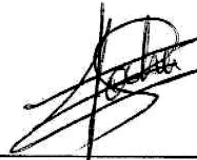


TESIS DEFENDIDA POR

**Osiris Yuriko Ríos Vargas**

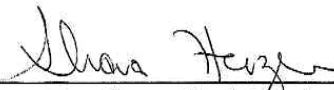
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ



---

Dr. Axayácatl Rocha Olivares

Director del Comité



---

Dra. Sharon Zinah Herzka Llona

Miembro del Comité



---

Dr. Timothy Robert Baumgartner McBride

Miembro del Comité



---

Dr. Miguel Ángel del Río Portilla

Miembro del Comité



---

Dr. Luis Eduardo Calderón Aguilera

Coordinador del Programa de Posgrado  
en Ecología Marina



---

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales

Encargado del despacho de la  
Dirección de Estudios de Posgrado

21 de Noviembre de 2007

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN  
SUPERIOR DE ENSENADA**



---

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS  
EN ECOLOGÍA MARINA**

---

**EVALUACIÓN GENÉTICA DE LAS ETAPAS TEMPRANAS DE  
VIDA DE *Sardinops sagax caeruleus***

TESIS

Que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

**Osiris Yuriko Ríos Vargas**

Ensenada, Baja California, México, Noviembre del 2007.

**RESUMEN** de la tesis que presenta **Osiris Yuriko Ríos Vargas**, como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en ECOLOGÍA MARINA. Ensenada, Baja California. Noviembre 2007.

## **EVALUACIÓN GENÉTICA DE LAS ETAPAS TEMPRANAS DE VIDA DE**

### *Sardinops sagax caeruleus*

Resumen aprobado por:



Dr. Axayácatl Rocha Olivares

*Sardinops sagax caeruleus* es una especie pelágica costera que exhibe variación morfométrica así como afinidad por desovar en habitats específicos a lo largo de su rango de distribución, desde Canadá hasta el Golfo de California. La distribución de huevos y larvas así como modelos de migración latitudinal a partir de datos de captura sugieren la existencia de grupos de desove afines a diferentes rangos de temperatura. Esta afinidad reproductiva por diferentes rangos de temperatura podría resultar en el aislamiento reproductivo entre grupos. Sin embargo, estudios de genética poblacional no han encontrado diferenciación genética significativa entre subpoblaciones de sardinas a través del rango de distribución. Estos resultados son consistentes con el gran potencial migratorio que exhiben los adultos. Si los grupos de sardinas reproductivas están sincronizados por desovar a temperaturas específicas, entonces el aislamiento reproductivo entre grupos debería de producir diferenciación genética. En consecuencia, en este estudio se evaluó la variabilidad genética de larvas de sardina como proxy de los grupos de adultos reproductivos que desovan en diferentes rangos de temperatura (costa del sur de California (CSC) y el Golfo de California (GC)). Este estudio hipotetiza la divergencia genética entre grupos de desove debido al uso de diferentes habitats reproductivos. Las muestras de CSC fueron colectadas en abril de 1999 mientras que las de GC en diciembre de 2006. Se examinaron nueve loci microsatelitales en los individuos colectados. El número de alelos por locus fue de 19 a 56, con un promedio de 35. La heterocigosis promedio observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ) para todos los loci fue 0.904 y 0.926 respectivamente para SCB y 0.857 y 0.905 para GC. Se detectó diferenciación genética pequeña pero estadísticamente significativa ( $F_{ST}=0.009$  y  $0.007$   $p<0.005$ ) así como heterogeneidad en las frecuencias alélicas entre regiones. Sin embargo, el análisis de varianza molecular no indicó diferenciación genética estadísticamente significativa. Dados estos resultados consideramos que esta diferenciación podría apoyar la hipótesis de aislamiento reproductivo, sin embargo, las diferencias genéticas también podrían ser resultado de un muestreo no representativo de los grupos de desove hipotéticos. Dicho sesgo podría producir significancia estadística en ausencia de diferenciación genética entre grupos de desove, por lo que es necesario un análisis más detallado de los adultos reproductivos y de su progenie.

**Palabras clave:** *Sardinops sagax caeruleus*, larvas, microsatélites, costa sur de California, Golfo de California

**ABSTRACT** of the thesis presented by **Osiris Yuriko Ríos Vargas** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in MARINE ECOLOGY. Ensenada, Baja California. November 2007.

