-Elmer DNA Thermal Cycler 480. Las mezclas de PCR se prepararon con el mismo lote de reactivos (GIBCO BRL), al menos para cada cebador, y en un volumen suficiente para procesar todas las muestras de una corrida con el

objeto de reducir al mínimo la variación en la concentración de los componentes de la reacción al interior de las corridas. Las condiciones de amplificación (mezclas y ciclos PCR) se determinaron de forma experimental para cada cebador usando como base los métodos sugeridos por Williams *et al.* (1990), Don *et al.* (1991), Higuchi *et al.* 1993, Yu y Pauls (1994), Abo-elwafa *et al.* (1995), y Maki y Horie (1999), Rafalski *et al.* (1991).

Debido a que la concentración del template de ADN es una de las fuentes de sesgo más importantes durante las pruebas de estandarización de las condiciones para los RAPD (Yu y Paul 1992, 1994; Rabouam *et al.* 1999), ésta fue determinada, en primera instancia, con lecturas en un espectrofotómetro Ultrospec 2000 (PHARMACIA BIOTECH) y ajustada posteriormente con una serie de estándares electroforéticos en función de la concentración estimada por detección EtBr y luz UV.

Los productos de amplificación se separaron en geles de agarosa_{EtBr} al 1.4 % usando TAE (Tris-acetato de sodio 40mM, EDTA 1mM) como buffer de electroforesis. Se cargaron precisamente 10 ml de los productos de PCR de cada muestra y se corrieron durante 2.4 h a 100 V. Cada línea de pozos en el gel fue referenciada con tres marcadores de peso molecular estándar; un marcador con incrementos de 500 pb en los extremos y marcador con incrementos de 250 pb en el centro (Figura 6). Los patrones de bandeo fueron visualizados con luz UV y registrados con película instantánea Polaroid® (Type 667).

Es importante señalar que tanto para las corridas de PCR como para las corridas electroforéticas, las muestras fueron sorteadas para evitar amplificar simultáneamente, o correr en carriles adyacentes siguiendo algún orden preestablecido. Sólo un grupo de 20 muestras, que se corrió por duplicado con el objeto de reconfirmar la estandarización del método e incrementar la confiabilidad de los resultados, se analizaron en conjunto para cada uno de los cebadores.

Los registros fotográficos fueron analizados directamente con ayuda de una regleta, previa estimación de los pesos moleculares de los marcadores seleccionados. Las distancias recorridas por los marcadores y los estándares de peso molecular se calcularon con ayuda del programa AutoCAD para obtener el retrocálculo de su peso molecular estimado. En función del peso molecular, se le asignó un código, siguiendo la nomenclatura propuesta por Paran *et al.* (1991), para cada fragmento bien diferenciado. Considerando que sólo aquellos marcadores con una resolución lo suficientemente adecuada estarían sujetos a ser registrados sin ambigüedad por cualquier observador, las bandas con pobre definición no fueron registradas. Cada fotografía (2

líneas de 19 muestras) se revisó en dos ocasiones, y se capturaron de forma independiente los datos de cada lectura.

Durante la primera revisión se analizaron todas las muestras para el primer cebador, todas las muestras para el segundo cebador, y así sucesivamente. En contraste, para la segunda revisión las fotografías fueron sorteadas y analizadas sin ningún orden preestablecido. La información así obtenida fue capturada siguiendo un formato binario (0 = ausencia del marcador, 1 = presencia del marcador) en una base de datos, lo que permitió contrastar los archivos de ambas revisiones mediante el uso de una búsqueda en tablas cruzadas (“crosstable query”). Aquellas incompatibilidades en los archivos fueron reevaluadas directamente en los registros fotográficos.

Análisis exploratorio con los datos genotípicos crudos.

Los registros de los patrones de bandas para cada cebador fueron contrastados sitio por sitio y entre todos los individuos, asignándole un código alfa-numérico a cada patrón distintivo. Este código fue considerado como un identificador de genotipos. El número de genotipos únicos en cada grupo de comparación, así como la proporción de individuos con dicho genotipo, fueron interpretados como una medida de diversidad genética.

Con el objeto de establecer con más detalle si los individuos recolectados formaban grupos “naturales” que pudieran ser explicados por caracteres (*loci*) de mayor peso o importancia que controlaran el proceso de agrupación, las secuencias se analizaron con el algoritmo de parsimonia del polimorfismo y Dollo del programa PHYLIP 95[®] (Felsenstein 1989). Este algoritmo construye el árbol filogenético de mayor parsimonia a partir de caracteres discretos con dos estados: presencia (1) y ausencia (0). Se utilizó un criterio parsimonioso intermedio (Threshold value = 5.0) y se factorizaron los marcadores en función de cada cebador, incorporando 100 réplicas generadas por bootstrap. Los árboles generados se analizaron con el algoritmo de mayor consenso del PHYLIP 95[®].

Estimación de los parámetros genéticos poblacionales

El tratamiento de los datos presupone que cada *locus* puede ser considerado como un sistema de dos alelos cuya diferencia es la presencia o la ausencia de la característica de ser reconocido por el cebador y amplificado por PCR. El alelo “nulo” (ausencia de banda) no amplifica debido a una delección en el sitio de acoplamiento con el cebador, o bien por que una inserción ha incrementado

la distancia entre los sitios de reconocimiento hasta el punto en el que excede la capacidad de síntesis por PCR; el mecanismo por el que se da la condición de amplificación nula es irrelevante para el desarrollo teórico del análisis de datos de esta naturaleza (Lynch y Milligan 1994).

Se estimaron las frecuencias génicas esperadas de los alelos nulos q' para todos los *loci* y sus varianzas asociadas (Ec. 1-3, Apéndice B). La diversidad genética intrapoblacional (H'_j) y la varianza de este estimador se calculó mediante una aproximación equivalente a la heterocigocidad esperada en equilibrio (Ec. 4-6, Apéndice B). Se estimó la diversidad genética interpoblacional (subdivisión poblacional) por medio de la heterocigocidad en exceso (Ec. 7-9, Apéndice B). Las varianzas de los estimadores de diversidad génica intra e interpoblacional se calcularon a partir de 100 simulaciones generadas por bootstrap (Crowley 1992). Paralelamente se calcularon los índices de similitud intra e interpoblacionales con la proporción de bandas “homólogas” compartidas (Ec. 10 y 11, Apéndice B). Todos los cálculos mencionados, se efectuaron en el programa GENECITO[®] desarrollado por A. Jaramillo.³

Por último, la partición de la varianza de la heterocigosis intrapoblacional en sus componentes muestrales se calculó sustrayendo de la variancia total, la variación asociada a los loci, a los individuos y a los grupos contrastados (Ec. 12-16, Apéndice B).

Para todos los cálculos se incluyó el criterio de “purga” (Lynch y Milligan 1994, Isabel *et al.* 1999) de los alelos o bandas (marcadores) cuyas frecuencias observadas fueran menores que $[1 - (3/N)]$, donde N es el número de individuos incluidos en la muestra. De esta manera se obtiene un estimador insesgado de los parámetros genéticos de las poblaciones para marcadores RAPD.

Criterios de selección de los grupos de análisis para las agregaciones de calamar.

Un primer criterio consistió en comparar entre años y entre localidades con el objeto de inferir si el conjunto de datos debía ser analizado de forma estratificada. Posteriormente los datos fueron reorganizados organizando submuestras que permitieran establecer homogeneidad o heterogeneidad genética entre clases de tallas y madurez gonadal. Por ser los dos criterios anteriores los de carácter primario, se continuó en un segundo nivel al comparar esos mismos criterios por años, por localidades de captura y por sexos. Finalmente se efectuó el análisis de los datos a nivel mensual.

³ M en C. Armando Jaramillo Legorreta. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas.

Los estimadores de subdivisión poblacional (índices de similitud/disimilitud y heterocigosis en exceso) se incorporaron como matrices de distancia y se analizaron con el algoritmo de Fitch-Margoliash (Felsenstein 1989, Weir 1996). del programa PHYLIP 95[®], utilizando el promedio de 100 subréplicas generadas por bootstrap. El porcentaje promedio de desviación estándar generado en la construcción del fenograma, se utilizó como indicador de la confiabilidad en los patrones de agrupamiento obtenidos.

Finalmente, el análisis detallado de la asociación entre individuos, se efectuó comparando el árbol de mayor consenso, generado con el algoritmo de parsimonia, con un dendrograma TreeClustering-STATISTICA[®], basado en el método de agrupamiento de Ward y distancias equivalentes al porcentaje de disimilitud. Por último, la matriz de similitud obtenida de las 100 replicaciones por bootstrap se utilizó para construir un fenograma por medio del algoritmo de FITCH (Fitch-Margoliash) del programa PHYLIP 95[®]. Estos tres árboles se analizaron, de nueva cuenta, por medio del algoritmo CONSENSE (mayor consenso) del programa PHYLIP 95[®], contrastando específicamente contra el árbol de mayor parsimonia (“predeterminado”).

RESULTADOS

Condiciones de amplificación para los marcadores RAPD.

Las pruebas para seleccionar las condiciones óptimas para los cebadores empleados evidenciaron que las variables que impedían la obtención de patrones consistentes de bandeo, fueron la calidad del template de ADN (Tabla I, Figura 2A) y las variaciones en la mezcla de reacción (Tabla I, Figura 2B), la primera con un efecto significativo entre tratamientos y entre réplicas, mientras que la segunda, asociada principalmente con la concentración de $MgCl_2$, exhibió diferencias significativas sólo entre tratamientos. A excepción de la degradación "de origen", para el resto de las variables, a pesar de que se presentaron diferencias en el número de bandas entre tratamientos, las réplicas dentro de ellos no mostraron diferencias (Figura 3). Por lo anterior, después de una segunda electroforesis preparativa, sólo aquellas muestras con ADN de alto peso molecular y sin evidencias de degradación fueron seleccionadas para su posterior análisis y almacenadas a $-70^{\circ}C$ (Tabla II).

Tabla I. Análisis de varianza de los patrones de bandeo para 20 muestras seleccionadas al azar con dos réplicas para cada tratamiento. Se indican la significancia de la prueba de homocedasticidad de Levene, las varianzas asociadas a los tratamientos, al error, y la significancia del estadístico F.

	p_{Levene}	SC	g.l.	CM	SCe	g.l.e	Cme	F	p
Calidad ADN	0.8996	353.54	3	117.84	1725.15	76	22.67	5.190	0.0026
Cantidad ADN	0.9999	92.45	3	30.81	1837.50	76	24.18	1.270	0.2891
Congelamiento	0.9997	0.60	3	0.20	1851.40	76	24.36	0.008	0.9989
Digestión	1.0000	0.00	3	0.00	1843.80	76	24.26	0.000	1.0000
Tejido	0.9985	0.25	3	0.08	1829.70	76	24.08	0.004	0.9997
Termociclo	0.9999	92.45	3	30.81	1837.50	76	24.18	1.275	0.2891
Termociclador	1.0000	80.00	3	26.66	1843.80	76	24.26	1.099	0.3547
Mezcla PCR	0.1737	583.20	3	194.40	1431.00	76	18.83	10.33	0.0000

Tabla II. Relación de las muestras de calamar gigante procesadas para la extracción de ADN. Entre paréntesis el número de muestras que no mostraron degradación de ADN y que se incluyeron en los análisis genéticos.

Fecha	Localidad	No. Muestras	Muestras sin degradación
Marzo 1996	Guaymas, Son.	48	38
Abril 1996	Guaymas, Son.	27	12
Junio 1996	Guaymas, Son.	38	37
Agosto 1996	Santa Rosalía, B.C.S.	30	22
Septiembre 1996	Santa Rosalía, B.C.S.	30	25
Octubre 1996	Santa Rosalía, B.C.S.	42	40
Noviembre 1996	Guaymas, Sonora.	18	18
Enero 1997	Guaymas, Sonora.	22	19
Febrero 1997	Guaymas, Sonora.	22	21
Marzo 1997	Guaymas, Sonora.	43	43
Abril 1997	Guaymas, Sonora.	27	20
Junio 1997	Santa Rosalía, B.C.S.	23	19
Mayo 1998	Santa Rosalía, B.C.S.	20	16

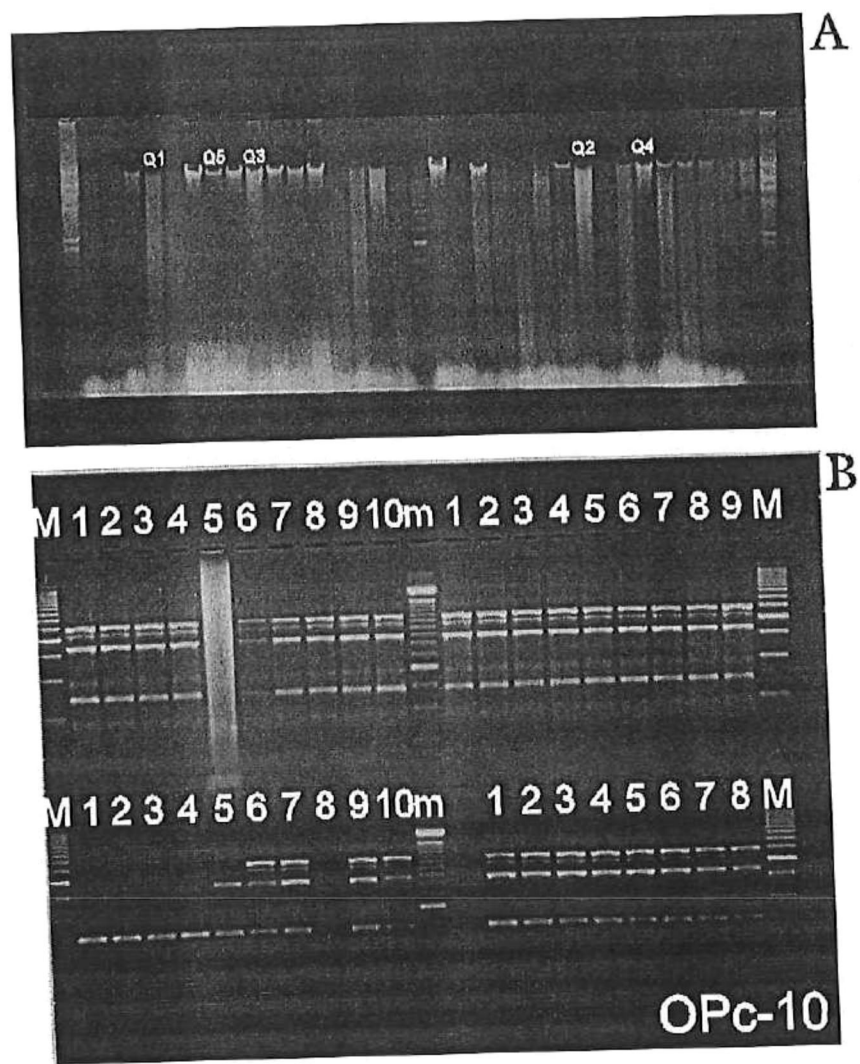


Figura 2. Efecto de la degradación del template de ADN y de la mezcla de PCR empleados para la amplificación de fragmentos RAPD-PCR en el calamar gigante *Dosidicus gigas*. En (A) se indican los criterios de clasificación del estado de degradación de la muestra: Q1 es un template sumamente fragmentado que produce un barrido a lo largo del carril, Q5 es un template íntegro que se observa como una banda bien definida de alto peso molecular, Q2-Q4 son niveles graduales entre Q1 y Q5. En (B), los patrones de bandas amplificados con el cebador Opc-10: en la línea superior izquierda (1-10) se usó template Q4, con 3 mM de $MgCl_2$ (1-5) y 1.65 mM (6-10); en la superior derecha (1-9) se usó Q5, con 3 mM $MgCl_2$ (1-5) y 1.65 mM (6-9); en la línea inferior izquierda (1-10) se usó Q2, con 3 mM $MgCl_2$ (1-5) y 1.65 mM (6-10); y finalmente, en la inferior derecha (1-8) se utilizó Q3, con 3 mM de $MgCl_2$ (1-4) y 1.65 mM (5-8). En los carriles M se corrió una escalera estándar de 500 pb, y en el carril m el estándar de 250 pb.

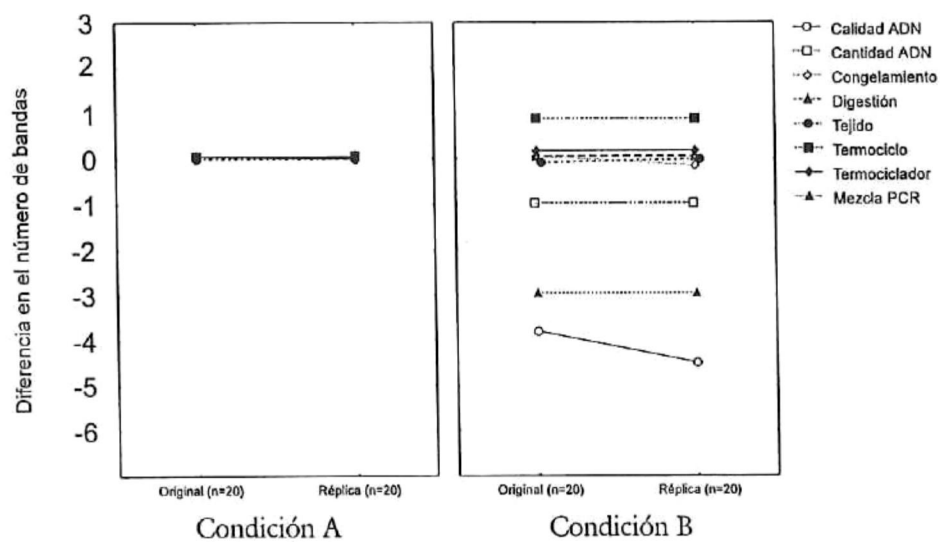


Figura 3. Contraste experimental entre dos grupos de condiciones de amplificación para marcadores RAPD-PCR con la serie de cebadores OPc (OPERON Technologies), en donde la condición A correspondió siempre al primer grupo de valores para las siguientes variables: calidad de ADN (Q5-Q4 y Q3-Q2), cantidad de ADN (4-8 ng y 15-25 ng), periodo de almacenamiento de las muestras (< 2 meses y > 2 meses), tiempo de digestión durante la extracción de ADN (48-72 y 80-120 h), tejido empleado (manto y masa bucal), ciclo de PCR (30°C y 37°C para la incorporación del cebador), aparato termociclador (mismo modelo) y, finalmente, la mezcla de PCR (1.65 mM y 3.0 mM de MgCl₂).

Sólo 10 de los 20 cebadores para los que se estandarizaron las condiciones de amplificación fueron seleccionados aleatoriamente para proceder al análisis de las muestras (Tabla III). En términos generales, el protocolo "Touchdown-PCR" sugerido por Don *et al.* (1991), modificando los tiempos de los ciclos, fue el que dio mejores resultados para OP_C-01, OP_C-2, OP_C-6, OP_C-08, OP_C-14 y OP_C-15. El resto de los cebadores funcionaron adecuadamente con un protocolo similar al de Yu y Pauls (1994), ligeramente modificado en las temperaturas de incorporación del cebador (Tabla III).

Tabla III. Código comercial, secuencia, contenido de guanina-citosina y descripción del ciclo de PCR de los cebadores empleados en el análisis de las muestras de calamar gigante del Golfo de California.

Código	Secuencia 5' - 3'	% G+C	Condiciones de Reacción (t, °C)
OP _C -01	TTCGAGCCAG	60	Desnaturalización Inicial: 2 min. 45 seg., 95°C
OP _C -02	GTGAGCGTC	70	Desnaturalización Accesorio: 2 min. 20 seg., 94°C
OP _C -06	GAACGGACTC	70	Desnaturalización Cíclica: 7 seg., 94°C
OP _C -08	TGGACCGGTG	70	Incorporación Cíclica de los Cebadores: 30 seg., 33°C
OP _C -14	TGCGTGCTTG	60	Extensión Cíclica de la Síntesis: 1 min. 30 seg., 72°C
OP _C -15	GACGGATCAG	60	5 CICLOS
			Desnaturalización Cíclica: 7 seg., 94°
			Incorporación Cíclica de los Cebadores: 30 seg., 36°C
			Extensión Cíclica de la Síntesis: 1 min. 30 seg, 72°C
			38 CICLOS
			Extensión Terminal: 10 min., 72°C
			Enfriamiento: Indefinido, 6°C
OP _C -05	GATGACCGCC	70	Desnaturalización Inicial: 2 min. 45 seg., 95°C
OP _C -10	TGTCTGGGTG	60	Desnaturalización Accesorio: 2 min 20 seg., 94°C
OP _C -11	AAAGCTGCGG	60	Desnaturalización Cíclica: 7 seg., 94°C
OP _C -19	GTTGCCAGCC	70	Incorporación Cíclica de los Cebadores: 36°C
			Extensión Cíclica de la Síntesis: 30 seg., 72°C
			25 CICLOS
			Extensión Terminal: 10 min., 72°C
			Enfriamiento: Indefinido, 6°C

La mezcla de reacción más adecuada permitió reducir en un 45% la cantidad de *Taq* polimerasa y trabajar en volúmenes menores a los reportados en los protocolos de rutina. Todas las amplificaciones se llevaron a cabo en Buffer-PCR (Tris-HCl 22mM pH 8.4, KCl 11mM, MgCl₂ 1.65 mM, dNTP 2.2 mM), utilizando 4 ng de template de ADN, 25 picomoles de cebador (OPERON Primer) y 0.15 U *Taq* polimerasa recombinante en un volumen final de reacción de 11.5 µL. Se colocaron 20 µL de aceite mineral sobre la mezcla de reacción y se centrifugaron brevemente los tubos a 3000 rpm antes de incubarlos en el termociclador.

Diversidad genotípica

En la Figura 4 se muestran algunos de los patrones generados por los cebadores RAPD y se ejemplifica la manera en la que se capturaron los datos para ingresarlos a la paquetería de análisis (Figura 5). Los 10 cebadores que se emplearon generaron un total de 265 bandas cuya reproducibilidad permitió utilizarlas como marcadores genéticos. Los tamaños de las bandas amplificadas variaron desde los 100 hasta los 10,000 pares de bases (pb), con una marcada dominancia de las bandas de 500-3500 pb (Apéndice B). Aunque algunos marcadores presentaron frecuencias mayores al 90%, la gran mayoría exhibieron frecuencias de 0.2 -0.3.

Un reflejo claro del efecto de los alelos raros sobre la diversidad génica de las agregaciones de calamar gigante del Golfo de California es el número de genotipos detectados para cada cebador (Tabla IV), y que prácticamente permiten identificar a nivel individual a cada espécimen. Esta amplia diversidad, sin duda está asociada al gran número de marcadores que se incluyeron en el análisis, y que desafortunadamente por la misma naturaleza de los marcadores RAPD no pueden excluirse del análisis sin antes efectuar una selección insesgada de los mismos. Ya que las regiones amplificadas son de naturaleza desconocida (regiones codificantes y no codificantes), una selección arbitraria pudiera generar interpretaciones incorrectas referentes a la representatividad real de los alelos en la población bajo estudio. Por lo anterior, se consideró que el análisis en función de las frecuencias genotípicas no sería informativo y se optó por incluir todos los marcadores y trabajar con las frecuencias individuales de cada uno de ellos.

Tabla IV. Diversidad genotípica detectada por RAPD con los cebadores de la serie OP_C (OPERON Technologies)

Cebador	Bandas Amplificadas	Frecuencia Modal	Genotipos
OP _C -01	26	0.30	180
OP _C -02	24	0.56	186
OP _C -05	22	0.71	52
OP _C -06	33	0.39	226
OP _C -08	21	0.31	108
OP _C -10	20	0.37	149
OP _C -11	36	0.53	135
OP _C -14	33	0.19	180
OP _C -15	27	0.40	105
OP _C -19	23	0.40	72
Todos	265	0.42	269

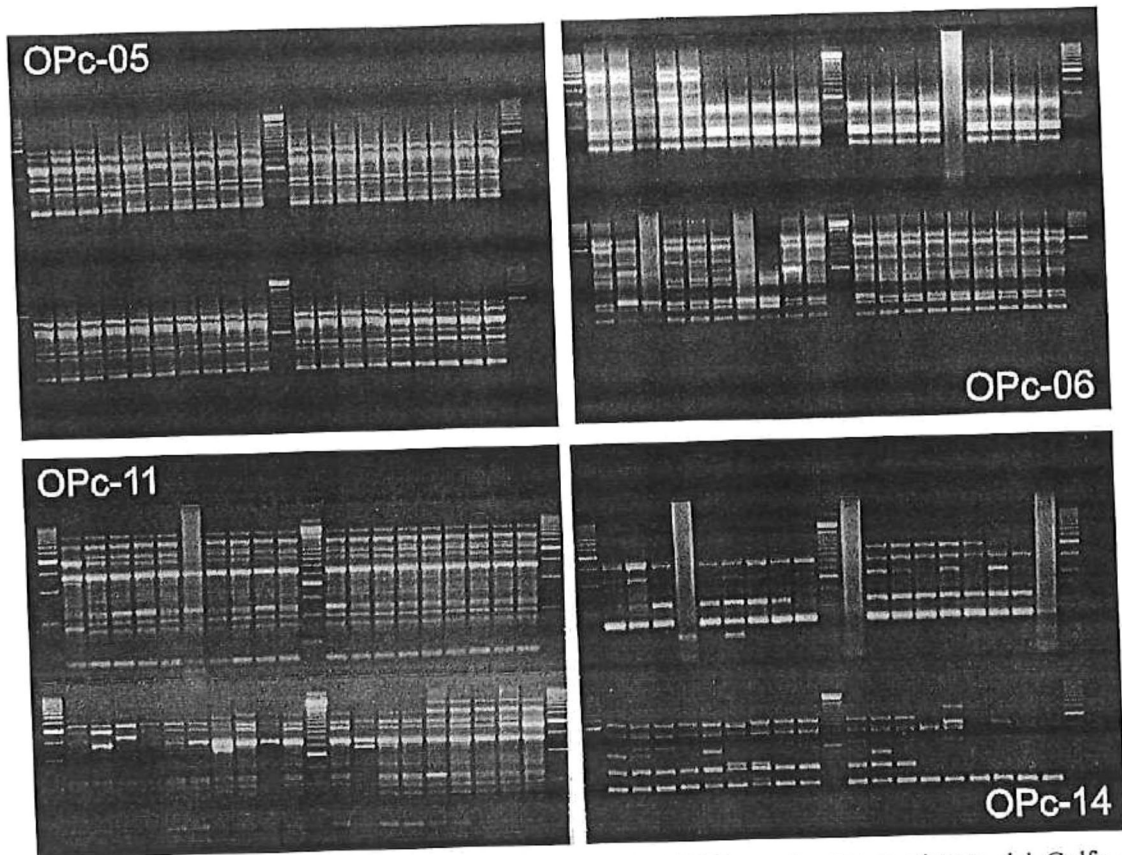


Figura 4. Variabilidad en los patrones de bandas RAPD-PCR en el calamar gigante del Golfo de California. Los patrones de banda fueron generados por los cebadores OP_c-05, OP_c-06, OP_c-11 y OP_c-14. En los carriles externos se colocaron marcadores de 500 pares de bases y en el carril central un marcador de 250 pares de bases. En el resto de los carriles se cargaron las muestras.

```

H2s268Ag96•10001001000000101001011000•00010100011110110101100•00111011110001•
110001011010101011110100110010000•0001110100000100110•011011010000100
10010
M3s297Mr97•10001001000000101001011000•0001010001111110101100•00111011110001•
111001011010100111110101110010000•0001110100000100110•011011010000100
10010

```

Figura 5. Secuencia de caracteres binarios de la lectura de las bandas en los geles. La clave contiene la información del sexo y el estadio de madurez (p.e. H2 es una hembra en madurez 2), seguida del número de la muestra (pe. s268 es la muestra No. 268), y la fecha (p.e. Ag96 es agosto 1996). El 1= banda, 0 = sin banda. Los puntos negros representan el límite de cada cebador (sólo se usaron 6 cebadores para mostrar el patrón).

Diversidad genética y subdivisión poblacional

La estimación de la diversidad genética promedio de la muestra de calamares gigantes del Golfo de California arrojó un valor de 0.2206, con una varianza de 0.0106 (Coef. Var. 46.7%). Esta amplia variación pudo atribuirse principalmente a la variación intrínseca en los marcadores genéticos evaluados para la especie ya que, como lo indica claramente la partición de la varianza en sus componentes muestrales, la contribución asociada al número de individuos analizados y al número de grupos considerados resultó ser de menor importancia (Tabla V).

Tabla V. Estimación de la diversidad genética intrapoblacional ($H'_{años}$) y su varianza asociada usando los tres años de muestreo. La varianza fue calculada a partir de 100 réplicas por bootstrap, efectuando la partición en los componentes asociados al muestreo para los diferentes niveles de comparación empleados y expresada como contribución porcentual relativa (en *itálicas*). Entre paréntesis se indica el número de individuos comparados.

	$H'_{años}$	$H'_{años} (boot)$	Partición de la Varianza			
			Total	<i>Loci</i>	<i>Individuos</i>	<i>Grupos</i>
Diversidad genética intrapoblacional (324)	0.2206	0.2288	0.0106 <i>100%</i>	0.007056 <i>66.57%</i>	0.001176 <i>11.09%</i>	0.002368 <i>22.34%</i>

El análisis de la diversidad genética interanual permitió detectar que la muestra de 1998, a pesar de presentar los valores más bajos de heterocigosidad, exhibió una variación interna extremadamente alta (64-78%). Esto se ve claramente reflejado en las diferencias entre el estimador puntual y el promedio del bootstrap para este año, que muy probablemente se deban, para este caso en particular, a la discrepancia en el tamaño de muestra con respecto a los otros años (Tabla VI). Los valores de heterocigosidad para 1996 y 1997 fueron más parecidos entre ellos y en relación al valor promedio global, con valores bajos para las diferencias respecto a los promedios de la réplica y para los coeficientes de variación.

La similitud promedio para los tres años analizados fue del 71.04% (Coef. Var. 7.26%), mientras que la similitud intrapoblacional promedio estimada resultó del 95% (Coef. Var. 4.8%). Los valores de similitud exhibieron, como era de esperarse, menor sensibilidad a las variaciones propias de los marcadores, y mostraron coeficientes de variación no mayores al 10%. Esto se debe a que el estimador de la heterocigosidad promedia las diferencias absolutas en las frecuencias de cada uno de los marcadores dentro del grupo de individuos comparados, mientras que el índice de similitud genera un valor para cada pareja de individuos en función de las bandas que comparten. Dicho de otra forma, el primer estimador proporciona información sobre el peso de cada marcador en las diferencias encontradas y el segundo se limita a establecer diferencias

relativas entre los individuos del grupo. A pesar de ello ambos reflejan, de manera consistente, las diferencias entre los grupos de muestras contrastadas (Tabla VII).

Tabla VI. Estimación de la diversidad genética y de la de similitud interpoblacional usando como grupos de comparación los años de muestreo. El promedio y las medidas de dispersión se calcularon a partir de 100 réplicas por bootstrap. Entre paréntesis el número de individuos de cada grupo.

1996 (186) - 1997 (122)						
	S'_{1996}	S'_{1997}	$S'_{1996-1997}$	H'_{1996}	H'_{1997}	$H'_{1996-1997}$
Estimador	0.7202	0.7467	0.9552	0.2463	0.2302	0.2382
Promedio	0.7193	0.7444	0.9805	0.2461	0.2281	0.2371
Varianza	0.0001	0.0002	0.0001	0.0000	0.0001	0.0000
Desv. Est.	0.0105	0.0144	0.0089	0.0031	0.0087	0.0059
Coef. Var.	0.0146	0.0193	0.0091	0.0127	0.0384	0.0255
(Estimador- Promedio)/Promedio	0.0012	0.0030	0.0258	0.0006	0.0093	0.0050
Int. Conf. inf. (Percentil _{2.5})	0.6982	0.7190	0.9622	0.2389	0.2085	0.2237
Int. Conf. sup. (Percentil _{97.5})	0.7408	0.7693	0.9940	0.2517	0.2411	0.2464
1996 (186) - 1998 (16)						
	S'_{1996}	S'_{1998}	$S'_{1996-1998}$	H'_{1996}	H'_{1998}	$H'_{1996-1998}$
Estimador	0.7070	0.6363	0.9487	0.2468	0.1780	0.2124
Promedio	0.7078	0.6617	0.9460	0.2393	0.1871	0.1875
Varianza	0.0001	0.0034	0.0003	0.0002	0.0141	0.0071
Desv. Est.	0.0115	0.0585	0.0191	0.0144	0.1188	0.0666
Coef. Var.	0.0163	0.0884	0.0202	0.0604	0.6350	0.3477
(Estimador- Promedio)/Promedio	0.0012	0.0383	0.0029	0.0312	0.0485	0.0398
Int. Conf. inf. (Percentil _{2.5})	0.6871	0.5329	0.9041	0.1942	0.0285	0.1113
Int. Conf. sup. (Percentil _{97.5})	0.7295	0.7486	0.9785	0.2508	0.5907	0.4207
1997 (122) - 1998 (16)						
	S'_{1997}	S'_{1998}	$S'_{1997-1998}$	H'_{1997}	H'_{1998}	$H'_{1997-1998}$
Estimador	0.7339	0.6333	0.9515	0.2318	0.1769	0.2043
Promedio	0.7312	0.6502	0.9300	0.2321	0.1533	0.1769
Varianza	0.0002	0.0027	0.0003	0.0001	0.0490	0.0247
Desv. Est.	0.0165	0.0521	0.0192	0.0069	0.1147	0.1574
Coef. Var.	0.0226	0.0801	0.0206	0.0298	0.7821	0.9384
(Estimador- Promedio)/Promedio	0.0037	0.0260	0.0231	0.0013	0.7121	0.2183
Int. Conf. inf. (Percentil _{2.5})	0.6988	0.5451	0.8934	0.2192	0.7143	0.2407
Int. Conf. sup. (Percentil _{97.5})	0.7572	0.7318	0.9663	0.2439	0.1887	0.2127

Tabla VII. Asociación por años de muestreo. En la triangular superior las distancias expresadas como $I-S_{ij}$, equivalentes al porcentaje de disimilitud. En la triangular inferior y en itálicas los coeficientes de variación. El subíndice indica el número de marcadores incluidos en la comparación. Los valores de S'_{ij} y H'_{ij} el número de individuos comparados dentro de cada grupo se indican entre corchetes y entre paréntesis, respectivamente.

Índice de Similitud S'_{ij}			
	1996	1997	1998
	[0.7255]	[0.7449]	[0.6608]
1996 (186)	1.0000	0.9805	0.9460
1997 (122)	0.0194 ₂₆₃	1.0000	0.9300
1998 (16)	0.0884 ₂₅₈	0.0206 ₂₅₈	1.0000
Heterocigosis en exceso H'_{exc}			
	1996	1997	1998
	[0.2459]	[0.2330]	[0.2076]
1996 (186)	0.0000	0.0371	0.1320
1997 (122)	0.0255 ₂₆₃	0.0000	0.1829
1998 (16)	0.3477 ₂₅₈	0.9384 ₂₅₈	0.0000

La comparación dentro de las localidades de muestreo mostró valores de heterocigosidad y de similitud más bajos para Santa Rosalía que para Guaymas, pero niveles cercanos al promedio global al realizar el contraste entre zonas (Tabla VIII). Cabe mencionar que la muestra de 1998 es exclusivamente de Santa Rosalía y su efecto se ve reflejado en los coeficientes de variación asociados a esta localidad. El promedio de similitud y los intervalos de confianza son indicativas de que no existen diferencias entre las agregaciones de ambas localidades.

Tabla VIII. Estimación de la diversidad genética y de la de similitud interpoblacional usando como grupos de comparación las localidades de muestreo. El promedio y las medidas de dispersión se calcularon a partir de 100 réplicas por bootstrap. SRos=Santa Rosalía, Gym=Guaymas Entre paréntesis el numero de individuos de cada grupo.

Guaymas(202) - Santa Rosalía (122)	S'_{Gym}	S'_{SRos}	$S'_{Gym-SRos}$	H'_{Gym}	H'_{SRos}	$H'_{Gym-SRos}$
Estimador	0.7427	0.5638	0.9264	0.2374	0.1981	0.2178
Promedio	0.7189	0.7171	0.9952	0.2444	0.2372	0.2408
Varianza	0.0001	0.0001	0.0000	0.0000	0.0003	0.0000
Desv. Est.	0.0110	0.0132	0.0079	0.0033	0.0185	0.0094
Coef. Var.	0.0154	0.0184	0.0080	0.0137	0.0782	0.0392
(Estimador- Promedio)/Promedio	0.0331	0.2137	0.0691	0.0285	0.1646	0.0955
Int. Conf. inf. (Percentil _{2.5})	0.6962	0.6890	0.9785	0.2375	0.2228	0.2330
Int. Conf. sup. (Percentil _{97.5})	0.7397	0.7389	1.0000	0.2501	0.2499	0.2477

Las fuertes contribuciones a la varianza generadas por la muestra de 1998 se consideraron como una potencial fuerte de sesgo en los estimadores, por lo que se decidió excluir ese periodo de muestreo en las comparaciones subsecuentes. De igual forma y por lo que se comentó anteriormente, aunque se calcularon los valores de heterocigosis para todas las comparaciones efectuadas, los análisis y la interpretación de los resultados se fundamentaron en los índices de similitud.

Asociación por clases de tallas para cada zona y año.

El primer criterio de discriminación que se planteó para el análisis fue la estructura de tallas, sin embargo, como puede observarse en la Figura 6A, aunque en la submuestra genética se distingue la ocurrencia de dos modas, la muestra original proveniente de la descarga de la captura artesanal no refleja la misma distribución de tallas. Se optó entonces por tomar con cierta reserva la comparación entre dos clases de tallas que bien pudieran ser más un producto del sesgo en el submuestreo que una condición que reflejara la distribución de tallas en la población sujeta a la pesquería.

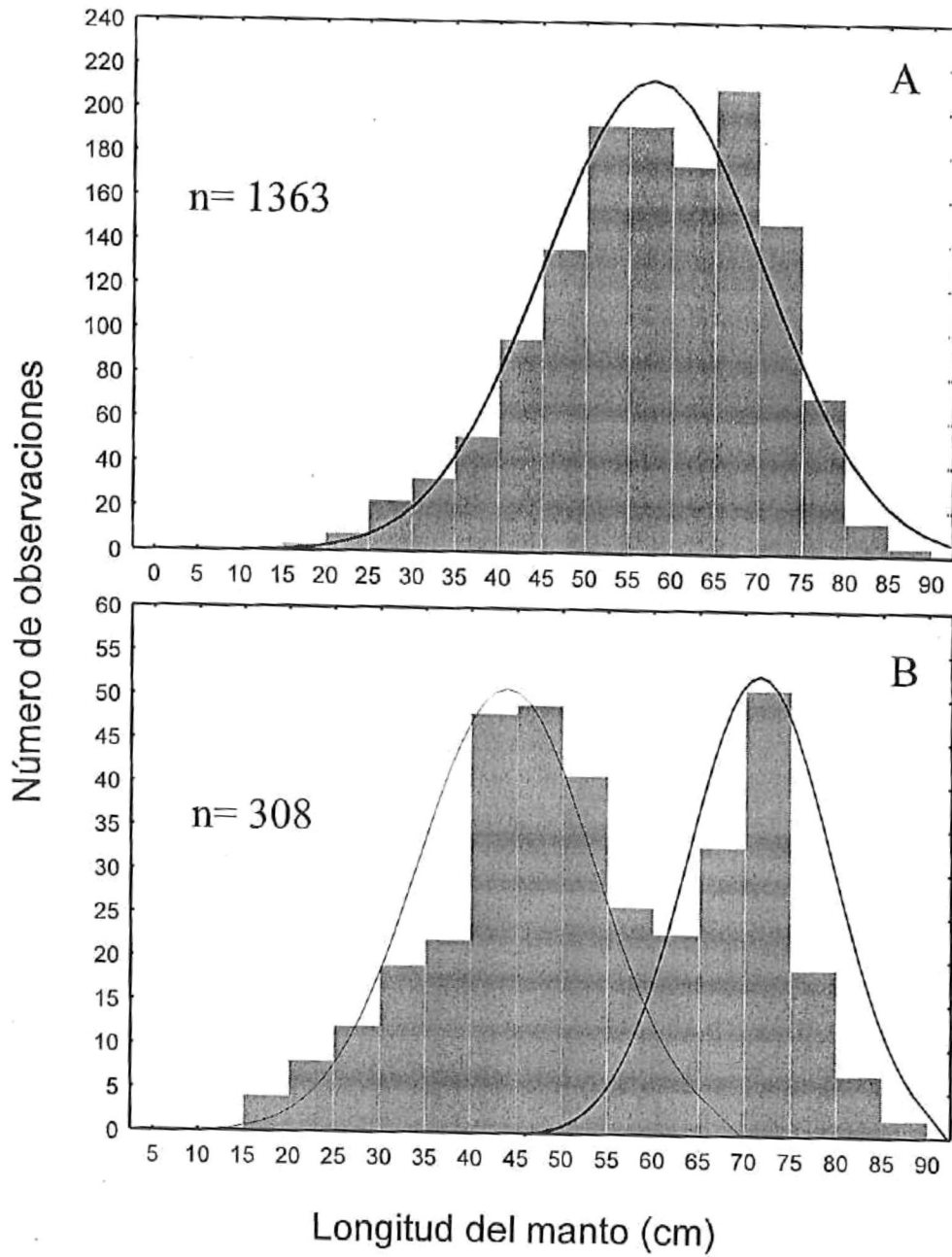


Figura 6. Distribución de tallas de los calamares gigantes en el Golfo de California. En (A), a la distribución de la muestra colectada para el estudio morfométrico, y que comprende de noviembre de 1995 a mayo de 1998. (U. Markaida, datos no publicados). En (B) la distribución de tallas de la submuestra que fue utilizada para los análisis genéticos, que incluye solo de marzo de 1996 a mayo de 1998.

Ya que las curvas de distribución de las frecuencias para las dos modas detectadas se traslapan considerablemente, se seleccionaron a todos aquellos individuos que estuvieran incluidos exclusivamente en el área bajo la curva por la primera distribución modal y se trabajaron como un grupo independiente del resto (Figura 6B). Así, los individuos de menos de 45 cm de longitud de manto se categorizaron como “chicos”, mientras que los de longitudes de manto mayores o iguales a 45 cm se englobaron en la categoría “grandes”. Los individuos incluidos en estas categorías fueron separados a su vez por años y localidades, y contrastados mediante los valores de disimilitud (1-similitud).

En la Tabla IX se puede observar que a pesar de que la disimilitud es baja entre las parejas de grupos comparados, los valores más altos se presentaron principalmente para aquellas comparaciones que incluyeron a los animales de tallas grandes colectados en Santa Rosalía durante 1997. Como lo reflejan los coeficientes de variación, la asociación de los individuos por tallas, zonas y años aparentemente no es natural y por lo tanto no se detecta una discriminación clara entre los grupos. El porcentaje promedio de desviación estándar y el número de árboles analizados para la construcción del fenograma Fitch-Margoliash (Figura 7A) confirmaron la amplia variación dentro de los grupos e invalida la agrupación bajo los criterios considerados.

Asociación de los grupos de madurez gonadal por temporada y año.

Los individuos se reorganizaron en dos grupos de madurez: aquellos con índices de madurez iguales o menores de 2 se consideraron como “inmaduros”, mientras que el grupo de “maduros” contiene a los que presentaron índices mayores de 2. Estos grupos a su vez fueron separados en dos temporadas características del área de estudio: la temporada fría (invierno) y las condiciones cálidas (verano). En términos generales, esta clasificación segrega paralelamente las localidades de muestreo (Guaymas \approx Invierno; Santa Rosalía \approx Verano). Las comparaciones usando este criterio de clasificación resultaron también inciertas, aunque consistentes con los valores encontrados en las comparaciones anteriores.

Los valores de disimilitud aunque bajos, fueron relativamente mayores a los detectados por la segregación por tallas (Tabla X). Los coeficientes de variación del orden del 90% para la mayoría de los grupos, así como el número de árboles examinados y el porcentaje promedio de desviación estándar del fenograma generado (Figura 7B), no permitieron hacer ninguna inferencia sobre la asociación entre los grupos.

Tabla IX. Asociación por tallas (longitud de manto), localidad y año. Distancias expresadas como $I-S_{ij}$, equivalente al porcentaje de disimilitud. En la triangular inferior y en itálicas los coeficientes de variación. El subíndice indica el número de marcadores incluidos en la comparación. El valor de similitud y el número de individuos comparados dentro de cada grupo se indican entre corchetes y entre paréntesis, respectivamente. Chicos (C) < 45 cm, grandes (G) > 45 cm, Guaymas (Gym), Santa Rosalía (SRo).

	C1996 _{Gym} [0.7428]	C1996 _{SRo} [0.6034]	C1997 _{Gym} [0.5963]	C1997 _{SRo} [0.5747]	G1996 _{Gym} [0.7488]	G1996 _{SRo} [0.7162]	G1997 _{Gym} [0.7279]	G1997 _{SRo} [0.6051]
C1996 _{Gym} (30)	0.0000	0.06511	0.0487	0.2442	0.0074	0.0413	0.0508	0.1917
C1996 _{SRo} (6)	<i>0.7612₁₉₈</i>	0.0000	0.1660	0.2152	0.0407	0.0712	0.0786	0.2542
C1997 _{Gym} (14)	<i>0.5698₂₀₄</i>	<i>0.0897₁₈₃</i>	0.0000	0.1599	0.0554	0.0173	0.0489	0.2696
C1997 _{SRo} (5)	<i>0.5628₁₈₅</i>	<i>0.7425₁₇₀</i>	<i>0.7524₁₈₁</i>	0.0000	0.1886	0.1185	0.1904	0.4718
G1996 _{Gym} (55)	<i>0.7502₂₃₅</i>	<i>0.5628₁₉₉</i>	<i>0.7824₂₀₅</i>	<i>0.1428₁₈₅</i>	0.0000	0.0081	0.0524	0.2628
G1996 _{SRo} (80)	<i>0.7425₂₃₇</i>	<i>0.4578₁₉₉</i>	<i>0.6948₂₀₈</i>	<i>0.6594₁₈₆</i>	<i>0.7502₂₅₁</i>	0.0000	0.2360	0.2360
G1997 _{Gym} (85)	<i>0.7524₂₂₄</i>	<i>0.4659₁₉₅</i>	<i>0.4562₂₀₇</i>	<i>0.8015₁₈₆</i>	<i>0.4621₂₃₇</i>	<i>0.4569₂₄₆</i>	0.0000	0.1378
G1997 _{SRo} (14)	<i>0.6956₁₅₈</i>	<i>0.7014₁₅₃</i>	<i>0.5621₁₅₈</i>	<i>0.6941₁₅₀</i>	<i>0.8004₁₅₈</i>	<i>0.6899₁₅₉</i>	<i>0.7524₁₅₉</i>	0.0000

Tabla X. Asociación por temporada y madurez gonadal. Distancias expresadas como $I-S_{ij}$, equivalente al porcentaje de disimilitud. En la triangular inferior y en itálicas los coeficientes de variación. El subíndice indica el número de marcadores incluidos en la comparación. El valor de similitud y el número de individuos comparados dentro de cada grupo se indican entre corchetes y entre paréntesis, respectivamente. Invierno (Inv) incluye de noviembre a abril, verano (Ver) de mayo a octubre. Inmaduro (inm) < 3, madurando o maduro (mat) > 2).

	Inv1996 _{inm} [0.6767]	Ver1996 _{inm} [0.7038]	Inv1996 _{mat} [0.7019]	Ver1996 _{mat} [0.7241]	Inv1997 _{inm} [0.7479]	Ver1997 _{inm} [0.5173]	Ver1997 _{mat} [0.5947]
Inv1996 _{inm} (22)	0.0000	0.0467	0.0465	0.0508	0.0285	0.1035	0.2497
Ver1996 _{inm} (49)	<i>0.9854₂₂₃</i>	0.0000	0.0511	0.0006	0.0144	0.046	0.2427
Inv1996 _{mat} (28)	<i>0.9998₂₂₃</i>	<i>0.9214₂₅₂</i>	0.0000	0.0058	0.0285	0.0195	0.2531
Ver1996 _{mat} (80)	<i>0.9623₂₂₂</i>	<i>0.9541₂₅₉</i>	<i>0.9562₂₄₉</i>	0.0000	0.0354	0.0392	0.2485
Inv1997 _{inm} (38)	<i>0.9999₂₂₂</i>	<i>0.9548₂₅₈</i>	<i>0.9752₂₄₈</i>	<i>0.9665₂₅₇</i>	0.0000	0.0337	0.1116
Ver1997 _{inm} (9)	<i>0.9902₁₈₃</i>	<i>0.9562₁₉₃</i>	<i>0.9632₁₉₂</i>	<i>0.9865₁₉₃</i>	<i>0.9524₁₉₂</i>	0.0000	0.2016
Ver1997 _{mat} (10)	<i>0.8942₁₅₆</i>	<i>0.8951₁₅₉</i>	<i>0.6541₁₅₇</i>	<i>0.9688₁₅₉</i>	<i>0.9896₁₅₉</i>	<i>0.9389₁₅₆</i>	0.0000

Asociación de los grupos por sexo, localidad y temporada.

Los valores de disimilitud encontrados para estos grupos fueron aproximadamente del mismo orden de magnitud que para las comparaciones previas, sin embargo, los coeficientes de variación no fueron tan altos como para los grupos de tallas y de madurez. Aparentemente existe un patrón que indica que los machos y las hembras de Guaymas 1996 tienen diferencias importantes con respecto a los de Santa Rosalía 1997, y que estos últimos, a su vez, tienen mayores similitudes con el resto de los grupos (Tabla XI). La información más valiosa que se rescata de este grupo de comparaciones es que al menos no existe evidencia contundente para considerar que los machos y las hembras exhiban una asociación más estrecha dentro, que entre ellos (Figura 7C).

Tabla XI. Asociación por sexos en cada localidad y para cada año. Distancias expresadas como $1-S_{ij}$, equivalente al porcentaje de disimilitud. En la triangular inferior y en itálicas los coeficientes de variación. El subíndice indica el número de marcadores incluidos en la comparación. El valor de similitud y el número de individuos comparados dentro de cada grupo se indican entre corchetes y entre paréntesis, respectivamente. Machos (M), hembras (H), Guaymas (Gym), Santa Rosalía (SRo).

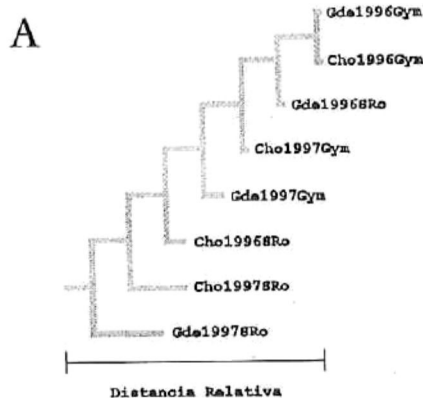
	H1996 _{Gym}	H1996 _{SRo}	M1996 _{Gym}	M1996 _{SRo}	H1997 _{Gym}	H1997 _{SRo}	M1997 _{Gym}	M1997 _{SRo}
	[0.7287]	[0.6997]	[0.7127]	[0.6328]	[0.7325]	[0.7045]	[0.7131]	[0.4517]
H1996 _{Gym} (74)	0.0000	0.0315	0.0000	0.0295	0.0158	0.1342	0.0423	0.0519
H1996 _{SRo} (60)	<i>0.3902₂₅₈</i>	0.0000	0.0000	0.0361	0.0572	0.1774	0.0068	0.0621
M1996 _{Gym} (67)	<i>0.3610₂₅₉</i>	<i>0.4523₂₅₄</i>	0.0000	0.0406	0.0321	0.1116	0.0590	0.1056
M1996 _{SRo} (21)	<i>0.3963₂₁₃</i>	<i>0.3429₂₁₃</i>	<i>0.3698₂₁₁</i>	0.0000	0.0458	0.1428	0.0342	0.0246
H1997 _{Gym} (25)	<i>0.3563₂₅₉</i>	<i>0.3523₂₅₆</i>	<i>0.3102₂₅₈</i>	<i>0.3894₂₁₂</i>	0.0000	0.0560	0.0000	0.0289
H1997 _{SRo} (13)	<i>0.4524₁₈₅</i>	<i>0.3951₁₈₄</i>	<i>0.3984₁₈₄</i>	<i>0.3205₁₈₃</i>	<i>0.3653₁₈₄</i>	0.0000	0.0500	0.0873
M1997 _{Gym} (35)	<i>0.3901₂₅₄</i>	<i>0.3521₂₅₄</i>	<i>0.3462₂₅₀</i>	<i>0.3986₂₁₂</i>	<i>0.3168₂₅₃</i>	<i>0.3488₁₈₄</i>	0.0000	0.0000
M1997 _{SRo} (6)	<i>0.5428₁₈₅</i>	<i>0.6956₁₈₅</i>	<i>0.5248₁₈₅</i>	<i>0.5981₁₇₉</i>	<i>0.5892₁₈₅</i>	<i>0.5001₁₇₄</i>	<i>0.6925₁₈₄</i>	0.0000

Temporalidad de la heterocigosidad y similitud.

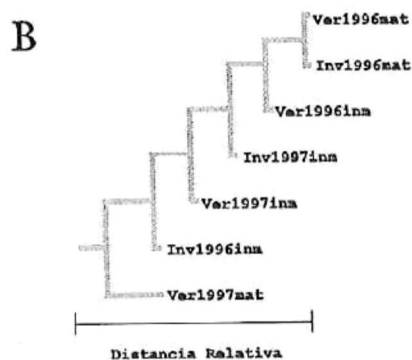
Con el objeto de analizar si existía un patrón intra-anual que pudiera reflejar la migración de los grupos, se calculó la heterocigosidad y la similitud para cada mes de muestreo. Los valores para ambos estimadores resultaron consistentes con los obtenidos para los otros grupos y asociaciones, pero los coeficientes de variación fueron menores al 8%, lo que indica que los grupos de organismos presentes en cada mes podrían estar reflejando diferentes grupos de edad que representan cohortes específicas (Tabla VII). Al observar el comportamiento de los estimadores a lo largo del periodo de muestreo (Figura 8), puede apreciarse una tendencia, en periodos de tres meses, en los que la heterocigosidad disminuye gradualmente (junio a septiembre de 1996, octubre 1996 a enero 1997, abril 1997 a junio de 1997). Dicha tendencia podría estar asociado con los incrementos relativos en los coeficientes de variación a mediados de dichos periodos e inicio de uno de esos periodos (agosto 1996, noviembre 1996, junio 1997), y que, como se discutirá más adelante, podrían ser reflejo de los picos reproductivos de la especie dentro del Golfo.

Tabla XII. Estimación de la diversidad genética y de la de similitud interpoblacional usando como grupos de comparación los meses de muestreo. El promedio y las medidas de dispersión se calcularon a partir de 100 réplicas por bootstrap. Entre paréntesis el número de individuos de cada grupo.

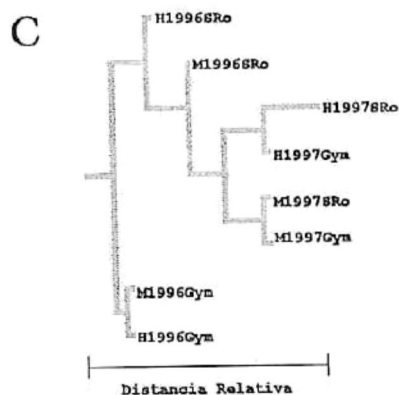
Índice de Similitud S_j								
	S'	S'_{100}	Varianza	Desv. Est.	Coef. Var.	$(S' - S'_{100})/S'_{100}$	Int. Conf. inf. (Percentil _{2.5})	Int. Conf. sup. (Percentil _{97.5})
Mar96 (38)	0.7205	0.7135	0.0009	0.0308	0.0431	0.0098	0.6547	0.7648
Abr96 (12)	0.7257	0.7104	0.0024	0.0493	0.0694	0.0215	0.6244	0.8170
Jun96 (37)	0.7142	0.7047	0.0010	0.0313	0.0445	0.0136	0.6562	0.7635
Ago96 (22)	0.7105	0.7015	0.0030	0.0547	0.0780	0.0128	0.5955	0.8006
Sep96 (25)	0.6995	0.6883	0.0004	0.0211	0.0306	0.0163	0.6540	0.7259
Oct96 (40)	0.6900	0.6813	0.0002	0.0150	0.0220	0.0127	0.6465	0.7084
Nov96 (12)	0.6920	0.6868	0.0066	0.0811	0.1181	0.0076	0.5544	0.8250
Ene97 (19)	0.6089	0.6044	0.0002	0.0145	0.0239	0.0074	0.5834	0.6415
Feb97 (21)	0.6571	0.6564	0.0004	0.0196	0.0299	0.0009	0.6143	0.6927
Mar97 (43)	0.7300	0.7319	0.0012	0.0342	0.0467	0.0026	0.6623	0.7911
Abr97 (20)	0.6383	0.6382	0.0009	0.0297	0.0466	0.0001	0.5789	0.6926
Jun97 (19)	0.6695	0.6675	0.0026	0.0514	0.0769	0.0031	0.5952	0.7887
May98 (16)	0.6608	0.6608	0.0038	0.0619	0.0937	0.0001	0.5347	0.7454
Heterocigosis H_j								
	H'	H'_{100}	Varianza	Desv. Est.	Coef. Var.	$(H' - H'_{100})/H'_{100}$	Int. Conf. inf. (Percentil _{2.5})	Int. Conf. sup. (Percentil _{97.5})
Mar96 (38)	0.2196	0.2244	0.0000	0.0048	0.0213	0.0213	0.2151	0.2323
Abr96 (12)	0.2099	0.2068	0.0000	0.0055	0.0264	0.0146	0.1957	0.2159
Jun96 (37)	0.2511	0.2535	0.0000	0.0053	0.0208	0.0093	0.2426	0.2624
Ago96 (22)	0.2380	0.2387	0.0001	0.0080	0.0335	0.0030	0.2224	0.2546
Sep96 (25)	0.2257	0.2272	0.0000	0.0068	0.0300	0.0067	0.2161	0.2399
Oct96 (40)	0.2545	0.2519	0.0000	0.0034	0.0134	0.0106	0.2450	0.2574
Nov96 (12)	0.2454	0.2443	0.0001	0.0085	0.0349	0.0046	0.2245	0.2569
Ene97 (19)	0.2054	0.2064	0.0000	0.0055	0.0265	0.0046	0.1910	0.2140
Feb97 (21)	0.2366	0.2394	0.0001	0.0077	0.0322	0.0118	0.2198	0.2504
Mar97 (43)	0.2350	0.2336	0.0001	0.0088	0.0378	0.0059	0.2141	0.2480
Abr97 (20)	0.2155	0.2166	0.0000	0.0054	0.0249	0.0053	0.2067	0.2264
Jun97 (19)	0.1831	0.1830	0.0002	0.0137	0.0747	0.0006	0.1518	0.2025
May98 (16)	0.2090	0.2077	0.0001	0.0102	0.0489	0.0061	0.1885	0.2266



Poblaciones examinadas: 8
 Porcentaje Promedio de Desviación Estándar: 56.56%
 Número de árboles examinados: 24488
 Número de subreplicaciones: 100



Poblaciones examinadas: 7
 Porcentaje Promedio de Desviación Estándar: 62.26%
 Número de árboles examinados: 20163
 Número de subreplicaciones: 100



Poblaciones examinadas: 8
 Porcentaje Promedio de Desviación Estándar: 39.09%
 Número de árboles examinados: 13170
 Número de subreplicaciones: 100

Figura 7. Asociaciones y distancias genéticas generadas por el algoritmo Fitch-Margoliash del PHYLIP 95 para el promedio de 100 réplicas generadas por bootstrap. En (A) para los grupos de tallas por localidad y año, en (B) para los de madurez por temporada y año, y en (C) para los grupos de sexo por localidad y año.

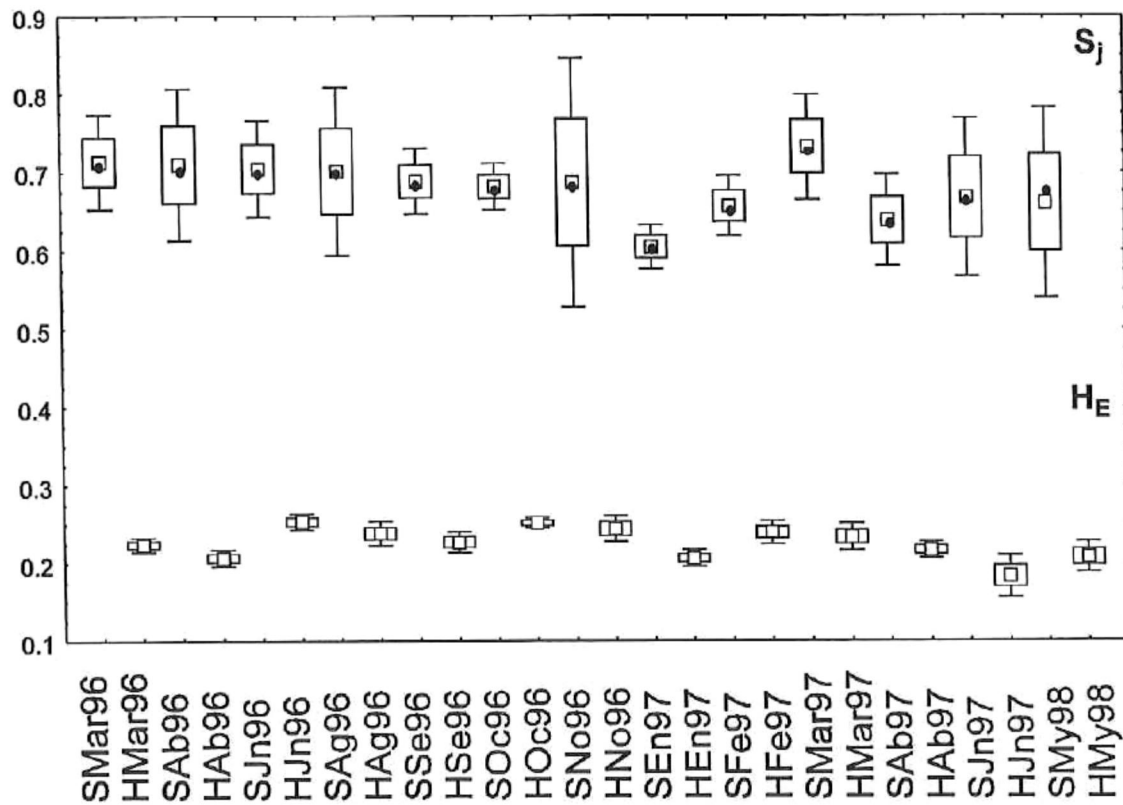


Figura 8. Variación temporal de la heterocigosidad (H) y la similitud (S) entre los individuos agrupados por meses de muestreo. Los puntos negros son los valores del estimador puntual, los cuadros internos el valor del promedio en 100 réplicas (bootstrap), los cuadros externos los percentiles al 95% y las líneas capitalizadas los valores máximos y mínimos.

Asociación de individuos inferida por el árbol de mayor parsimonia.

Ya que los análisis anteriores no evidenciaron un agrupamiento que pudiera considerarse consistente, debido principalmente a los altos valores de los coeficientes de variación de los estimadores, se procedió a analizar el árbol de mayor parsimonia generado por el PHYLIP 95 con el objeto de establecer qué características consolidaban en grupos a los individuos. Los individuos quedaron agrupados en clusters demasiado pequeños, por lo que se decidió considerar sólo los grupos más grandes (Figura 9), seleccionando aquellos que quedaran por debajo del valor del 50 % de disimilitud relativa. Cabe aclarar que la paquetería estadística empleada no permitió, para este caso en particular, el manejo de más de 300 casos, por lo que de manera aleatoria se retiraron del análisis 26 individuos.

Se estimó la heterocigosidad intrapoblacional promedio en 0.2195 (Coef. Var. 0.00%), y el índice de similitud intrapoblacional en 0.7095 (Coef. Var. 0.03%). Por su parte, los valores promedio entre los grupos de comparación resultaron de 0.2257 (5.21%) y 90.06% (Coef. Var. 0.08%), para la heterocigosidad y la similitud, respectivamente. Los valores de heterocigosidad y similitud entre de los grupos, calculados a partir de los grupos sugeridos por el árbol filogenético parsimonioso, fueron consistentes con los encontrados para las agrupaciones contrastadas anteriormente (Tabla XIII). Sin embargo, estas agrupaciones fueron consideradas las mas precisas en función a los bajos valores de los coeficientes de variación (~ 2.5 %).

Tabla XIII. Estimación de la diversidad génica y de la de similitud interpoblacional usando como grupos de comparación los clusters derivados del dendrograma construido por el algoritmo de mayor parsimonia del PHYLIP 95. El promedio y las medidas de dispersión se calcularon a partir de 100 réplicas por bootstrap. Entre paréntesis el número de individuos de cada grupo.

Índice de Similitud S_j								
	S'	S'_{100}	Varianza	Desv. Est.	Coef. Var.	$(S' - S'_{100})/S'_{100}$	Int. Conf. inf. (Percentil _{2.5})	Int. Conf. sup. (Percentil _{97.5})
A (31)	0.5707	0.5848	0.0009	0.0314	0.0536	0.0240	0.5320	0.6416
B (61)	0.7439	0.7462	0.0000	0.0078	0.0105	0.0031	0.7289	0.7602
C (30)	0.7085	0.7154	0.0001	0.0108	0.0151	0.0095	0.6993	0.7383
D (60)	0.7262	0.7341	0.0001	0.0133	0.0181	0.0107	0.7073	0.7567
E (47)	0.6924	0.7015	0.0003	0.0178	0.0254	0.0130	0.6702	0.7373
F (69)	0.7655	0.7705	0.0002	0.0148	0.0192	0.0064	0.7473	0.8010
Heterocigosis H_j								
	H'	H'_{100}	Varianza	Desv. Est.	Coef. Var.	$(H' - H'_{100})/H'_{100}$	Int. Conf. inf. (Percentil _{2.5})	Int. Conf. sup. (Percentil _{97.5})
A (31)	0.1833	0.1846	0.0000	0.0056	0.0306	0.0070	0.1726	0.1948
B (61)	0.2036	0.2036	0.0000	0.0040	0.0196	0.0000	0.1965	0.2126
C (30)	0.2352	0.2345	0.0000	0.0035	0.0150	0.0029	0.2272	0.2411
D (60)	0.2200	0.2189	0.0000	0.0040	0.0186	0.0049	0.2103	0.2258
E (47)	0.2235	0.2216	0.0000	0.0044	0.0200	0.0088	0.2132	0.2303
F (69)	0.1916	0.1912	0.0000	0.0050	0.0262	0.0018	0.1807	0.1991

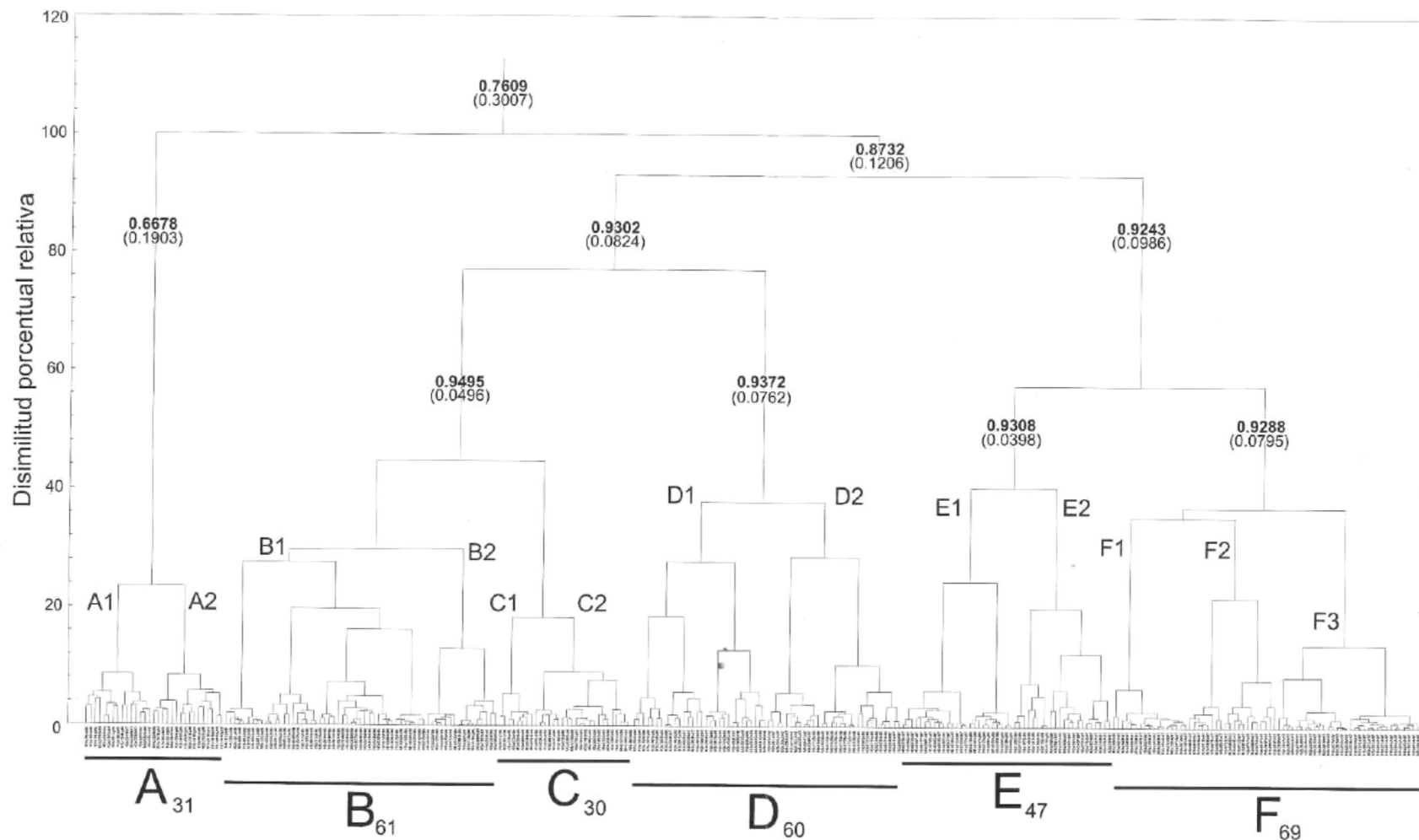


Figura 9. Dendrograma de mayor parsimonia construido a partir de 265 sitios representados por marcadores RAPD-PCR para calamar gigante del Golfo de California. Se usó el algoritmo de parsimonia de Dollo y polimorfismo PHYLIP 95. Los valores sobre los nodos son los índices de similitud y en paréntesis los coeficientes de variación estimados en 100 repeticiones por bootstrap. Las letras bajo las barras en el eje horizontal inferior representan a los grupos que se plantean como posibles cohortes y los subíndices los tamaños de muestra. Las letras pequeñas asociadas a los clusters internos de los grupos representan los subgrupos que se utilizaron en el análisis de la estructura de temporal de tallas y estadios de madurez.

En la Tabla XIV, se aprecia claramente que los individuos del grupo A son lo que aportan la mayor variación. Esto también puede ser atribuido a todas las comparaciones que contienen a la mayor parte de los individuos de 1998. Este comportamiento se refleja tanto en los valores de disimilitud, como en los de heterocigosidad en exceso, y sugieren, a pesar de ser muy bajos, que existe cierta diferenciación entre los grupos.

Tabla XIV. Asociación basada en el árbol de mayor consenso generado por parsimonia. En la triangular superior las distancias expresadas como $I-S_{ij}$, equivalentes al porcentaje de disimilitud y a la heterocigosidad en exceso. En la triangular inferior y en itálicas los coeficientes de variación. El subíndice indica el número de marcadores incluidos en la comparación. El valor de similitud y el número de individuos comparados dentro de cada grupo se indican entre corchetes y entre paréntesis, respectivamente. Los grupos A-F corresponden a los clusters de la Figura 9

Disimilitud Ds' cohortes						
	A	B	C	D	E	F
	[0.5707]	[0.7439]	[0.7085]	[0.7262]	[0.6924]	[0.7655]
A (31)	0.0000	0.1132	0.1039	0.1388	0.1351	0.1228
B (61)	<i>0.0321₂₂₉</i>	0.0000	0.0505	0.1066	0.0816	0.1036
C (30)	<i>0.0344₂₃₉</i>	<i>0.0128₂₁₈</i>	0.0000	0.0561	0.0844	0.1088
D (60)	<i>0.0359₂₂₉</i>	<i>0.0143₂₁₃</i>	<i>0.0166₂₂₂</i>	0.0000	0.0912	0.1312
E (47)	<i>0.0396₂₃₀</i>	<i>0.0179₂₁₁</i>	<i>0.0203₂₁₉</i>	<i>0.0218₂₁₆</i>	0.0000	0.0626
F (69)	<i>0.0365₂₃₆</i>	<i>0.0149₂₁₄</i>	<i>0.0172₂₂₂</i>	<i>0.0187₂₁₈</i>	<i>0.0224₂₂₂</i>	0.0000
Heterocigosos en exceso H_{exc} cohortes						
	A	B	C	D	E	F
	[0.1846]	[0.2036]	[0.2345]	[0.2189]	[0.2216]	[0.1912]
A (31)	0.0000	0.0615	0.0455	0.0561	0.0556	0.0672
B (61)	<i>0.1261₂₂₉</i>	0.0000	0.0202	0.0367	0.0295	0.0342
C (30)	<i>0.0946₂₃₉</i>	<i>0.0475₂₁₈</i>	0.0000	0.0209	0.0271	0.0333
D (60)	<i>0.1077₂₂₉</i>	<i>0.0805₂₁₃</i>	<i>0.0391₂₂₂</i>	0.0000	0.0287	0.0433
E (47)	<i>0.1124₂₃₀</i>	<i>0.0666₂₁₁</i>	<i>0.0740₂₁₉</i>	<i>0.0558₂₁₆</i>	0.0000	0.0256
F (69)	<i>0.1412₂₃₆</i>	<i>0.0806₂₁₄</i>	<i>0.0782₂₂₂</i>	<i>0.0828₂₁₈</i>	<i>0.0582₂₂₂</i>	0.0000

El análisis gráfico de las frecuencias para los marcadores nulos de los grupos A-F, ofrece una visión más general, pero a la vez más clara y contundente, de dichas diferencias (Figura 10). Es evidente que las diferencias entre los grupos son mínimas, pero aparentemente significativas; las frecuencias de ciertos alelos nulos raros parecen ser la causa de que las sutiles diferencias existentes, se magnifiquen.

El análisis de contraste entre los árboles generados por el método de Ward, y por el algoritmo de Fitch-Margoliash no evidenció diferencias significativas con respecto al de mayor parsimonia. De hecho, la agrupación sugerida por el programa KITCH, ubica a los mismos grandes grupos (A-F) en las mismas posiciones dentro del dendrograma, además de que confirma la confiabilidad en el criterio de agrupación al mostrar valores menores al 10% de desviación estándar promedio en la estructura del mismo (Figura 11).

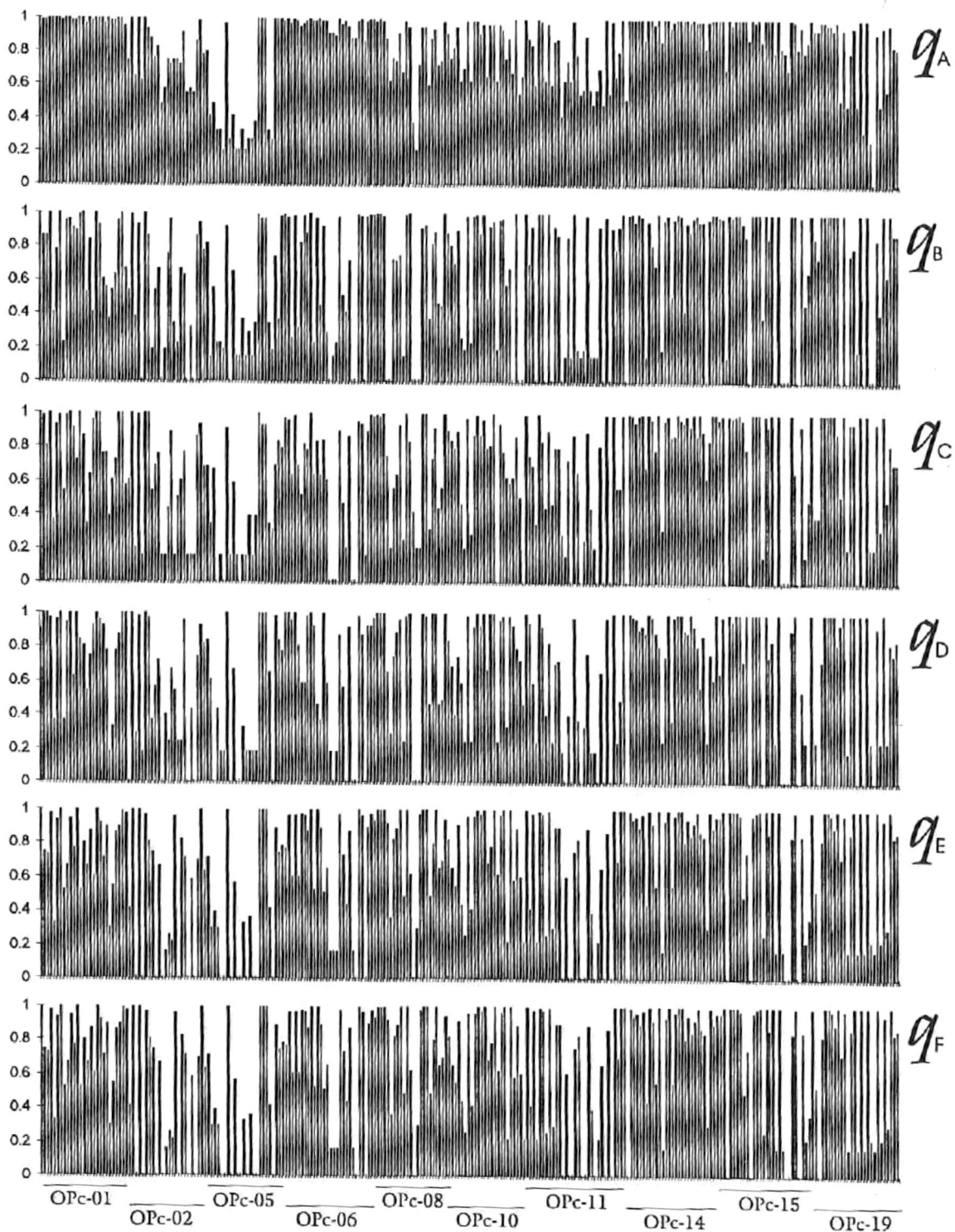
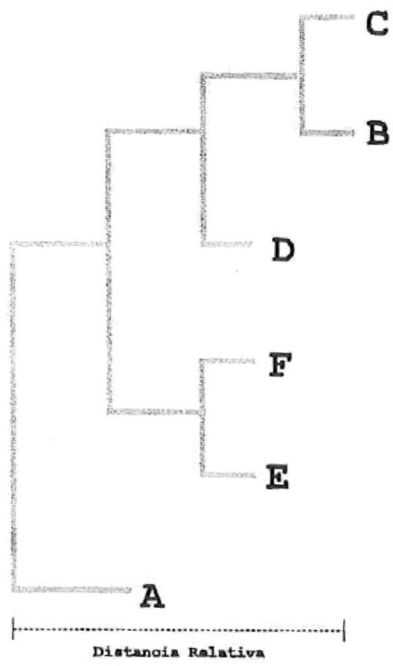


Figura 10. Frecuencias génicas esperadas de los marcadores nulos (homocigotos para la ausencia de banda) para la serie OPc (Operon Technologies), utilizando el estimador insesgado de q (Lynch y Milligan 1994). Las líneas bajo la horizontal inferior, identifican a los marcadores producto de cada cebador. Las letras en las esquinas superiores derechas identifican al grupo para el que se estimó q .



Poblaciones examinadas: 6
 Porcentaje Promedio de Desviación Estándar: 9.35%
 Número de árboles examinados: 301
 Número de subreplicaciones: 100

Figura 11. Asociación y distancia genética entre los grupos de individuos sugeridos por el árbol de mayor parsimonia construido con el PHYLIP 95. Los grupos A-F corresponden a los de la Figura 9.

Estructura temporal de tallas y madurez gonadal de los grupos A-F.

Las tallas y los estadios de madurez gonadal de los individuos pertenecientes a cada uno de los grupos, sugeridos por el análisis filogénico por parsimonia, se analizaron de manera gráfica para evidenciar si existen picos modales que permitan correlacionar las variables merísticas morfológicas y morfométricas (Apéndice A) con los valores de diversidad y similitud genética estimados. Para ello, se subdividieron los grupos buscando, en la medida de lo posible, que cada subgrupo incluyera un número similar de individuos. Con ello se evita la necesidad de estandarizar los datos al interior de los grupos para hacerlos comparables. El tamaño de la muestra no permitió efectuar un análisis detallado para estas variables, por lo que se utilizaron intervalos de tiempo y de tallas amplios. Como ya se comentó anteriormente, el análisis espacial queda cubierto de manera adecuada por el de la estructura temporal.

En la Figura 12 se muestran las características generales de los grupos que se describen con detalle a continuación:

Subgrupo A1. En este subgrupo encontramos individuos de los tres años de muestreo, con una clara dominancia de junio-1996 (maduros) y marzo-1997 (inmaduros). Todos los individuos están por debajo de los 50 cm de longitud de manto.

Subgrupo A2. Incluyó individuos de marzo-agosto de 1996 (en maduración), pero con mayor representación de mayo-1998 (inmaduros). Todos los miembros de este subgrupo exhibieron tallas menores a los 50 cm.

Subgrupo B1. Claramente dominado por individuos de marzo-abril de 1996 (inmaduros) y junio-noviembre 1996 (maduros). Incluyó un infragrupo bien diferenciado de animales de junio-1996 (inmaduros). La talla modal fue de 45 cm y hubo pocos individuos de más de 60 cm.

Subgrupo B2. Se caracterizó por la presencia de animales de marzo-1996 (maduros) con tallas de entre 25 y 75 cm, aunque se encontraron también algunos de agosto-octubre (inmaduros) un par de mayo-1998 (maduros).

Subgrupo C1. En este subgrupo están representados individuos de junio-1996 (inmaduros) y de noviembre-1996 (maduros). La talla modal fue de 50 cm y no se presentaron tallas mayores a los 60 cm.

Subgrupo C2. Agrupó individuos de junio-1996 (inmaduros) y de octubre-1996 (maduros). Se presentaron tallas de entre 25 y 75 cm, pero la moda fue de 75 cm.

Subgrupo D1. Dominaron los individuos de septiembre-octubre de 1996 (inmaduros-madurando), con pocos representantes de febrero-marzo de 1997 (maduros). Se presentaron tallas desde los 25 y hasta los 85 cm, con una moda de 60 cm.

Subgrupo D2. Incluyó animales de junio-septiembre de 1996 (maduros), en asociación estrecha con febrero-marzo 1997 (maduros) y junio-1997 (inmaduros), así como un pequeño infragrupo noviembre-1996 (inmaduros) y marzo-1997 (maduros). Las tallas fueron de entre 25 y 85 cm, con la ocurrencia de una moda a 45 y otra a 85 cm.

Subgrupo E1. Se presentaron individuos de enero-abril de 1997 (madurando y maduros) en estrecha relación con animales de agosto-septiembre de 1996 (maduros), y en donde todos los individuos exhibieron tallas mayores a los 55 cm.

Subgrupo E2. Este subgrupo se caracterizó por la ocurrencia de individuos de octubre-1996 (inmaduros) y marzo-abril de 1997 (maduros), con tallas modales de 35 y 75 cm, respectivamente.

Subgrupo F1 Incluyó individuos de marzo-abril de 1997 (madurando y maduros), con tallas superiores a los 55 cm.

Subgrupo F2. Presentó individuos de enero-febrero de 1997 (inmaduros) y de enero-1997 (maduros), con tallas modales de 45 y 75 cm, respectivamente.

Subgrupo F3. Se caracterizó por la ocurrencia de individuos de marzo-abril de 1997 (inmaduros) y junio-1997 (maduros) que presentaron tallas entre los 35 y los 85 cm, con moda para los 55 cm.

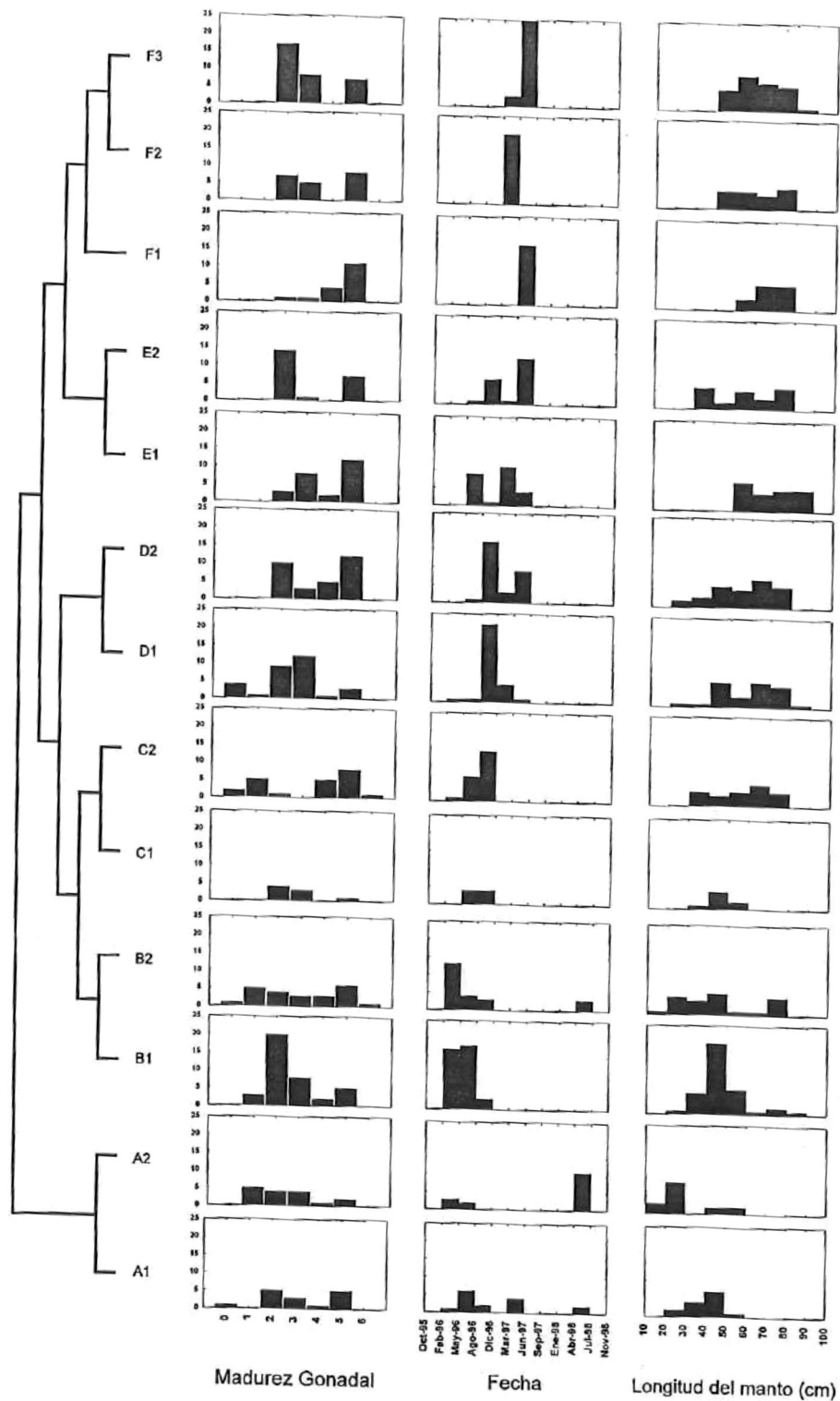


Figura 12. Ocurrencia y estructura de edades y tallas de los subgrupos de calamar gigante en el Golfo de California. Los subgrupos corresponden a los clusters internos de los grupos generados por el algoritmo Fitch-Margoliash, representados en la Figura 9.

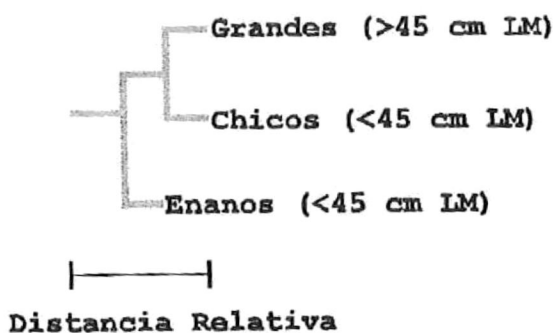
Asociación por la estructura de tallas detectada de los grupos A-F

En función de la aparente presencia de una moda a los 50-55 cm en varios de los subgrupos, y que además contiene generalmente individuos inmaduros, se procedió a separar a los individuos en tres nuevos grupos: Todo el grupo A o “enanos”, y dos grupos de B-F referidos como “chicos” (<55 cm), y “grandes” (>55 cm). El resultado de este análisis sugiere que existe, por lo menos, un grupo de individuos de tallas pequeñas (<30 cm), discernible genéticamente del resto de los individuos que componen las agregaciones. Como podemos observar en la Tabla XV los valores de disimilitud más altos los arrojaron los contrastes que incluyeron a los enanos.

La asociación dentro de los grupos queda corroborada por los valores bajos de desviación estándar porcentual y el número de árboles que generó el programa FITCH (Figura 13).

Tabla XV. Asociación basada en la clasificación tentativa de los grupos de tallas. En la triangular superior las distancias expresadas como $I-S_{ij}$, equivalentes al porcentaje de disimilitud. En la triangular inferior y en itálicas los coeficientes de variación, indicando con el subíndice el número de marcadores incluidos en la comparación. El valor de similitud y el número de individuos comparados dentro de cada grupo se indican entre corchetes y entre paréntesis, respectivamente. Los individuos clasificados como enanos corresponden al grupo A de la Figura 9, mientras que los chicos y los grandes pertenecen a los otros grupos (B-F), pero separados por tallas en: chicos < 55 cm y grandes > 55 cm de longitud de manto.

<i>Ds' tallus</i>	Enanos [0.5408]	Chicos [0.7232]	Grandes [7325]
Enanos (35)	0.0000	0.0698	0.0735
Chicos (146)	<i>0.0294</i> ₂₄₅	0.0000	0.0121
Grandes (143)	<i>0.0214</i> ₂₆₄	<i>0.0330</i> ₂₄₅	0.0000



Poblaciones examinadas: 3
 Porcentaje Promedio de Desviación Estándar: 2.01%
 Número de árboles examinados: 1501
 Número de subreplicaciones: 100

Figura 13. Asociación y distancia genética entre los grupos modales de tallas basados en el agrupamiento de los individuos por parsimonia.

DISCUSIÓN

Consideraciones Metodológicas

Validación del método RAPD-PCR para el calamar gigante

Diversos autores familiarizados con el manejo de los marcadores RAPD coinciden al señalar que la aplicabilidad de la técnica y su poder de resolución son adecuados siempre y cuando exista suficiente evidencia de que los patrones de bandas amplificadas sean reproducibles experimentalmente (Michelmore *et al.* 1991, Hardys *et al.* 1992, Clark y Lanigan 1993, Abo-elwafa *et al.* 1995, Maki y Horie 1999). La alta sensibilidad de los RAPD a las condiciones de reacción, y en particular, a la calidad y cantidad de la proporción templete-cebador, ha sido ampliamente discutida como los principales factores que limitan la reproducibilidad del método (Williams *et al.* 1990, Carlson *et al.* 1991, Yu y Pauls 1994, Bielawski *et al.* 1995). Pero, de igual forma, se ha demostrado que bajo condiciones de estricto control de calidad del proceso, las réplicas experimentales generan patrones claramente reproducibles y registrables (Williams 1990, Hu y Quiros 1991, Klein-Lankhorst *et al.* 1991, Martin *et al.* 1994, Muluvi *et al.* 1994).

La posible ocurrencia de fragmentos no homólogos comigrantes es comúnmente mencionada como una potencial fuente de error en el análisis de los marcadores RAPD (Hadrys *et al.* 1992, Tingey y del Tufo 1993, Parker *et al.* 1998) y, sin embargo, no existe ninguna evidencia experimental de que esto suceda. De manera similar, la posibilidad teórica de que la amplificación ocurra en regiones no genómicas, aunque discutida, no ha sido demostrada experimentalmente (Hadrys *et al. op. cit.*).

La presencia de fragmentos artificios ha sido reportada como función de las interacciones estructurales entre las especies moleculares durante el proceso de amplificación (Caetano-Anolles *et al.* 1992, Caetano-Anolles 1993, Rabouam *et al.* 1999), pero no existe información sobre la reproducibilidad experimental de dichos fragmentos. Rabouam *et al. (op. cit.)* concluyen que independientemente de la estandarización y del riguroso control de calidad con la que se cuente para desarrollar el método, la ocurrencia de fragmentos artificios es una constante inamovible que descarta el potencial de uso de los RAPD para análisis rigurosos. El trabajo de estos últimos autores mostró que entre el 50 y el 75% de las bandas amplificadas por RAPD-PCR, al analizar una población de petreles de Cory, resultaron de una combinación de artificios del genoma de un nemátodo comensal y de productos de la interacción de los fragmentos durante la amplificación. En ningún momento, los autores indican si los artificios mostraban patrones consistentes entre muestras tratadas bajo la mismas condiciones, pero concluyen que la validez de un análisis

basado en este tipo de marcadores puede ser demostrada exclusivamente por hibridación con fragmentos clonados del genoma de la especie bajo estudio.

El proceso sistematizado que se siguió en el presente trabajo para corroborar la reproducibilidad de los fragmentos obtenidos por RAPD-PCR para *Dosidicus gigas*, no mostró evidencias de tal variación, teniendo en cuenta todas las fuentes de variación que pudieran haber introducido un sesgo de magnitud desconocida, (figs. 2 y 3). Los patrones obtenidos bajo dos diferentes condiciones, en un conjunto de 20 muestras con réplica, para los 10 cebadores empleados, demostraron que la única fuente de variación detectable entre las réplicas podría ser atribuida a las diferencias de calidad del ADN. Difícilmente podría pensarse que la mayoría de los calamares colectados en el Golfo de California, y mucho menos aún, que precisamente los 20 especímenes seleccionados al azar para realizar las pruebas de validación, tuvieran alguna fuente de ADN exógena que contribuyera y estuviera representado en las bandas.

Dada la característica sensibilidad de los marcadores RAPD a las condiciones de amplificación, resulta prácticamente imposible que aun existiendo una fuente ajena de ADN o interacción entre los productos de amplificación durante la reacción, las bandas generadas de esta forma hubieran sido igualmente reproducibles para todos los casos en las réplicas experimentales.

Por último, si como mencionan Rabouam *et al.* (1999), el número de fragmentos artificios difiere de manera importante en función de la fuente de ADN exógeno y del cebador usado, el patrón observado en la figura 10 quedaría fuera de toda lógica. Como puede apreciarse en la figura, aparentemente las frecuencias y la diversidad genéticas al interior de cada cebador son más o menos homogéneas, con lo que, surge un argumento más en apoyo a la reproducibilidad y aplicabilidad del método, por un lado, y por el otro una probabilidad alta en cuanto a la redundancia de las variables. En otras palabras, es muy probable que el análisis directo e independiente de los fragmentos de cada cebador, resulte con frecuencias y valores similares para los estimadores de diversidad genética.

Ante este panorama, existen suficientes argumentos que permiten considerar válida la aplicación de los marcadores RAPD para el análisis de las poblaciones de calamar gigante, pero de ninguna forma quiere decir que no sea necesario corroborar experimentalmente la ocurrencia de las fuentes de sesgo aquí discutidas.

Diversidad de los marcadores RAPD para calamar gigante

El elevado número de marcadores genéticos RAPD-PCR que se obtuvieron para *Dosidicus gigas* en este trabajo, es muestra clara del potencial de análisis de la técnica, y a pesar de que existe un desconocimiento casi absoluto sobre la estructura genómica de los cefalópodos, para otros grupos animales se han reportado también números similares de productos de la amplificación (Dinesh *et al.* 1993, Thorpe *et al.* 1994).

No obstante, la variabilidad en cuanto a la ocurrencia de los marcadores fue muy amplia, obteniendo un total de 269 genotipos para 324 individuos. La mayor parte de los trabajos sobre RAPD se han efectuado sobre especies vegetales de hortaliza y en ellos se reporta exclusivamente el número de bandas informativas para el fenotipo discriminado (Abo-elwafa *et al.* 1995, Maki y Horie 1999).

La interpretación adecuada de los estimadores de los parámetros genéticos obtenidos mediante RAPD-PCR, se fundamenta en los supuestos de que: (a) la amplificación es completamente aleatoria, (b) los fragmentos pueden o no representar regiones codificantes, y (c) que deben registrarse todas las bandas monomórficas y polimórficas, (Hadrys *et al.* 1992, Clark y Lanigan 1993, Lynch y Milligan 1994, Isabel *et al.* 1999). Dado que el presente trabajo explora la diversidad genética de una especie orientado a la dilucidación de la estructura y la dinámica de sus agregaciones, queda claro que cualquier criterio de preselección podría haber resultado en un sesgo importante. Por lo anterior, para el análisis de las agregaciones de calamar gigante se optó por usar en conjunto la información de los 10 cebadores (265 *loci*).

Aspectos sobre la selección de los estimadores adecuados para RAPD

El desarrollo teórico en el que se fundamentan los estimadores de los parámetros genéticos para RAPD, lleva como principal carga el carácter dominante de los marcadores. La imposibilidad de discernir entre los homocigotos y los heterocigotos para un marcador en particular, si bien no previene el poder estimar las frecuencias alélicas necesarias para el análisis genético de las poblaciones, si limita la exactitud de la estimación al compararla con marcadores codominantes.

Las frecuencias genotípicas corresponderán a las proporciones esperadas Hardy-Weinberg, considerando una población diploide con reproducción sexual aleatoria. Ante la imposibilidad de establecer las frecuencias de los homocigotos/heterocigotos para el marcador, Lynch y Milligan (1994) desarrollaron modelos en función de las frecuencias de los marcadores nulos (sin

marcador) que proporcionan una aproximación adecuada a los estimadores convencionales de estructura genética poblacional de Nei (1978).

Isabel *et al.* (1999) demostraron, mediante la comparación analítica de los estimadores $RAPD_{loci}$ (H) y $RAPD_{fingerprint}$ (S) y alternando el uso del criterio de exclusión de alelos nulos raros sugerido por Lynch y Milligan (1994), que la estimación de S se mantenía sesgada positivamente con respecto a H , particularmente para muestras pequeñas y, aún después de aplicar procedimientos de remuestreo por permutación y bootstrap.

Las estimaciones de S y H para los diferentes grupos de calamares fueron consistentes en sus valores puntuales y mostraron sólo pequeñas diferencias con los respectivos promedios de las 100 réplicas por bootstrap (Tablas V-XI). Esto permitió el cálculo analítico de las medidas de dispersión de los estimadores (coeficientes de variación e intervalos de confianza), lo que minimizó el efecto de la fracción de *loci* más sesgados en la varianza global. A la vez, al fraccionar la varianza en sus componentes asociados al muestreo en cada nivel (*loci*, individuos, y grupos) y encontrar que la mayor parte de esta se debía a la variación propia de los alelos (frecuencias), las diferencias encontradas pudieron atribuirse a la variación genética como tal, y no al efecto de una muestra pequeña de individuos.

Lynch (1990), y Lynch y Milligan (1994) indican que los índices de similitud y la heterocigosidad esperada en equilibrio, usados para calcular F_{ST} (medida de subdivisión poblacional de Wright) son altamente dependientes de la covarianza asociada al uso de los mismos individuos para realizar los cálculos a nivel intrapoblacional, interpoblacional y el promedio global. Desafortunadamente el algoritmo de Wright (1951), de no ser corregido por las covarianzas, genera una estimación sesgada que debe ser tomada en cuenta con mucha reserva. Una alternativa para el explorar los niveles de subdivisión poblacional en las agregaciones de calamar gigante, consistió en usar la distancia genética relativa estimada en términos de la heterocigosidad en exceso entre los grupos comparados, así como los índices de disimilitud porcentual relativa. Aproximaciones similares a las sugeridas han sido utilizadas por Abo-elwafa *et al.* (1995), y por Maqui y Horie (1999), respectivamente. Para el caso del análisis de las agregaciones de calamar, ambos resultados fueron consistentes en cuanto a los agrupamiento generado, por lo que en términos generales parece que el número de individuos comparados fue el adecuado.

No obstante, el número de *loci* usados (265) tuvo un efecto importante sobre los estimadores al

momento de las comparaciones intergrupales. Al considerar el criterio de purga para los marcadores más frecuentes, las diferencias dentro del grupo se magnificaron, esto se ve claramente reflejado en los valores del índice de similitud dentro de los grupos. Mientras los valores de similitud entre los grupos son altos, las diferencias internas al grupo se dan por la presencia de los marcadores nulos menos frecuentes. La interpretación de esta situación debe seguir entonces la siguiente lógica: dos grupos se parecen entre ellos en un 90%, pero dentro de ese grupo, los individuos tienen diferencias que permiten segregarlos en grupos cada vez menores. Así, si comparamos dentro de un grupo hasta el último nivel las diferencias entre los dos individuos comparados pudieran llegar a ser de hasta el 100%. Los valores de similitud dentro de los grupos indican la amplia variabilidad de los marcadores y el peso que se le está dando a los alelos raros.

Asociación entre los grupos comparados

El uso de los programas de taxonomía numérica y filogenia para caracteres morfológicos discretos ha probado ser de utilidad para la construcción de escenarios evolutivos basados en datos de naturaleza genética (Felsenstein 1989, Reynolds *et al.* 1983), pero estos métodos no se han aplicado hasta el momento a marcadores tipo RAPD-PCR. Los patrones de digestión de ADN por RFLP (DeBry y Slade 1985), analizados por esta vía, quizá sean la aproximación más comparable con el protocolo de análisis que se siguió para procesar la información generada de los RAPD para el calamar gigante.

El algoritmo de parsimonia considera que, evolutivamente, es más fácil perder, que ganar una estructura compleja. Supone y explica la presencia del estado 1 con un cambio hacia adelante $0 \Rightarrow 1$, y tantas reversiones $0 \Leftarrow 1$ como sean necesarias para explicar el patrón actual. El modelo asume que el carácter ancestral es 0, y que tanto los caracteres como los linajes evolucionan independientemente (Felsenstein 1989).

De acuerdo con Lynch y Milligan (1994), los marcadores RAPD conforman sistemas *locus* con 2 alelos posibles: presencia y ausencia del marcador. Si asumimos, además, que un cambio estructural en la molécula de ADN promueve la pérdida de un sitio de anclaje del cebador RAPD, y que regenerar ese sitio es tanto evolutiva, como probabilísticamente mucho más “difícil” que haberlo perdido, el algoritmo podría funcionar adecuadamente y reflejar las relaciones filéticas entre los individuos.

Si los fragmentos RAPD amplifican zonas no codificantes y zonas codificantes, entonces las tasas de cambio evolutivo que entrarían en juego podrían hacer no tan confiable el resultado. Al usar un gran número de marcadores, la muestra genética sería de magnitud tal, que permitiría una aproximación teóricamente insesgada de la filogenia entre los individuos analizados.

Probablemente, alguno de los marcadores generado por cierto cebador, podría localizarse dentro de la zona que amplifique otro cebador, si esto sucediera se estaría violando el supuesto de evolución independiente de los sitios. Ya que se factorizaron los cebadores para que el proceso de replicación por bootstrap se realizara dentro de cada cebador y no con los 265 sitios empleados, la posible violación al supuesto se redujo considerablemente.

La compatibilidad encontrada entre los árboles de distancia genética construidos a partir de la matriz de distancia analítica (Ward-Disimilitud y KITCH) y el árbol de mayor consenso generado a partir de 100 replicaciones por bootstrap con el algoritmo de parsimonia, permite sugerir que el agrupamiento de los individuos puede considerarse natural. A pesar de que no se cuenta con información sobre las tasas de mutación de la especie, ni de algún cefalópodo, el resultado de los algoritmos de distancia genética se interpretaron básicamente como fenogramas; pero es evidente que al tratar con la misma especie, y en un periodo de tiempo relativamente corto, la distancia evolutiva promedio bien podría ser interpretada en la escala filogénica a nivel familiar. De acuerdo con Clark y Lanigan (1993) la información generada a partir de RAPD tiene una alta y significativa correlación con la diversidad nucleotídica y por lo tanto, puede ser analizada para establecer relaciones filogenéticas y tiempo evolutivo.

El calamar gigante del Golfo de California

Las agregaciones de calamar gigante del Golfo de California, a pesar de ser actualmente foco de diversas investigaciones, no habían sido analizadas en términos de sus estructura genética. El valor biológico de la información generada en el presente trabajo, no pudo ser contrastado a este nivel y por ende debe tomarse como una primera aproximación hacia el entendimiento de la dinámica poblacional de este recurso pesquero.

La aproximación más global de la estructura de la población nos lo da la frecuencia promedio de marcadores que exhiben los individuos (Tabla IV). Aproximadamente el 42 % de los marcadores

se presentan en cada individuo, lo que bien podría asumirse como un valor próximo al de una población en equilibrio (Hardy-Weinberg) y por tanto homogénea. No obstante, este valor está basado en el número de marcadores presentes que, como se mencionó anteriormente, engloba a los heterocigotos y homocigotos para el marcador. Las diferencias entre los cebadores, tanto para las frecuencias como para el número de genotipos encontrados, están estrechamente asociadas, pero indican que no todos los cebadores están hibridando con la misma extensión el genoma de los calamares. A la vez, el alto número de genotipos detectados es un indicador de que se está analizando una buena porción del genoma, y de que se están detectando diferencias prácticamente a nivel de los individuos.

La heterocigosidad promedio estimada para las agregaciones de *Dosidicus gigas* (0.2288) exhibió valores cercanos a los reportados para otros gasterópodos, como los ostreídos y los mitílidos (Valentine y Ayala 1978, Rosa-Vélez 1986, Rosa-Vélez y Suárez-Vásquez 1991), mas, sin embargo, muy por arriba de los encontrados en otras especies de cefalópodos: 0.003-0.100 en loliginidos (Yeatman y Benzie 1993) y 0.111-0.142 para oegópsidos gonátidos (Katugin 1999). Comparado con un representante de la misma familia, 0.0024-0.0201 para el oegópsido omastréfido *Martialia hyadesi* (Brierley *et al.* 1993), la diferencia fue de un orden de magnitud. No obstante, todos los trabajos mencionados fueron obtenidos con datos de alozimas, cuyo poder de resolución es mucho menor al de los RAPD.

Shaw *et al.* (1999) encontraron valores de heterocigosidad promedio de 0.79 en loliginidos, mediante el uso de 7 loci microsatélites. Comparando dicho valores, con el obtenido en este trabajo, al parecer los RAPD ofrecieron un poder de resolución menor al esperado, tomando en consideración el número de loci analizados para el grupo.

Estructura de las agregaciones

Aparentemente no existe una clara estructuración de las agregaciones de calamares en el Golfo de California. A pesar de que las comparaciones interanuales indicaron una diferencia importante entre los individuos de 1996-1997 y los de 1998 (Tabla VI), la amplia variabilidad asociada a los loci podría estar indicando que la muestra de 1998, no fue de tamaño apropiado, y que esa fuera la causa de tal discrepancia (Tabla VII).

El análisis detallado por zonas del periodo 1996-1997, detectó en Santa Rosalía heterocigosidades

ligeramente inferiores a las de Guyamas; más adelante se discutirá con más detalle tal situación.

Los criterios empleados para contrastar por localidades y temporadas a los grupos de tallas y madurez gonal, resultaron en estimaciones con elevados valores para las coeficientes de variación y una agrupación, con un patrón secuencial en el tiempo difícil de entender. Aun así los algoritmos construyeron los árboles y formaron grupos de menor disimilitud (Figura 9), los porcentajes promedio de desviación estándar asociados sugieren que dentro de cada grupo, como lo han propuesto Erhardt y Jaquemin (1982^b), y Erhardt *et al.* (1986), pueden encontrarse varios componentes poblacionales.

Aunque el árbol de distancias genéticas entre machos y hembras exhibió un alto valor de desviación estándar, al menos no existe evidencia sólida que indique diferencias entre clases de sexo. Se han reportado mayores abundancias de hembras maduras en las localidades de las capturas artesanales (Erhardt *et al.* 1986, Michel *et al.* 1986), condición que se refleja también como una marcada dominancia de la hembras (2.5:1) a lo largo de todo el año (Hernandez-Herrera *et al.* 1996). Los datos genéticos no indican diferenciación marcada entre las clases de sexos, y sin embargo, podemos señalar que los machos presentan valores de heterocigosidad ligeramente inferiores a los de las hembras (Tabla XI). De acuerdo con Hernandez-Herrera *et al.* (*op.cit.*) los machos alcanzan la madurez física, a tallas más pequeñas. Con base en lo anterior, se plantea entonces la posibilidad de que exista un patrón sutil de segregación espacial entre hembras y machos, y una presión de selección diferencial sobre estos últimos, que explicaría sus valores de heterocigosidad más bajos.

Temporalidad de la heterocigosidad y similitud en las agregaciones

Ya que los grandes grupos de comparación por temporadas e índices de madurez, no aportaron información sólida sobre el ciclo reproductivo y los cohortes sugeridos por Erhardt *et al.* (1986), la búsqueda de esa señal se efectuó a otros niveles:

El extenso y amplio periodo de actividad reproductiva de la especie, sugerido por Klett (1981) y Erhardt *et al.* (1986) podría ser explicado en términos de los componentes poblacionales participantes. Al suponer que durante cualquier pico de reproducción los individuos, maduros e inmaduros, estarían concentrados en una zona en particular, como de hecho sucede en el Golfo (Klett 1996, Hernández-Herrera *et al.* 1996), se tendría entonces en ese instante la mayor representatividad de genes existente en las agregaciones. Inmediatamente después del pico

reproductivo, los animales adultos se dispersan de las áreas de reproducción (Klett 1981) y los inmaduros continúan su desarrollo. Un evento de tal magnitud, en términos de la estructura genética, debería de verse reflejado en un pico de heterocigosidad seguido por una caída paulatina de esos valores. Lo anterior, acentuado aún más por el proceso descrito por Zouros y Foltz (1984) para muchas poblaciones de moluscos, y en el que durante las fases juveniles existe una purga de heterocigotos de la población, parece ajustarse plenamente al patrón observado en la Figura 8. Las mayores frecuencias de individuos maduros (Figura 12), que se encontraron en asociación estrecha a los picos reproductivos detectados, ocurrieron en junio de 1996, octubre a noviembre de 1996, y de febrero a marzo de 1997. En apoyo a lo anterior, consistentemente los grupos de individuos maduros, arrojaron valores ligeramente menores de heterocigosidad comparándolos con los grupos de jóvenes (Tabla X).

Los valores de similitud siguen un comportamiento mas homogéneo, pero se aprecia que inmediatamente después del pico reproductivo, se presenta un incremento en los intervalos de confianza que bien pudieran ser reflejo de la entrada y salida de animales, desde y hacia la zona de reproducción. Particularmente notorio es el evento de principios de 1997 que sugiere la salida o reducción de la población de 1996 y la entrada de nuevos componentes de 1997. Más adelante se retomará este punto.

Asociación de los individuos inferida por parsimonia.

La construcción del árbol filogenético permitió establecer relaciones entre los individuos que no hubieran sido detectadas usando los criterios comunmente empleados en el análisis de las capturas comerciales. Esto indica en primera instancia, y en coincidencia con Shaw *et al.* (1999), que el grupo es extremadamente plástico en cuanto a su morfología. Dentro de un solo grupo, genéticamente relacionado, podemos encontrar individuos de diferentes tallas y en diferentes estadios de madurez gonadal. Como puede apreciarse en la Figura 9, los individuos quedan agrupados en clusters relativamente pequeños en función de las diferencias de heterocigosidad en exceso interna al grupo y de la similitud en los alelos nulos raros (Tabla XIV, Figura 10). En la mayoría de los casos, un número no mayor de 6 o 7 individuos conformó cada cluster, lo que imposibilitó llevar a cabo un análisis detallado de la estructura de tallas y estadios de madurez.

La primera aproximación hacia el elucidamiento de un patrón temporal de las agregaciones en función de la asociación genética de sus miembros, planteó una diferenciación marcada entre el

grupo A y el resto de los grupos (Figuras 10 y 12).

El cálculo de la distancia genética entre los grupos A-F, empleando el algoritmo Fitch-Margoliash, planteó un nuevo aspecto que, aunque se había evidenciado sutilmente al contrastar las localidades, y al analizar la temporalidad de los valores de heterocigosidad y los índices de similitud, no parecía contundente: la distancia filogenética. Santa Rosalía exhibió valores de heterocigosidad más bajos que Guaymas, y eso aparentemente era reflejo de que la muestra de 1998, colectada en esa localidad y que había mostrado las menores heterocigosidades intra-anales, estuviera sesgando negativamente el estimador. Las distancias filogenéticas indican que esas diferencias son atribuibles a un decremento histórico de la heterocigosidad y de los índices de disimilitud. Esta diferencia es también apreciable en la figura 8, donde se percibe una ligera disminución de la heterocigosidad y un incremento en la similitud. Indudablemente ambos fenómenos son atribuibles a una pérdida de individuos dentro de las agregaciones, si bien esto pudiera considerarse efecto de un patrón interanual de movimientos hacia afuera del Golfo, como el sugerido por Klett (1981), no puede descartarse la posibilidad de que las actividades extractivas sean también una componente de dicho fenómeno.

Los valores de similitud y heterocigosidad entre los grupos de clusters definidos en la fig. Figura 9, resultaron congruentes con los promedios poblacionales, pero exhibieron los valores más bajos en los coeficientes de variación. Las coincidencias en el análisis de mayor consenso efectuado para contrastar los árboles generados por parsimonia de Dollo, algoritmo de Fitch-Margoliash y el método de Ward con disimilitud porcentual, se consideró suficiente evidencia para validar las agrupaciones como "grupos naturales" y definir los grupos (A-F) como cohortes putativas.

El rearrreglo de los grupos por tallas, segregando de entrada al cohorte A (Figura 13), demostró la presencia de un grupo de calamares gigantes de la variedad enana (< 35cm), cuyo aporte a las agregaciones del Golfo de California fue de mayor importancia durante 1998. El resto de las cohortes son mucho más homogéneas genéticamente, pero aun así diferenciables: la mayor parte de los individuos colectados durante 1996 pertenecientes a las cohortes B y C (talla modal 50cm), mientras que las capturas de 1997 quedaron englobadas por los cohortes E y F (talla modal 70cm). Por último, la cohorte D es de carácter intermedio, incluyendo organismos tanto de 1996 como de 1997 (talla modal 55cm). Estos datos concuerdan con las observaciones de Hernández-Herrera *et al.* (1996) y U. Markaida (com. pers.), quienes coinciden al señalar que las capturas de 1996 y 1997 estuvieron dominadas por las tallas cercanas a los 60 cm de longitud de manto. Por

otro lado, reflejan la estructura de tallas sugerida por Nigmatullin *et al.* (en prep.).

El análisis de los movimientos con base en la distribución y al seguimiento de la traza genética de cada cohorte permitió plantear un panorama general de la dinámica de la especie dentro del Golfo (Figura 14). En terminos generales, la distribución de los calamares gigantes fue similar a la propuesta por Klett (1981). Los individuos ocuparon la costa oriental durante el periodo frio del año, y la costa occidental durante las condiciones cálidas.

El cohorte A o “forma enana” exhibió una dinámica compleja, en la que no aparecieron grupos interrelacionados, y que sugiere que su presencia esta asociada al aporte externo anual. De acuerdo con Nigmatullin *et al.* (*op.cit.*) esta forma ocurre principalmente en aguas ecuatoriales, su baja abundancia en el Golfo durante 1995-1997 y su reaparición como captura dominante durante 1998 y 1999 (U. Markaida, comp. pers.), plantea la posibilidad de que esta forma se presente durante la formación de eventos ENSO, pues otro año en el que se han detectado en números importantes fueron en 1981 (Ramírez y Klett 1985). A finales de 1997, el efecto ENSO de 1996-97 alcanzó la porción central del Golfo, permitió la entrada de esta forma en números mayores, desplazando a su vez las capturas de las otras variedades hacia fuera del Golfo (U. Markaida, com. pers.).

Los cohortes B y C presentaron un comportamiento muy similar, aunque desfasado por cerca de 3 meses. Los individuos inmaduros se localizaron en Guaymas a finales de Invierno de 1996 y en Santa Rosalía para el verano otoño de ese año. En la cohorte B se detecta la entrada del nuevo componente inmaduro en junio que pasó poco tiempo en Guaymas, y maduro en Santa Rosalía.

En el cohorte D se observaron reminiscencias de grupos de 1996 de verano otoño en Santa Rosalía que aparentemente no guardan relación con las cohortes previamente descritas. Asimismo, se observa el establecimiento de este nuevo componente de 1997 en la zona de Guaymas a finales del invierno de 1997. Al igual que para el Cohorte B se aprecia la entrada de un nuevo componente en junio.

En el cohorte E se observan componentes de 1996 en el área de Santa Rosalia, que difícilmente pueden relacionarse con el resto de los componentes en ese año. De estos componentes, el de octubre aparentemente se mueve hacia Guaymas, donde completa su maduración en invierno de 1997.

El cohorte F muestra una secuencia clara de entrada, desplazamiento y maduración, y estadios de madurez, que ocurre desde verano de 1997. De nueva cuenta no pudo establecerse relación estrecha entre este y los anteriores cohortes de 1997.

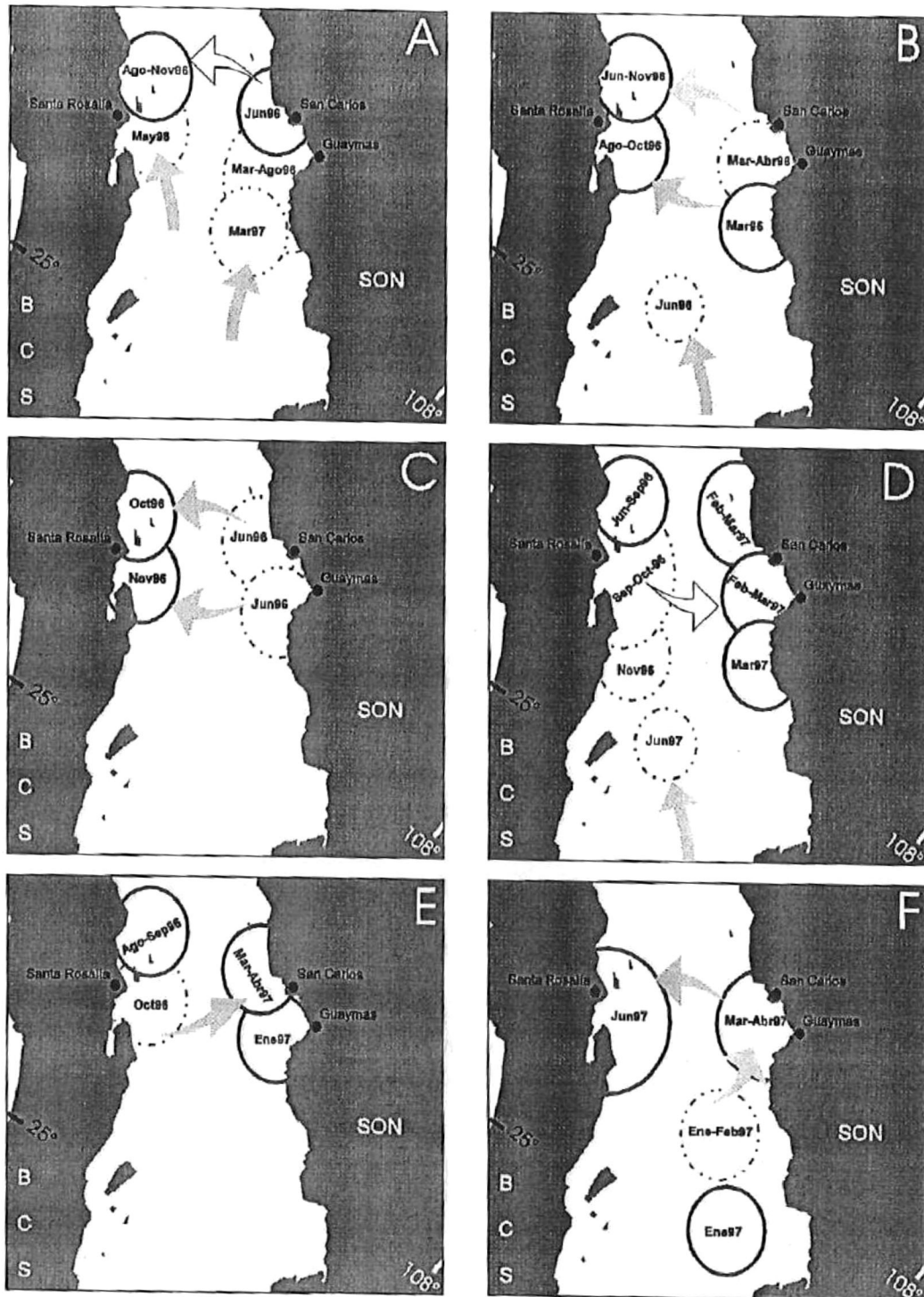


Figura 14. Patrón de movimientos de los cohortes putativos de calamares gigantes del Golfo de California. Los círculos de contorno continuo representan organismos maduros; los círculos punteados, inmaduros. Las flechas de base recta indican aportes sin huella histórica (ascendencia). Las flechas estilizadas en blanco representan ascendencia dudosa, y la grises, ascendencia directa. En la esquina superior derecha, la cohorte. Los círculos no delimitan ninguna zona referenciada geográficamente, sólo señalan una tendencia de agrupamiento.

En términos generales, aunque se encontraron coincidencias con el patrón propuesto por Klett (1981), el número de cohortes a los que no se pudo dar seguimiento, limitan la interpretación que pudiera hacerse al respecto. Los cuatro componentes poblacionales sugeridos por Ehrhardt *et al.* (1986) no ocurren exclusivamente de enero a abril, pues, al menos durante los dos años de estudio, un componente inmaduro de junio ingresó hacia Santa Rosalía, en lo que podría considerarse como un acceso tardío (Figura 14). Por otro lado, el cohorte de mayor incertidumbre en la interpretación de las relaciones existentes, es precisamente aquel en el que se mezclan los cohortes de 1996 y 1997.

La naturaleza de las agregaciones se ha considerado de carácter reproductivo, (Klett 1996, Hernández-Herrero *et al.* 1996), sin embargo, existe un traslapamiento complejo de tallas y estadios de madurez que lleva a pensar que la reproducción pudiera no ser la razón primaria por la que se formen dichas agregaciones. Si el proceso de migración estuviera orientado hacia las actividades reproductivas, en los ciclos de entrada y salida del Golfo lo más redituable en términos energéticos sería “sincronizar” los ciclos gonádicos, para que una vez llegado el momento de la reproducción la mayoría de los individuos estuvieran físicamente preparados y tuvieran las mismas probabilidades de aparearse.

Los movimientos de las cohortes o componentes poblacionales, exhibieron un acomplamiento relacionado, en apariencia, con las áreas de surgencia de la zona central del Golfo (Alvarez-Borrego y Lara-Lara 1991, Santamaría del Angel *et al.* 1994), razón por la que se sugiere que el carácter primario de las agregaciones podría ser el alimento. Una vez concentrados en las zonas de mayor productividad, pueden dedicar entonces gran parte de su energía al proceso de maduración y reproducción. La competencia intraespecífica y las condiciones de la calidad y cantidad del alimento dentro de la zona, serían las que estarían promoviendo los diferentes estados físicos de los individuos, un patrón similar al anterior puede ser evidenciado para otras especies en el Golfo (Hamman *et al.* 1988).

Como se demostró en función de los movimientos de los grupos filéticos, sea cual fuere la naturaleza primaria de las agregaciones, las entradas de individuos al golfo se extienden a lo largo de todo el año, y es durante la transición verano-otoño, cuando prácticamente se pierde la señal del año o *stock* pesquero anterior. En coincidencia con Klett (1981) y Ehrhardt *et al.* (1996) la presencia del recurso en el Golfo de California es altamente dependiente de los aportes poblacionales del exterior del mismo.

Consideraciones finales

A pesar de que se logró ajustar un protocolo para el análisis de las agregaciones de calamar mediante RAPD, es importante señalar que la baja variabilidad entre los individuos, considerando el número de marcadores analizados, indica que en realidad las distancias genéticas aunque importantes al nivel de las cohortes putativas dentro del Golfo, pudieran carecer de significancia al compararse a otros niveles. Los marcadores proporcionaron una resolución casi a nivel de los individuos.

De acuerdo con Carvalho y Hauser (1994), la falta de diferenciación genética entre dos *stocks* pesqueros puede deberse a: a) Flujo suficiente de genes para mantener panmixia entre las poblaciones; b) reclutamiento esporádico a distancia, que amortigua la diferenciación; c) selección estabilizadora ecológica, en la que condiciones equivalentes del hábitat moderan la diferenciación; d) divergencia reciente del grupo panmítico; e) deficiencias en el método para detectar los niveles de variación; y f) la existencia de un sólo *stock*.

Al no contar con ningún otro tipo de estudio de esta naturaleza, los estimadores genéticos basados en los RAPD aportan información valiosa pero que debe ser tomada con las reservas de que no existe una escala que pudiera medir la representatividad de estos datos con respecto, por ejemplo, a un marcador codominante.

Nelson y Soulé (1987), y Utter (1994) señalan que la variación detectable estará en función del tipo de marcador empleado y por lo tanto un método alternativo debiera ser contrastado con los resultados aquí obtenidos para establecer el nivel de resolución en que están circunscritos los estimadores.

El seguimiento de esa "detectabilidad de la variabilidad" deberá considerarse paralelamente con la información de rutina (morfometría) ya que por sí solo, el uso de los marcadores genéticos no es la respuesta universal en el estudio de las poblaciones naturales.

CONCLUSIONES

1. Del diseño experimental del proceso de estandarización para marcadores RADP, se ajustaron 2 ciclos PCR óptimos para 10 cebadores (OPc). Bajo condiciones controladas se obtuvieron 265 productos de amplificación que fueron reproducibles experimentalmente en el grupo control de réplicas.
2. Los marcadores mostraron ser de utilidad para el cálculo de los estimadores genéticos de los parámetros poblacionales de heterocigosidad ($H = 0.2206$) y similitud ($S = 0.7104$) y coeficientes de variación de 47% y 7.3%, respectivamente.
3. La partición de la varianza indica que el 66% de la varianza es atribuible a los *loci* y, por tanto, reflejo de la diversidad genética y no de un sesgo del muestro.
4. Las agregaciones muestran una amplia diversidad genética intrapoblacional atribuible a la mezcla de diversos componentes o cohortes en el tiempo y en el espacio. No se presentaron grupos con asociaciones claras entre las clases de talla, madurez sexual, localidades y temporadas.
5. Se distinguen tres picos de reproducción asociados con altos valores relativos de heterocigosidad.
6. El análisis filogenético por parsimonia permitió establecer 6 cohortes putativas, que mostraron valores bajos, pero significativos, de diferenciación genética entre las cohortes.
7. La cohorte A (enana) esta compuesta por individuos de tallas pequeñas (< 35 cm) y es genéticamente diferenciable de las otras cohortes.
8. El análisis espacial y temporal de las cohortes B-F indican una permanencia promedio de 6 meses dentro del Golfo de California y una renovación anual de los componentes poblacionales.

RECOMENDACIONES

Aunque generalmente se hacen referencia a las variables asociadas con la mezcla de PCR, durante el análisis de RAPD, se recomienda mayor atención a la alta calidad del templete (peso molecular, banda fina y definida de ADN y concentraciones precisas) que fue la variable que arrojó diferencias singnificativas en la replicación experimental.

A pesar de que los RAPD mostraron su aplicabilidad para el estudio poblacional del calamar gigante, debe tenerse en cuenta que aún existe una serie de pruebas que permitan corroborar que los parámetros estimados no son producto de un sesgo por una errónea clasificación de productos no homólogos (Southern Blotting).

Se recomienda como prioritario obtener una muestra extensiva que abarque ambas costas del Golfo de California para evaluar porqué la señal de la cohorte putativa se pierde, y cuáles las relaciones de parentesco entre los individuos que permitan definir con mayor detalle los movimientos dentro del Golfo y su relación con agregaciones de otras zonas del Pacífico.

La presencia de los calamares enanos como posible consecuencia de los eventos ENOS podría ser relevante para el entendimiento de las fluctuaciones de las poblaciones de esta especie, sin embargo se requeriría de un esfuerzo dirigido hacia el análisis histórico de las capturas de las flotas que operen o hayan operado en algún momento sobre los *stocks* de calamar gigante del Pacífico.

LITERATURA CITADA

- Abo-elwafa, A., K. Murai y T. Shimada. 1995. Intra- and Inter-specific variations in *Lens* revealed by RAPD markers. *Theor Appl Genet* 90: 335-340.
- Alvarez-Borrego, S. y J.R. Lara-Lara. 1991. The physical environment and primary productivity of the Gulf of California. En: J. P. Dauphin y B. R. T. Simoneit (eds.) The Gulf and Peninsular Provinces of the Californias. *Ammer. Assoc. Petrol. Geol. Mem.* 47: 555-567.
- Badán-Dangón., A., C.J. Koblinsky y T. Baumgartner. 1985. Spring and Summer in the Gulf of California: observations of surface thermal patterns. *Ocean. Acta* 8: 13-22.
- Bielawski J.P., K. Noack y D.E. Pumo. 1995. Reproducible amplification of RAPD markers from vertebrate DNA. *BioTechniques* 18(5): 45-48
- Brierley, A., J.Thorpe, M.R. Clarke y H.R. Martins. 1993. A preliminary Biochemical Genetic Investigation of Population Structure of *Loligo forbesi* Steenstrup, 1856 from the British Isles and the Azores. 61-69 p. En: Okutani, T., R.K. O'Dor y T. Kubodera (eds.), *Recent Advances in Fisheries Biology*. Tokai University Press, Tokyo. 1023 pp.
- Brierley, A., J.Thorpe, G.J. Pierce, M.R. Clarke, y P.R. Boyle. 1995. Genetic variation in the neritic squid *Loligo forbesi* (Myopsida: Loliginidae) in the northeast Atlantic Ocean. *Marine Biology* 122: 79-86.
- Carvalho, G.R. y L. Hauser. 1994. Molecular genetics and the *stock* concept in fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 4: 326-350.
- Carvalho, G.R., A. Thompson y A.L. Stoner. 1992. Genetic Diversity and Population Differentiation of the short-fin squid *Illex argentinus* in the Southwest Atlantic. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 158; 105-121.
- Caetano-Anollés G, B.J. Bassam y P.M. Gresshoff. 1991^a. High resolution DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology* 9: 553-557.
- Caetano-Anollés G, B.J. Bassam y P.M. Gresshoff. 1991^b DNA amplification fingerprinting: a strategy for genome analysis. *Plant Mol. Biol. Rep.* 4: 294-307.
- Caetano-Anollés G., B.J. Bassam y P.M. Gresshoff. 1992. Primer-template interactions during DNA amplification fingerprinting with single arbitrary oligonucleotids. *Molecular and General Genetics* 235: 157-165.
- Caetano-Anollés G. 1993. Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers. *PCR Methods and Applications*: 85-94

- Carlson, J.E., L.K. Tulsieram, J.C. Glaubitz, V.W.K. Luk, C. Kauffeldt y R. Rutledge. 1991. Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. *Theoretical and Applied Genetics* 83: 194-200.
- Clark, C.W. 1976. *Mathematical Bioeconomics, The Optimal Management of Renewable Resources*. Wiley and Sons. New York. 352 pp.
- Clark A.G. y C.M.S. Lanigan. 1993. Prospects for estimating nucleotide divergence with RAPDs. *Mol. Biol. Evol.* 10(5): 1096-1111.
- Crowley P. 1992. Resampling methods for computation-intensive data analysis in ecology and evolution. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 23: 405-447
- Dawe, E. G. y H. J. Drew. 1981. Record of mature female short-finned squid *Illex illecebrosus*, captured inshore at Newfoundland and previous captures of matures females in Northwest Atlantic. *J. Northw. Atl. Fish. Sci.*, 2: 61-65.
- DeBry, R. W. and N. A. Slade. 1985. Cladistic analysis of restriction endonuclease cleavage maps within a maximum-likelihood framework. *Systematic Zoology* 34: 21-34.
- De la Rosa, M., J.T. Silva, V.M. García-Tirado y S. García-Peña. 1992. El calamar: Una pesquería en desarrollo. Documento Interno. *CRIP-Ensenada. IPN*.
- Dinesh, K.R., T.M. Lim, K.L. Chua, W.K. Chan y P.E. Phang. 1993. RAPD analysis: An Efficient Method of DNA Fingerprinting in Fishes. *Zoological Science* 10: 894-854.
- Don R.H., P.T. Cox, B.T. Wainright, K. Baker y J.S. Mattick. 1991. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* 19: 4008.
- Ehrhardt, N. 1991. Potential impact of a seasonal migratory jumbo squid (*Dosidicus gigas*) stock on a Gulf of California sardine (*Sardinops sagax caerulea*) population. *Bull. Mar. Sci.* 49(1-2): 325-332.
- Ehrhardt, N.M. y P.S. Jacquemin. 1982^a. Crecimiento del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en el Golfo de California, México, durante 1989. *Cienc. Pesq.* 3: 33-39
- Ehrhardt, N.M. y P.S. Jacquemin. 1982^b. Descripción de la pesquería del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) durante 1980 en el Golfo de California. Flota y poder de pesca. *Cienc. Pesq.* 3: 41-60
- Ehrhardt, N. M., P.S. Jacquemin, A. Solís, F. García, G. González, J.G. Ortiz. y P. Ulloa. 1982^a. Crecimiento del calamar gigante *Dosidicus gigas* en el Golfo de California, México, durante 1980. *Cienc. Pesq.* 3: 33-40.

- Ehrhardt, N. M., P.S. Jacquemin, F. García, J.G. González, J. M. López., J. Ortiz. y A. Solís. 1983. On the fishery and biology of the giant squid *Dosidicus gigas* in the Gulf of California, Mexico. pp. 306-339. En J. F. Caddy (ed.). *Advances in assessment of world cephalopod resources. FAO Fish. Tech. Pap.* 231:
- Ehrhardt, N. M., A. Solís, P.S. Jacquemin, J.G. Ortiz, P. Ulloa., G. González y F. García. 1986. Análisis de la biología y condiciones del stock del calamar gigante *Dosidicus gigas* en el Golfo de California, México, durante 1980. *Cienc. Pesq.* 5: 63-76.
- Ferguson A. 1994. Molecular genetics in fisheries: current and future perspectives. *Reviews in Fish Biology and Fisheries.* 4: 379-383
- Felsenstein, J. 1989. PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* 5: 164-166.
- Food and Agriculture Organization. 1988 . Catches and Landings 1986. *Yearb. Fish. Stat.* No. 62. 479 pp.
- García Silva, G., M. Ortiz y S.G. Marinone. 1996. Isóbatas digitalizadas del Golfo de California. *Comunicaciones Académicas: Serie Oceanografía Física.* CICESE (CTOFT9601). 23 pp.
- Guerrero E., F. Galván, G. León y M. Reinecke. 1992. Abundancia relativa y composición de tallas del calamar gigante *Dosidicus gigas*, D'Orbigny (1935), en la costa oriental de Baja California Sur, México. *IV Congreso de la Asociación de Investigadores del Mar de Cortés. Septiembre 2-4, 1992, Ensenada, B. C., México.*
- Guo, S.W. y E. Thompson. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48: 361-372.
- Hadrys H., M. Balick y B. Schierwater. 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol. Ecol.* 1: 55-63.
- Hammann, M.G., T.R. Baumgartner y A. Badán-Dangón. 1988. Coupling of the Pacific Sardine (*Sardinops sagax caeruleus*) life cycle with the Gulf of California pelagic environment. *CALCOFI Rep.*, Vol. XXIX: 102-109.
- Higuchi, R., C. Fockler, G. Dollinger, y R. Watson. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology.* 11: 1026-1030.
- Hernández-Herrera, A., E. Morales B., M. Nevares M., A. Balmori R. y G. Rivera P. 1996. Distribución de tallas y aspectos de la reproducción del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en el Golfo de California, México, en 1996. IPN. SEMARNAP. *Ciencia Pesquera No. 12.*

- Hoelzel, A.R. y G.A. Dover. 1991. Mitochondrial D-loop DNA variation within and between populations of the minke whale *Balaenoptera acutorostrata*. 171-182 p. En: Hoelzel, A.R. (ed.) *Genetic Ecology of Whales and Dolphins. Rep. int. Whal. Commn. Special Issue 13*.
- Hu, J. y C.F. Quiros. 1991. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell Reports* 10: 505-511
- Isabel N., J. Beaulieu, P. Thériault & J. Bousquet. 1999. Direct evidence for biased gene diversity estimates from dominant random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints. *Mol. Ecol.* 8: 477-483
- Katugin, O.N. 1993. Genetic variation in the squid *Beryteuthis magister* (Berry, 1913) (Oegopsida: Gonatidae). 201-213 p. En: Okutani, T., R.K. O'Dor y T. Kubodera (eds.), *Recent Advances in Fisheries Biology*. Tokai University Press, Tokyo. 1023 pp.
- Katugin, O.N. 1999. Intraspecific genetic variation and population differentiation of the squid *Beryteuthis magister* in the North Pacific Ocean. *Russian Journal of Marine Biology* 25(1): 34-45.
- Klein-Lankhorst R.M., A. Vermunt, R. Weide, T. Liharska y P. Zabel. 1991. Isolation of molecular markers from tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Theoretical and Applied Genetics* 83: 108-114
- Klett, A. 1981. Estado actual de la pesquería del calamar gigante en el estado de Baja California Sur. CRIP-La Paz. IPN. Dep. Pesca. *Serie Científica* 21:1-28
- Klett, A. 1982. Jumbo squid fishery in the Gulf of California, Mexico. *Proceedings of the International Squids Symposium*. August 9-12, 1981, Boston, Massachusetts. New-England Fisheries Development Found, Inc., Boston. MA USA. 81-100 p.
- Klett, A. 1996. Pesquería del calamar gigante *Dosidicus gigas*. En: Casas-Valdez, M. y G. Ponce-Díaz (eds.) *Estudio del Potencial Pesquero y Acuicola de Baja California Sur*. 267 pp.
- Leal-Ocampo, R. 1994. Pesquería del calamar gigante *Dosidicus gigas* (D'Orbigny, 1835) en la zona norte del Pacífico mexicano. Tesis profesional. IPN, CICIMAR, La Paz: 81 pp.

- Lipinski, M. 1979. Universal maturity scale for the commercial important squid (Cephalopoda: Teuthoidea). The results of maturity classification of the *Illex illecebrosus* (LeSueur, 1821) populations for the years 1973-1977. *ICNAF Res. Doc.* 79/II/38, Serial No. 5364: 40 pp.
- Lynch M. 1990. The similarity index and DNA fingerprinting. *Mol. Biol. Evol.* 7(5): 478-484.
- Lynch M. y G. Milligan. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol. Ecol.* 3: 91-99.
- Maki M. y S. Horie. 1999. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers reveal less genetic variation in the endangered plant *Cerastium fischerianum* var. *molle* than in the widespread conspecific *C. fischerianum* var. *fischerianum* (Caryophyllaceae). *Mol. Ecol.* 8: 145-150
- Martin, J., J.A. Gow, M. Péloquin y C.W. Greer. 1994. Numerical analysis and the application of random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction to the differentiation of *Vibrio* strains from a seasonally cold ocean. *Can. J. Microbiol.* 40: 446-455.
- Michel, G.E., A. Klett y R.I. Ochoa. 1986. Estudio preliminar para la determinación de la madurez gonádica del calamar gigante (*Dosidicus gigas*). D'Orbingy 1835. *Cienc. Pesq.* 5: 77-89
- Michelmore, R.W., I. Paran y R.V. Kesseli. 1991. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9828-9832.
- Muluvi G.M., J.I. Sprent, N. Soranzo, J. Provan, D. Odee, G. Folkard, J.W. McNicol & W. Powell. 1999. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of genetic variation in *Moringa oleifera* Lam. *Mol. Ecol.* 8: 463-470

- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590
- Nelson, K. y M. Soulé. 1987. Genetical conservation of exploited fishes. 345-368 p. *En: Ryman, N. y F. Utter (eds.) Population Genetics of Fishery Management.* University of Washington Press, Seattle.
- Nesis, K. N. 1970. The biology of the giant squid of Peru and Chile, *Dosidicus gigas*. *Oceanology*, 10(1): 108-118. (Engl. Trans.).
- Nesis, K. N. 1983. *Dosidicus gigas*. pp: 215-231. *En: P. R. Boyle (ed.), Cephalopod Live Cycles.* Vol. 1. Academic Press, London. 475 pp.
- Nava-Sánchez, E.D., D.S. Grosline y A. Molina-Cruz. 1998. The Baja Peninsula Borderland: Structural and sedimentological characteristics. Proceedings of the American Geophysical Meeting, Fall 1998. P. F513.
- Norman J., J.M. Murphy, G. Pierce y P.R. Boyle. 1994. Preliminary molecular genetic analysis of stock structure in the squid *Loligo forbesi* (Steenstrup). ICES Shellfish Committee, C.M. 23. 8 pp.
- Nigmatullin Ch.M., V.V. Laptikhovsky, N.M. Mokrin, R.M. Sabirov y U. Marcaida. (en prep.). ON LIFE HISTORY TRAITS OF THE JUMBO SQUID *Dosidicus gigas*
- Paran, I., R. Kesseli y R. Michelmore. 1991. Identification of RFLP and RAPD markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce using near-isogenic lines. *Genome* 34, 1021-1027.
- Park, L. y P. Moran. 1994. Developments in molecular genetic techniques in fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 4: 272-299
- Parker, P.G., A.A. Snow, M.D. Schug, G.C. Booton y P.A. Fuerst. 1998. What Molecules can tell us about populations; choosing and using a molecular marker. *Ecology* 72(9); 361-382.
- Pierce G.J., L.C. Hastie, A. Guerra, R.S. Thorpe, F.G. Howard y P.R. Boyle. 1994. Morphometric variation in *Loligo forbesi* and *Loligo vulgaris*: regional, seasonal, maturity and worker differences. *Fish. Res.* 21: 127-148.
- Rabouam C., A.M. Comes, V. Bretagnolle, J.F. Humbert, G. Periquet y Y. Bigot. 1999. Features of DNA fragments obtained by random amplified polymorphic DNA (RAPD) assays. *Mol. Ecol.* 8: 493-503
- Rafalski, J.A., S.V. Tingey y J.G.K. Williams. 1991. RAPD markers-a new technology for genetic mapping and plant breeding. *AgBiotech News and Information* 3, 645-648.

- Ramírez R., M. y A. Klett T. 1985. Composición de la captura del calamar gigante en el Golfo de California durante 1981. *Trans. CIBCASIO*, X: 124-137.
- Rathjen, W. F. y G. L. Voss. 1987. The cephalopod fisheries: a review. *En*: P. R. Boyle (ed.) *Cephalopod Live Cycles* Vol. 2. Academic Press, London: 441 pp.
- Reiter, R.S., J.G.K Williams, K.A. Feldman, J.A. Rafalski, S.V. Tingey, y P.A. Scolnik. 1992. Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1477-1481.
- Reynolds, J. B., B. S. Weir, and C. C. Cockerham. 1983. Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics* 105: 767-779.
- Roden, G.I. 1958. Oceanographic and Meteorological Aspects of the Gulf of California. *Pacific Science* 12(1): 21-45.
- Roden, G.I. 1964. Oceanographic aspects of Gulf of California. *En*: T.H. van Andel y G.G. Shor, Jr. (eds.) *Marine Geology of the Gulf of California*. Ammer. Assoc. Petrol. Geol. Mem. 3. 24-A
- Roden, G.I. e I. Emilsson. 1979. Physical oceanography of the Gulf of California: Trabajo presentado en el Simposium sobre el Golfo de California, Universidad Nacional Autónoma de México, Mazatlán, Sin., México. Manuscrito sin publicar 58 pp.
- Rosa-Vélez, J. de la y F. Rodríguez-Romero. 1989. Enfoque genético para el análisis de poblaciones de recursos pesqueros; el caso de la población ostrícola de la laguna de Términos, Campeche. 254-284 p. *In*: Rosa-Vélez, J. de la y F. González-Farías (eds.) *Temas de Oceanografía Biológica en México*. Ensenada. 337pp.
- Rosa-Vélez, J. de la y A. Suárez-Vásquez. 1991. Variabilidad genética del caracol *Astrea undosa* Wood, de la bahía de Todos Santos, B.C., México. *Inv. Mar. CICIMAR*, 6(1): 165-173.
- Sánchez-Juárez, E. 1991. Resultados obtenidos durante la segunda etapa del Programa de Prospección y Evaluación del Calamar Gigante *Dosidicus gigas*, realizada en el periodo 14 de junio al 15 de diciembre de 1990, en el Pacífico mexicano. Programa de Prospección y Evaluación del Calamar Gigante. *Secretaría de Pesca*. Instituto Nacional de la Pesca. CRIP El Sauzal, Ensenada, B. C., México: 47 pp.
- Santamaría del Angel, E., S. Alvarez-Borrego y F.E. Müller-Karger. 1994. Gulf of California biogeographic regions based on coastal zone scanner imagery. *J. Geoph. Res.* 99(4): 7411-7421.
- Sato, T. 1976. Resultados de la pesca exploratoria para *Dosidicus gigas* (D'Orbigny) frente a California y México. *FAO Inf. Pesca* 170(1): 62-68.

- SECRETARÍA DE PESCA. 1992, 1998. ANUARIOS ESTADÍSTICOS DE PESCA. SEPESCA. México.
- Shaw P.W. 1997. Polymorphic microsatellite markers in a cephalopod: the veined squid *Loligo forbesi*. *Mol. Ecol.* 6: 297-298
- Shaw P.W., G.J. Pierce & P.R. Boyle. 1999. Subtle population structuring within a highly vagile marine invertebrate, the veined squid *Loligo forbesi*, demonstrated with microsatellite DNA markers. *Mol. Ecol.* 8: 407-417
- Smith P.J. 1985. Distribution of two species of arrow squid (*Nototodarus*) around New Zealand. New Zealand Ministry Of Agriculture and Fisheries. *Fisheries Research Division Occasional Publications* 49: 5-14
- Sokal, R.R. y F.J. Rohlf. 1981. Biometry. W.H. Freeman & Co., New York. 427pp.
- Suda, A. 1973. Development of fisheries of nonconventional species. *J. Fish. Res. Board Can.* 30: 2121-2158.
- Suzuki, H., M. Ichikawa y G. Matsumoto. 1993. Genetic Approach for Elucidation of Squid Family. 531-535 p. In: Okutani, T., R.K. O'Dor y T. Kubodera (eds.). *Recent Advances in Fisheries Biology*. Tokai University Press, Tokyo. 1023 pp.
- Thorpe R.S., D.P. McGregor, A.M. Cumming y W.C. Jordan. 1994. DNA evolution and colonization sequence of island lizards in relation to geological history: mtDNA RFLP, cytochrome B, cytochrome oxidase, 12S rRNA sequence and nuclear RAPD analysis. *Evolution.* 48(2) 230-240
- Tingey S.V. y J.P. del Tufo. 1993. Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers. *Plant. Physiol.* 101: 349-352
- Utter, F.M. 1994. Perspectives of molecular genetics and fisheries into the 21st century. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 4: 374-378.
- Valentine, J.W. y F.J. Ayala. Adaptive strategies in the sea. p. 323-345. En: Battaglia, B. y J.A. Beardmore (eds.) *Marine Organisms: Genetics, Ecology and Evolution*. Plenum Press, New York
- Voss, E. 1979. Mexico's potential cephalopod fisheries. In *Memorias del primer Simposium Nacional de Recursos Pesqueros Masivos de México*, Ensenada, B. C., 28-30 September 1976, Vol. II: p. 267-279. S. I. C. Subsecretaría de Pesca. Instituto Nacional de Pesca.
- Weatherhead P.J. y R.D. Montgomerie. 1991. Good news and bad news about DNA fingerprinting. *Trends in Ecology and Evolution.* 6: 173-174.

- Weir, B.S. 1996. Genetic Data Analysis II. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts. 445 pp.
- Welsh J. y M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.* 18: 7213-7218
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, y S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18, 6531-6535.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, y S.V. Tingey. 1991. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. *Nucleic Acid Research* 18: 6531-6535.
- Worms, J. 1983. World fisheries for cephalopods: a synoptic review. En: J. F. Caddy (Ed.), Advances in assessment of world cephalopod resources. *FAO Fish. Tech. Pap.* 231: 1-20.
- Wormuth, J. H. 1976. The biogeography and numerical taxonomy of the oegopsid squid family Ommastrephidae in the Pacific Ocean. *Bull. Scripps. Int. Oceanogr. Univ. Calif.* 23: 90 pp.
- Wright, S. 1951. Evolution and the Genetics of Populations. The Theory of Gene Frequencies. *University of Chicago Press*, Chicago. 511 pp.
- Yeatman, J.M. y J.A.H. Benzie. 1993. Cryptic Speciation in *Loligo* from Northern Australia. 641-652 p. En: Okutani, T., R.K. O'Dor y T. Kubodera (eds.) *Recent Advances in Fisheries Biology*. Tokai University Press, Tokyo. 1023 pp.
- Yu, K. y K.P. Pauls. 1992. Optimization of the PCR programm for RAPD analysis. *Nucleic Acid Res.* 20: 2606.
- Yu, K. y K.P. Pauls. 1994. Optimization of the PCR programm for RAPD analysis. 193-200 p. En: Griffin, H.G. y A.M. Griffin (eds.) *PCR Technology: Current Innovations*. CRC Press. Boca Raton, Florida. 370 pp.
- Zouros, E. y D.W. Foltz. 1984. Possible Xplanations of the heterozygote deficiency in bivalve molluscs. *Malacology* 25(2): 583-591.

APÉNDICE A

DATOS MORFOMÉTRICOS Y MERÍSTICOS DE LOS ESPECÍMENES ANALIZADOS

Información morfométrica y merística morfológica de los especímenes empleados para el análisis genético. LM= longitud del manto; M = macho; H= Hembra; U= Indeterminado; ND= información no disponible.

Muestra	Fecha	LM (cm)	Sexo	Madurez Gonadal	Localidad
M3s334Mr96	26-Mar-96	49.6	M	3	Guaymas, Son.
H5s350Mr96	26-Mar-96	71.6	H	5	Guaymas, Son.
M3s347Mr96	26-Mar-96	45.6	M	3	Guaymas, Son.
H2s345Mr96	26-Mar-96	49.1	H	2	Guaymas, Son.
M4s343Mr96	26-Mar-96	45.5	M	4	Guaymas, Son.
H4s341Mr96	26-Mar-96	70.8	H	4	Guaymas, Son.
M3s338Mr96	26-Mar-96	45.0	M	3	Guaymas, Son.
M5s351Mr96	26-Mar-96	50.0	M	5	Guaymas, Son.
M2s335Mr96	26-Mar-96	43.9	M	2	Guaymas, Son.
H2s333Mr96	26-Mar-96	49.9	H	2	Guaymas, Son.
H4s331Mr96	26-Mar-96	66.4	H	4	Guaymas, Son.
H3s330Mr96	26-Mar-96	49.1	H	3	Guaymas, Son.
M3s328Mr96	26-Mar-96	50.1	M	3	Guaymas, Son.
H3s327Mr96	26-Mar-96	55.6	H	3	Guaymas, Son.
M3s326Mr96	26-Mar-96	48.1	M	3	Guaymas, Son.
H2s324Mr96	26-Mar-96	49.0	H	2	Guaymas, Son.
M5s323Mr96	26-Mar-96	55.2	M	5	Guaymas, Son.
H3s322Mr96	26-Mar-96	56.1	H	3	Guaymas, Son.
H2s315Mr96	26-Mar-96	45.6	H	2	Guaymas, Son.
H5s336Mr96	26-Mar-96	79.4	H	5	Guaymas, Son.
M3s359Mr96	26-Mar-96	48.5	M	3	Guaymas, Son.
H2s353Mr96	26-Mar-96	49.2	H	2	Guaymas, Son.
M4s352Mr96	26-Mar-96	55.9	M	4	Guaymas, Son.
M3s356Mr96	26-Mar-96	53.0	M	3	Guaymas, Son.
H5s325Mr96	27-Mar-96	78.6	H	5	Guaymas, Son.
H2s329Mr96	27-Mar-96	49.6	H	2	Guaymas, Son.
M4s332Mr96	27-Mar-96	48.5	M	4	Guaymas, Son.
H2s337Mr96	27-Mar-96	42.2	H	2	Guaymas, Son.
H2s357Mr96	27-Mar-96	53.1	H	2	Guaymas, Son.
H4s355Mr96	27-Mar-96	50.4	H	4	Guaymas, Son.
H3s354Mr96	28-Mar-96	48.5	H	3	Guaymas, Son.
H5s348Mr96	28-Mar-96	34.0	H	5	Guaymas, Son.
H2s339Mr96	28-Mar-96	24.6	H	2	Guaymas, Son.
H2s358Mr96	28-Mar-96	32.8	H	2	Guaymas, Son.
H3s346Mr96	28-Mar-96	33.7	H	3	Guaymas, Son.
H2s361Mr96	28-Mar-96	32.9	H	2	Guaymas, Son.
H5s342Mr96	28-Mar-96	74.0	H	5	Guaymas, Son.
M3s360Mr96	28-Mar-96	49.0	M	3	Guaymas, Son.
H5s349Ab96	2-Apr-96	38.7	H	5	Guaymas, Son.
H1s363Ab96	2-Apr-96	26.0	H	1	Guaymas, Son.
H1s362Ab96	2-Apr-96	34.2	H	1	Guaymas, Son.
H1s370Ab96	2-Apr-96	26.7	H	1	Guaymas, Son.
H1s372Ab96	2-Apr-96	31.5	H	1	Guaymas, Son.
H5s344Ab96	2-Apr-96	75.5	H	5	Guaymas, Son.
M1s365Ab96	24-Apr-96	43.2	M	1	Guaymas, Son.
H2s366Ab96	24-Apr-96	39.2	H	2	Guaymas, Son.
H1s369Ab96	25-Apr-96	39.0	H	1	Guaymas, Son.

Muestra	Fecha	LM (cm)	Sexo	Madurez Gonadal	Localidad
H1s371Ab96	25-Apr-96	33.5	H	1	Guaymas, Son.
M1s364Ab96	25-Apr-96	35.0	M	1	Guaymas, Son.
H1s368Ab96	25-Apr-96	42.0	H	1	Guaymas, Son.
H4s118Jn96	18-Jun-96	46.6	H	4	Guaymas, Son.
H4s114Jn96	18-Jun-96	41.1	H	4	Guaymas, Son.
H2s116Jn96	18-Jun-96	42.3	H	2	Guaymas, Son.
H2s117Jn96	18-Jun-96	40.8	H	2	Guaymas, Son.
H2s120Jn96	18-Jun-96	41.8	H	2	Guaymas, Son.
M5s121Jn96	18-Jun-96	71.5	M	5	Guaymas, Son.
H3s123Jn96	18-Jun-96	40.4	H	3	Guaymas, Son.
M5s125Jn96	18-Jun-96	68.7	M	5	Guaymas, Son.
H4s128Jn96	18-Jun-96	81.0	H	4	Guaymas, Son.
H2s006Jn96	19-Jun-96	39.0	H	2	Guaymas, Son.
H2s010Jn96	19-Jun-96	35.0	H	2	Guaymas, Son.
H2s012Jn96	19-Jun-96	41.7	H	2	Guaymas, Son.
H1s002Jn96	19-Jun-96	40.5	H	1	Guaymas, Son.
H3s011Jn96	19-Jun-96	47.2	H	3	Guaymas, Son.
H2s014Jn96	19-Jun-96	42.0	H	2	Guaymas, Son.
H2s001Jn96	19-Jun-96	39.0	H	2	Guaymas, Son.
H2s007Jn96	19-Jun-96	43.5	H	2	Guaymas, Son.
H5s004Jn96	19-Jun-96	42.3	H	5	Guaymas, Son.
M5s009Jn96	19-Jun-96	72.5	M	5	Guaymas, Son.
H3s042Jn96	20-Jun-96	47.5	H	3	Guaymas, Son.
H1s091Jn96	20-Jun-96	32.7	H	1	Guaymas, Son.
H1s037Jn96	20-Jun-96	39.5	H	1	Guaymas, Son.
H2s073Jn96	20-Jun-96	40.0	H	2	Guaymas, Son.
H2s041Jn96	20-Jun-96	45.6	H	2	Guaymas, Son.
H5s040Jn96	20-Jun-96	40.4	H	5	Guaymas, Son.
H5s038Jn96	20-Jun-96	43.0	H	5	Guaymas, Son.
H1s034Jn96	20-Jun-96	33.0	H	1	Guaymas, Son.
H1s036Jn96	20-Jun-96	39.0	H	1	Guaymas, Son.
H5s102Jn96	21-Jun-96	41.7	H	5	Guaymas, Son.
H2s112Jn96	21-Jun-96	50.8	H	2	Guaymas, Son.
H2s110Jn96	21-Jun-96	46.9	H	2	Guaymas, Son.
H1s109Jn96	21-Jun-96	41.2	H	1	Guaymas, Son.
H5s108Jn96	21-Jun-96	34.3	H	5	Guaymas, Son.
H5s055Jn96	21-Jun-96	42.5	H	5	Guaymas, Son.
H3s106Jn96	21-Jun-96	47.8	H	3	Guaymas, Son.
H2s101Jn96	21-Jun-96	45.5	H	2	Guaymas, Son.
H3s099Jn96	21-Jun-96	48.4	H	3	Guaymas, Son.
M4s312Ag96	10-Aug-96	49.7	M	4	Santa Rosalía, B.C.S.
H5s262Ag96	10-Aug-96	87.5	H	5	Santa Rosalía, B.C.S.
H2s320Ag96	10-Aug-96	40.2	H	2	Santa Rosalía, B.C.S.
H2s318Ag96	10-Aug-96	56.0	H	2	Santa Rosalía, B.C.S.
M5s255Ag96	10-Aug-96	54.8	M	5	Santa Rosalía, B.C.S.
H5s237Ag96	10-Aug-96	77.2	H	5	Santa Rosalía, B.C.S.
H2s223Ag96	10-Aug-96	60.6	H	2	Santa Rosalía, B.C.S.
H5s317Ag96	10-Aug-96	83.5	H	5	Santa Rosalía, B.C.S.
H2s251Ag96	10-Aug-96	50.2	H	2	Santa Rosalía, B.C.S.
M2s316Ag96	10-Aug-96	41.6	M	2	Santa Rosalía, B.C.S.

Muestra	Fecha	LM (cm)	Sexo	Madurez Gonadal	Localidad
H2s314Ag96	10-Aug-96	47.6	H	2	Santa Rosalía, B.C.S.
M3s319Ag96	10-Aug-96	50.3	M	3	Santa Rosalía, B.C.S.
H3s229Ag96	10-Aug-96	69.6	H	3	Santa Rosalía, B.C.S.
H2s321Ag96	10-Aug-96	41.1	H	2	Santa Rosalía, B.C.S.
H3s271Ag96	10-Aug-96	72.5	H	3	Santa Rosalía, B.C.S.
M5s311Ag96	10-Aug-96	58.6	M	5	Santa Rosalía, B.C.S.
H6s274Ag96	10-Aug-96	68.0	H	6	Santa Rosalía, B.C.S.
H3s278Ag96	10-Aug-96	70.0	H	3	Santa Rosalía, B.C.S.
H3s280Ag96	10-Aug-96	71.0	H	3	Santa Rosalía, B.C.S.
M5s225Ag96	10-Aug-96	65.1	M	5	Santa Rosalía, B.C.S.
M2s313Ag96	10-Aug-96	40.7	M	2	Santa Rosalía, B.C.S.
H2s268Ag96	10-Aug-96	48.9	H	2	Santa Rosalía, B.C.S.
H5s181Se96	6-Sep-96	73.6	H	5	Santa Rosalía, B.C.S.
M5s170Se96	6-Sep-96	59.5	M	5	Santa Rosalía, B.C.S.
H6s180Se96	6-Sep-96	72.5	H	6	Santa Rosalía, B.C.S.
H2s168Se96	6-Sep-96	46.2	H	2	Santa Rosalía, B.C.S.
H3s160Se96	6-Sep-96	69.8	H	3	Santa Rosalía, B.C.S.
H2s161Se96	6-Sep-96	49.5	H	2	Santa Rosalía, B.C.S.
M4s163Se96	6-Sep-96	49.5	M	4	Santa Rosalía, B.C.S.
H5s164Se96	6-Sep-96	72.5	H	5	Santa Rosalía, B.C.S.
M5s167Se96	6-Sep-96	67.2	M	5	Santa Rosalía, B.C.S.
H3s166Se96	6-Sep-96	68.0	H	3	Santa Rosalía, B.C.S.
M5s165Se96	6-Sep-96	65.0	M	5	Santa Rosalía, B.C.S.
M5s162Se96	6-Sep-96	69.1	M	5	Santa Rosalía, B.C.S.
H2s175Se96	6-Sep-96	52.3	H	2	Santa Rosalía, B.C.S.
H2s183Se96	6-Sep-96	59.0	H	2	Santa Rosalía, B.C.S.
H4s184Se96	6-Sep-96	71.6	H	4	Santa Rosalía, B.C.S.
MUs178Se96	6-Sep-96	50.2	M	0	Santa Rosalía, B.C.S.
H3s173Se96	6-Sep-96	67.4	H	3	Santa Rosalía, B.C.S.
H5s174Se96	6-Sep-96	69.7	H	5	Santa Rosalía, B.C.S.
H5s171Se96	6-Sep-96	76.8	H	5	Santa Rosalía, B.C.S.
M5s182Se96	6-Sep-96	73.5	M	5	Santa Rosalía, B.C.S.
H2s179Se96	8-Sep-96	62.5	H	2	Santa Rosalía, B.C.S.
M4s172Se96	8-Sep-96	58.1	M	4	Santa Rosalía, B.C.S.
H2s176Se96	8-Sep-96	61.0	H	2	Santa Rosalía, B.C.S.
H4s177Se96	8-Sep-96	75.0	H	4	Santa Rosalía, B.C.S.
H2s169Se96	8-Sep-96	45.3	H	2	Santa Rosalía, B.C.S.
UUs033Oc96	12-Oct-96	ND	U	ND	Santa Rosalía, B.C.S.
UUs032Oc96	12-Oct-96	ND	U	ND	Santa Rosalía, B.C.S.
UUs031Oc96	12-Oct-96	ND	U	ND	Santa Rosalía, B.C.S.
UUs030Oc96	12-Oct-96	ND	U	ND	Santa Rosalía, B.C.S.
UUs028Oc96	12-Oct-96	ND	U	ND	Santa Rosalía, B.C.S.
UUs029Oc96	12-Oct-96	ND	U	ND	Santa Rosalía, B.C.S.
H5s185Oc96	16-Oct-96	68.0	H	5	Santa Rosalía, B.C.S.
H2s187Oc96	16-Oct-96	53.1	H	2	Santa Rosalía, B.C.S.
H5s151Oc96	16-Oct-96	72.5	H	5	Santa Rosalía, B.C.S.
M4s188Oc96	16-Oct-96	53.6	M	4	Santa Rosalía, B.C.S.
M4s192Oc96	16-Oct-96	54.0	M	4	Santa Rosalía, B.C.S.
H2s193Oc96	16-Oct-96	71.6	H	2	Santa Rosalía, B.C.S.
H5s194Oc96	16-Oct-96	78.6	H	5	Santa Rosalía, B.C.S.

Muestra	Fecha	LM (cm)	Sexo	Madurez Gonadal	Localidad
H2s186Oc96	16-Oct-96	26.6	H	2	Santa Rosalía, B.C.S.
M4s157Oc96	16-Oct-96	58.0	M	4	Santa Rosalía, B.C.S.
H3s156Oc96	16-Oct-96	65.7	H	3	Santa Rosalía, B.C.S.
H4s154Oc96	16-Oct-96	65.3	H	4	Santa Rosalía, B.C.S.
H3s152Oc96	16-Oct-96	61.8	H	3	Santa Rosalía, B.C.S.
H3s149Oc96	16-Oct-96	67.2	H	3	Santa Rosalía, B.C.S.
H2s148Oc96	16-Oct-96	57.1	H	2	Santa Rosalía, B.C.S.
H3s145Oc96	16-Oct-96	60.0	H	3	Santa Rosalía, B.C.S.
H2s141Oc96	16-Oct-96	61.5	H	2	Santa Rosalía, B.C.S.
M5s140Oc96	16-Oct-96	61.2	M	5	Santa Rosalía, B.C.S.
H2s138Oc96	16-Oct-96	46.6	H	2	Santa Rosalía, B.C.S.
H6s136Oc96	16-Oct-96	71.5	H	6	Santa Rosalía, B.C.S.
H3s134Oc96	16-Oct-96	64.2	H	3	Santa Rosalía, B.C.S.
H4s130Oc96	16-Oct-96	71.5	H	4	Santa Rosalía, B.C.S.
H3s197Oc96	16-Oct-96	66.2	H	3	Santa Rosalía, B.C.S.
H3s153Oc96	16-Oct-96	71.2	H	3	Santa Rosalía, B.C.S.
H3s210Oc96	16-Oct-96	70.7	H	3	Santa Rosalía, B.C.S.
H3s201Oc96	16-Oct-96	73.7	H	3	Santa Rosalía, B.C.S.
M5s202Oc96	16-Oct-96	45.5	M	5	Santa Rosalía, B.C.S.
H3s199Oc96	16-Oct-96	74.3	H	3	Santa Rosalía, B.C.S.
H3s214Oc96	16-Oct-96	71.7	H	3	Santa Rosalía, B.C.S.
H5s204Oc96	16-Oct-96	61.8	H	5	Santa Rosalía, B.C.S.
H5s213Oc96	16-Oct-96	54.3	H	5	Santa Rosalía, B.C.S.
M5s219Oc96	16-Oct-96	68.8	M	5	Santa Rosalía, B.C.S.
H2s217Oc96	16-Oct-96	51.7	H	2	Santa Rosalía, B.C.S.
H3s137Oc96	20-Oct-96	26.5	H	3	Santa Rosalía, B.C.S.
H2s196Oc96	23-Oct-96	21.6	H	2	Santa Rosalía, B.C.S.
H2s023No96	9-Nov-96	50.1	H	2	Guaymas, Son.
M3s022No96	9-Nov-96	54.9	M	3	Guaymas, Son.
H2s021No96	9-Nov-96	47.6	H	2	Guaymas, Son.
H3s020No96	9-Nov-96	52.2	H	3	Guaymas, Son.
M3s019No96	9-Nov-96	45.0	M	3	Guaymas, Son.
M5s018No96	9-Nov-96	47.2	M	5	Guaymas, Son.
H2s017No96	9-Nov-96	42.7	H	2	Guaymas, Son.
M5s016No96	9-Nov-96	53.2	M	5	Guaymas, Son.
H2s024No96	9-Nov-96	50.6	H	2	Guaymas, Son.
M5s025No96	11-Nov-96	54.2	M	5	Guaymas, Son.
M5s026No96	11-Nov-96	41.9	M	5	Guaymas, Son.
H2s027No96	13-Nov-96	54.4	H	2	Guaymas, Son.
H2s051En97	21-Jan-97	55.6	H	2	Guaymas, Son.
H5s085En97	21-Jan-97	48.9	H	5	Guaymas, Son.
H3s094En97	21-Jan-97	55.0	H	3	Guaymas, Son.
H2s059En97	21-Jan-97	55.2	H	2	Guaymas, Son.
U5s043En97	21-Jan-97	53.1	U	5	Guaymas, Son.
H5s067En97	23-Jan-97	74.1	H	5	Guaymas, Son.
M3s090En97	23-Jan-97	62.1	M	3	Guaymas, Son.
M5s089En97	23-Jan-97	59.2	M	5	Guaymas, Son.
M5s081En97	23-Jan-97	69.9	M	5	Guaymas, Son.
H5s080En97	23-Jan-97	85.5	H	5	Guaymas, Son.
H3s075En97	23-Jan-97	71.6	H	3	Guaymas, Son.

Muestra	Fecha	LM (cm)	Sexo	Madurez Gonadal	Localidad
H3s074En97	23-Jan-97	73.5	H	3	Guaymas, Son.
H2s072En97	23-Jan-97	58.9	H	2	Guaymas, Son.
H5s053En97	23-Jan-97	82.5	H	5	Guaymas, Son.
M5s048En97	23-Jan-97	73.9	M	5	Guaymas, Son.
M5s060En97	23-Jan-97	75.0	M	5	Guaymas, Son.
H5s057En97	23-Jan-97	75.6	H	5	Guaymas, Son.
M3s049En97	23-Jan-97	63.6	M	3	Guaymas, Son.
H5s056En97	23-Jan-97	77.9	H	5	Guaymas, Son.
M4s096Fe97	16-Feb-97	52.0	M	4	Guaymas, Son.
H2s044Fe97	16-Feb-97	78.4	H	2	Guaymas, Son.
H5s092Fe97	16-Feb-97	77.0	H	5	Guaymas, Son.
M5s045Fe97	16-Feb-97	61.2	M	5	Guaymas, Son.
H3s088Fe97	16-Feb-97	65.0	H	3	Guaymas, Son.
M2s087Fe97	16-Feb-97	45.3	M	2	Guaymas, Son.
M3s086Fe97	16-Feb-97	50.8	M	3	Guaymas, Son.
M2s058Fe97	16-Feb-97	47.3	M	2	Guaymas, Son.
H2s083Fe97	16-Feb-97	50.1	H	2	Guaymas, Son.
M4s064Fe97	16-Feb-97	52.6	M	4	Guaymas, Son.
H2s078Fe97	16-Feb-97	45.8	H	2	Guaymas, Son.
H3s077Fe97	16-Feb-97	74.2	H	3	Guaymas, Son.
M2s076Fe97	16-Feb-97	47.4	M	2	Guaymas, Son.
H2s062Fe97	16-Feb-97	40.7	H	2	Guaymas, Son.
H2s070Fe97	16-Feb-97	40.6	H	2	Guaymas, Son.
H3s069Fe97	16-Feb-97	65.6	H	3	Guaymas, Son.
H2s063Fe97	16-Feb-97	51.0	H	2	Guaymas, Son.
H5s066Fe97	16-Feb-97	71.0	H	5	Guaymas, Son.
M1s052Fe97	16-Feb-97	38.2	M	1	Guaymas, Son.
M4s095Fe97	16-Feb-97	51.8	M	4	Guaymas, Son.
H5s340Fe97	17-Feb-97	75.6	H	5	Guaymas, Son.
H2s250Mr97	11-Mar-97	61.1	H	2	Guaymas, Son.
H2s282Mr97	11-Mar-97	58.0	H	2	Guaymas, Son.
M3s297Mr97	11-Mar-97	56.6	M	3	Guaymas, Son.
H2s247Mr97	15-Mar-97	50.6	H	2	Guaymas, Son.
H5s241Mr97	15-Mar-97	77.0	H	5	Guaymas, Son.
M3s239Mr97	15-Mar-97	54.2	M	3	Guaymas, Son.
H2s233Mr97	15-Mar-97	30.5	H	2	Guaymas, Son.
H2s234Mr97	15-Mar-97	38.0	H	2	Guaymas, Son.
H5s264Mr97	15-Mar-97	32.3	H	5	Guaymas, Son.
M4s226Mr97	15-Mar-97	66.5	M	4	Guaymas, Son.
H5s224Mr97	15-Mar-97	81.0	H	5	Guaymas, Son.
H2s299Mr97	15-Mar-97	35.4	H	2	Guaymas, Son.
H2s300Mr97	15-Mar-97	39.8	H	2	Guaymas, Son.
H5s252Mr97	16-Mar-97	59.2	H	5	Guaymas, Son.
M3s309Mr97	16-Mar-97	73.0	M	3	Guaymas, Son.
H2s285Mr97	16-Mar-97	50.2	H	2	Guaymas, Son.
H4s249Mr97	16-Mar-97	72.2	H	4	Guaymas, Son.
M2s305Mr97	16-Mar-97	38.5	M	2	Guaymas, Son.
H5s238Mr97	16-Mar-97	70.3	H	5	Guaymas, Son.
M5s243Mr97	16-Mar-97	68.6	M	5	Guaymas, Son.
H4s228Mr97	16-Mar-97	74.0	H	4	Guaymas, Son.

Muestra	Fecha	LM (cm)	Sexo	Madurez Gonadal	Localidad
H2s253Mr97	16-Mar-97	64.2	H	2	Guaymas, Son.
H3s232Mr97	16-Mar-97	32.0	H	3	Guaymas, Son.
H3s230Mr97	16-Mar-97	68.6	H	3	Guaymas, Son.
M5s246Mr97	16-Mar-97	60.8	M	5	Guaymas, Son.
M4s266Mr97	16-Mar-97	55.5	M	4	Guaymas, Son.
M5s270Mr97	16-Mar-97	54.1	M	5	Guaymas, Son.
H2s272Mr97	16-Mar-97	31.6	H	2	Guaymas, Son.
H2s269Mr97	16-Mar-97	63.1	H	2	Guaymas, Son.
H2s275Mr97	16-Mar-97	44.6	H	2	Guaymas, Son.
H5s256Mr97	16-Mar-97	63.7	H	5	Guaymas, Son.
H2s276Mr97	16-Mar-97	31.7	H	2	Guaymas, Son.
H2s279Mr97	16-Mar-97	68.5	H	2	Guaymas, Son.
H3s235Mr97	16-Mar-97	33.8	H	3	Guaymas, Son.
M2s281Mr97	16-Mar-97	49.4	M	2	Guaymas, Son.
M2s283Mr97	16-Mar-97	41.6	M	2	Guaymas, Son.
M2s267Mr97	16-Mar-97	36.1	M	2	Guaymas, Son.
H2s265Mr97	16-Mar-97	64.6	H	2	Guaymas, Son.
H2s260Mr97	16-Mar-97	25.3	H	2	Guaymas, Son.
H2s261Mr97	16-Mar-97	24.8	H	2	Guaymas, Son.
H2s263Mr97	16-Mar-97	54.1	H	2	Guaymas, Son.
M5s284Mr97	16-Mar-97	71.6	M	5	Guaymas, Son.
M2s258Mr97	16-Mar-97	68.5	M	2	Guaymas, Son.
H5s207Ab97	15-Apr-97	69.7	H	5	Guaymas, Son.
H5s142Ab97	15-Apr-97	74.6	H	5	Guaymas, Son.
M5s139Ab97	15-Apr-97	65.9	M	5	Guaymas, Son.
H3s065Ab97	15-Apr-97	63.3	H	3	Guaymas, Son.
H5s190Ab97	15-Apr-97	82.6	H	5	Guaymas, Son.
H4s212Ab97	15-Apr-97	72.6	H	4	Guaymas, Son.
H3s150Ab97	15-Apr-97	71.2	H	3	Guaymas, Son.
M5s047Ab97	15-Apr-97	66.9	M	5	Guaymas, Son.
M4s218Ab97	15-Apr-97	59.4	M	4	Guaymas, Son.
H5s215Ab97	15-Apr-97	81.0	H	5	Guaymas, Son.
H2s133Ab97	15-Apr-97	62.5	H	2	Guaymas, Son.
H5s289Ab97	16-Apr-97	77.3	H	5	Guaymas, Son.
M5s200Ab97	16-Apr-97	73.4	M	5	Guaymas, Son.
H3s209Ab97	16-Apr-97	70.9	H	3	Guaymas, Son.
H2s046Ab97	16-Apr-97	55.8	H	2	Guaymas, Son.
M5s287Ab97	16-Apr-97	71.5	M	5	Guaymas, Son.
H5s257Ab97	16-Apr-97	75.7	H	5	Guaymas, Son.
M5s068Ab97	16-Apr-97	68.4	M	5	Guaymas, Son.
H5s254Ab97	16-Apr-97	69.6	H	5	Guaymas, Son.
H3s277Ab97	16-Apr-97	70.8	H	3	Guaymas, Son.
H2s227Jn97	14-Jun-97	50.0	H	2	Santa Rosalía, B.C.S.
M2s306Jn97	14-Jun-97	43.2	M	2	Santa Rosalía, B.C.S.
M2s308Jn97	14-Jun-97	36.4	M	2	Santa Rosalía, B.C.S.
H2s296Jn97	14-Jun-97	44.0	H	2	Santa Rosalía, B.C.S.
H2s301Jn97	14-Jun-97	53.8	H	2	Santa Rosalía, B.C.S.
H2s221Jn97	14-Jun-97	48.1	H	2	Santa Rosalía, B.C.S.
H2s298Jn97	14-Jun-97	50.7	H	2	Santa Rosalía, B.C.S.
H3s292Jn97	14-Jun-97	49.2	H	3	Santa Rosalía, B.C.S.

Muestra	Fecha	LM (cm)	Sexo	Madurez Gonadal	Localidad
H2s291Jn97	14-Jun-97	35.8	H	2	Santa Rosalía, B.C.S.
M2s302Jn97	14-Jun-97	44.0	M	2	Santa Rosalía, B.C.S.
H3s310Jn97	14-Jun-97	51.6	H	3	Santa Rosalía, B.C.S.
M3s273Jn97	14-Jun-97	46.4	M	3	Santa Rosalía, B.C.S.
M5s304Jn97	15-Jun-97	71.4	M	5	Santa Rosalía, B.C.S.
H5s307Jn97	15-Jun-97	73.2	H	5	Santa Rosalía, B.C.S.
H5s244Jn97	15-Jun-97	78.1	H	5	Santa Rosalía, B.C.S.
H5s295Jn97	15-Jun-97	76.2	H	5	Santa Rosalía, B.C.S.
H5s294Jn97	15-Jun-97	80.6	H	5	Santa Rosalía, B.C.S.
H5s293Jn97	15-Jun-97	78.0	H	5	Santa Rosalía, B.C.S.
M5s245Jn97	15-Jun-97	72.2	M	5	Santa Rosalía, B.C.S.
H3s146My98	10-May-98	26.1	H	3	Santa Rosalía, B.C.S.
H4s259My98	10-May-98	27.5	H	4	Santa Rosalía, B.C.S.
H1s144My98	10-May-98	17.6	H	1	Santa Rosalía, B.C.S.
H2s143My98	10-May-98	25.3	H	2	Santa Rosalía, B.C.S.
M3s191My98	10-May-98	27.6	M	3	Santa Rosalía, B.C.S.
H1s147My98	10-May-98	18.9	H	1	Santa Rosalía, B.C.S.
H3s203My98	10-May-98	25.6	H	3	Santa Rosalía, B.C.S.
H5s206My98	10-May-98	24.6	H	5	Santa Rosalía, B.C.S.
UUs208My98	10-May-98	17.0	U	0	Santa Rosalía, B.C.S.
M1s211My98	10-May-98	21.4	M	1	Santa Rosalía, B.C.S.
H2s216My98	10-May-98	21.1	H	2	Santa Rosalía, B.C.S.
M2s132My98	10-May-98	20.5	M	2	Santa Rosalía, B.C.S.
H3s159My98	10-May-98	27.6	H	3	Santa Rosalía, B.C.S.
M2s131My98	10-May-98	25.6	M	2	Santa Rosalía, B.C.S.
H1s286My98	10-May-98	17.6	H	1	Santa Rosalía, B.C.S.
H5s135My98	10-May-98	24.0	H	5	Santa Rosalía, B.C.S.

APÉNDICE B

MARCADORES RAPD-PCR AMPLIFICADOS POR LA SERIE OPERON C DE CEBADORES DECÁMEROS

Cebadores de la serie Operon C y número de marcadores amplificados con ellos. Entre paréntesis el número de bandas. $f(x)$ es la frecuencia observada del marcador nulo y p la proporción de individuos que exhibieron el marcador (cont.). La movilidad en el gel se midió en función al número de pares de bases (pb). (cont.)

OP08 (21)	$f(x)$	p	OP15 (27)	$f(x)$	p	OP01 (26)	$f(x)$	p	OP14 (33)	$f(x)$	p	OP19 (23)	$f(x)$	p
3500 pb	2	0.01	3500 pb	1	0.00	7000 pb	54	0.17	3500 pb	2	0.01	3500 pb	4	0.01
2200 pb	3	0.01	3000 pb	2	0.01	4000 pb	81	0.25	3000 pb	10	0.03	2800 pb	23	0.07
1900 pb	151	0.47	2400 pb	104	0.32	3500 pb	101	0.31	2500 pb	22	0.07	2350 pb	24	0.07
1750 pb	261	0.81	2200 pb	99	0.31	3050 pb	4	0.01	2250 pb	17	0.05	2000 pb	54	0.17
1650 pb	154	0.48	1800 pb	297	0.92	3000 pb	262	0.81	2100 pb	9	0.03	1720 pb	24	0.07
1400 pb	128	0.40	1750 pb	4	0.01	2500 pb	50	0.15	2000 pb	206	0.64	1650 pb	228	0.70
1350 pb	42	0.13	1650 pb	4	0.01	2150 pb	2	0.01	1890 pb	15	0.05	1500 pb	50	0.15
1050 pb	270	0.83	1500 pb	1	0.00	2050 pb	254	0.78	1750 pb	32	0.10	1450 pb	310	0.96
900 pb	3	0.01	1480 pb	284	0.88	2000 pb	55	0.17	1680 pb	124	0.38	1250 pb	142	0.44
800 pb	51	0.16	1320 pb	1	0.00	1850 pb	29	0.09	1570 pb	13	0.04	1100 pb	53	0.16
750 pb	311	0.96	1200 pb	62	0.19	1500 pb	86	0.27	1500 pb	282	0.87	1000 pb	312	0.96
700 pb	317	0.98	1125 pb	12	0.04	1350 pb	46	0.14	1250 pb	41	0.13	900 pb	1	0.00
650 pb	192	0.59	1075 pb	295	0.91	1250 pb	47	0.15	1125 pb	4	0.01	850 pb	319	0.98
600 pb	21	0.06	1050 pb	1	0.00	1225 pb	52	0.16	1060 pb	147	0.45	800 pb	1	0.00
550 pb	12	0.04	950 pb	298	0.92	1150 pb	235	0.73	1000 pb	26	0.08	760 pb	316	0.98
500 pb	262	0.81	870 pb	302	0.93	1000 pb	92	0.28	900 pb	1	0.00	740 pb	320	0.99
400 bp	93	0.29	800 pb	307	0.95	850 pb	165	0.51	880 pb	16	0.05	600 pb	33	0.10
350 pb	26	0.08	650 pb	53	0.16	800 pb	4	0.01	845 pb	102	0.31	520 pb	296	0.91
300 pb	210	0.65	620 pb	32	0.10	750 pb	23	0.07	800 pb	28	0.09	480 pb	8	0.02
280 pb	185	0.57	600 pb	300	0.93	700 pb	139	0.43	785 pb	92	0.28	400 pb	269	0.83
200 pb	25	0.08	550 pb	56	0.17	600 pb	112	0.35	765 pb	26	0.08	350 pb	31	0.10
	0.00		480 pb	282	0.87	520 pb	266	0.82	750 pb	30	0.09	250 pb	79	0.24
	0.00		450 pb	218	0.67	490 pb	233	0.72	735 pb	53	0.16	120 pb	73	0.23
	0.00		400 pb	1	0.00	450 pb	109	0.34	600 pb	55	0.17			
	0.00		350 pb	209	0.65	350 pb	31	0.10	580 pb	266	0.82			
	0.00		250 pb	239	0.74	250 pb	1	0.00	550 pb	50	0.15			
	0.00		200 pb	34	0.10				520 pb	36	0.11			
									500 pb	5	0.02			
									480 pb	43	0.13			
									350 pb	6	0.02			
									315 pb	305	0.94			
									250 pb	1	0.00			
									140 pb	13	0.04			

APÉNDICE C

ESTIMADORES DE DIVERSIDAD GENÉTICA Y SUBDIVISIÓN POBLACIONAL

Estimador de las frecuencias genéticas y varianza asociada(Lynch y Milligan 1994):

$$q' = x'^{1/2} \left(1 - \frac{Var(x')}{8x'^{1/2}} \right)^{-1} \dots\dots\dots (1)$$

$$Var(x') = x'(1-x') / n \dots\dots\dots (2)$$

$$Var(q') = (1-x') / 4n \dots\dots\dots (3)$$

Donde:

$q'(i)$ = estimador insesgado de x_i .

x_i = proporción de individuos muestreados que no exhiben el marcador i .

n = número de individuos muestreados

Estimadores de la diversidad genética entre poblaciones (Lynch y Milligan 1994):

$$H'_j(i) = 2q'_j(i)[1-q'_j(i)] + 2Var[q'_j(i)] \dots\dots\dots (4)$$

$$H'_j = \frac{1}{L} \sum_{i=1}^L H'_j(i) \dots\dots\dots (5)$$

$$H'_w = \frac{1}{L} \sum_{j=1}^n H'_j \dots\dots\dots (6)$$

Donde:

$H'_j(i)$ = probabilidad de que el locus i difiera entre dos individuos tomados aleatoriamente de la población j .

H'_j = estimador de la heterocigosidad promedio de la población j .

L = loci evaluados.

H'_w = diversidad génica intrapoblacional promedio.

n = número de poblaciones muestreadas.

Subdivisión poblacional (Lynch y Milligan 1994):

$$H'_{exc\ jk}(i) = H'_{jk}(i) - \frac{H'_j(i) + H'_k(i)}{2} \dots\dots\dots (7)$$

$$H'_{jk} = \frac{1}{L} \sum_{i=1}^L H'_{jk}(i) \dots\dots\dots (8)$$

$$H'_B = \frac{2}{n(n-1)L} \sum_{j < k} H'_{jk} \dots\dots\dots (9)$$

Donde:

$H'_{exc}(i)$ = heterocigosis en exceso

$H'_{jk}(i)$ = heterocigosidad interpoblacional del locus i .

H'_{jk} = heterocigosidad promedio entre las poblaciones j y k promediada para todos los loci.

H'_B = heterocigosidad interpoblacional promedio.

Subdivisión poblacional en función de la similitud/disimilitud (Lynch 1990):

$$S'_{ab} = \frac{2n_{ab}}{n_a + n_b} \dots\dots\dots (10)$$

Donde:

S'_{ab} = índice de similitud entre los individuos a y b .

$n_{a,b}$ = fragmentos exhibidos por el individuo a ó b .

n_{ab} = número de fragmentos comunes para la pareja ab .

$$D'_{jk} = \left[1 + S'_{jk} - \frac{S'_j + S'_k}{2} \right] - 1 \dots\dots\dots (11)$$

Donde:

D'_{jk} = disimilitud promedio entre las poblaciones j y k .

$S'_{j,k}$ = similitud promedio de los individuos de la población j ó k .

S'_{jk} = similitud promedio de parejas de individuos tomados al azar entre las poblaciones j y k .

Partición de la varianza del estimador de heterocigosidad en sus componentes muestrales (Lynch y Milligan 1994):

$$Var_I(H'_j) = \frac{1}{L^2} \sum_{i=1}^L Var [H'_j(i)] \dots\dots\dots(12)$$

$$Var_L(H'_j) = Var(H'_j) - Var_I(H'_j) \dots\dots\dots(13)$$

$$Var_I(H'_W) = \frac{1}{n^2} \sum_{j=1}^n Var_I(H'_j) \dots\dots\dots(14)$$

$$Var_L(H'_W) = \frac{1}{n^2} \sum_{j=1}^n Var_L(H'_j) \dots\dots\dots(15)$$

$$Var_P(H'_W) = Var_I(H'_W) - Var_L(H'_W) \dots\dots\dots(16)$$

Donde:

$Var_I(H'_j)$ = contribución a la varianza intrapoblacional asociada al muestreo sobre un número finito de individuos por *locus*.

$Var_L(H'_j)$ = contribución a la varianza asociada a la diversidad genética entre los *loci*.

$Var_I(H'_W)$ = contribucion a la varianza intrapoblacional promedio asociada al muestreo sobre un número finito de individuos por *locus*.

$Var_L(H'_W)$ = contribución a la varianza intrapoblacional promedio asociada a la diversidad genética entre los *loci*.

$Var_P(H'_W)$ = contribución a la varianza intrapoblacional promedio asociada al muestreo sobre un número finito de poblaciones.