## **GENETIC ASSESSMENT OF THE EARLY LIFE HISTORY STAGES OF**

### *Sardinops sagax caeruleus*

Abstract approved by:

---

Dr. Axayácatl Rocha Olivares

*Sardinops sagax caeruleus* is a coastal-pelagic species showing morphological variation as well as affinity for specific spawning grounds along its range of distribution from Canada to the Gulf of California. Egg and larvae distributions as well as latitudinal models of migration based on catch data suggest the existence of spawning groups with affinity to distinct temperature intervals. This reproductive affinity for different temperature intervals could result in reproductive isolation of spawning groups. However, genetic studies have found no significant differentiation among subpopulations from throughout its range, which is consistent with their large migratory potential. If reproductive groups of sardines are tuned to spawn at specific temperatures, their isolation should produce genetic differentiation. Therefore, in this study we assessed the genetic variability of sardine larvae as proxies of the adult reproductive groups that spawn at distinct temperature intervals (Southern California Bight (SCB) and the central region of the Gulf of California (GC)). We hypothesized genetic divergence between groups due to the use of different spawning habitats. Samples were collected in April 1999 off SCB and December 2006 in GC, individuals were surveyed for polymorphisms at nine microsatellite loci. The number of alleles per locus ranged from 19 to 56 and averaged 35. The mean observed ( $H_O$ ) and expected ( $H_E$ ) heterozygosities over all loci were, respectively, 0.904 and 0.926 for the SCB and 0.857 and 0.905 for the GC. Shallow but significant genetic differentiation ( $F_{ST} = 0.009-0.007$   $p < 0.005$ ) as well as heterogeneity in allele frequencies were detected between regions, but they were not revealed by an Analysis of Molecular Variance. This differentiation could reflect the hypothesized isolation of spawning groups. Alternatively, it could reflect a non representative sampling of the hypothetical spawning groups leading to statistical significance under the hypothesis of no genetic isolation. In order to determine the actual causes of this genetic differentiation a closer genetic analysis of both reproductive adults and their progeny is required in these contrasting habitats.

**Key words:** *Sardinops sagax caeruleus*, larvae, microsatellites, Southern California, Gulf of California.

A toda mi familia con mucho cariño

## AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Axayacatl Rocha Olivares que dirigió con buena disposición el término de este trabajo.
- A los miembros del comité de tesis: Dra. Sharon Zinah Herzka Llona., Dr. Timothy Baumgartner McBride y Dr. Miguel Ángel del Río Portilla por la ayuda y comentarios que han servido para la realización del mismo.
- A los colegas del Centro Regional de Investigación Pesquera (CRIP)-Guaymas. por permitirme participar en el Crucero Prospectivo de Pelágicos Menores del Golfo de California durante diciembre de 2006.
- A los colegas del Southwest Fisheries Science Center, San Diego California. especialmente al Dr. Russ Vetter., Barbara Javor., Carol Kimbrell y William Watson por toda la ayuda y comentarios y que recibí durante mi estancia en este sitio.
- A mis profesores de la maestría que con mucho ánimo ayudaron a mejorar mi formación académica.
- A todos, por la beca que recibí mediante el CONACYT para poder realizar la maestría.
- A mis compañeros: Carina Gutiérrez, Mariana Bobadilla, Nancy Saavedra, Ismael Guzmán por los comentarios que recibí para mejorar la defensa oral de esta tesis.
- A todo aquel que le dedique un tiempo a la lectura de esta obra.
- A todas las larvas de sardina que contribuyeron de manera desinteresada a la realización de este trabajo.

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES	2
II.1. La sardina del Pacífico: aspectos biológicos ecológicos y pesqueros.....	2
II.2. Identificación de stocks.....	5
II.2.1. Hábitat de desove.....	5
II.2.2. Migración y principales áreas de desove de diferentes grupos de sardinas.....	6
II.2.3. Grupos identificados a partir de la variabilidad fenotípica.....	16
II.2.4. Variabilidad genética.....	19
II.2.5. Los microsatélites: marcadores moleculares empleados en la identificación de subpoblaciones.....	24
III. OBJETIVOS.....	26
III.1. Objetivo general.....	26
III.2. Objetivos particulares.....	26
IV. HIPÓTESIS.....	27
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
V.1. Obtención de muestras.....	28
V.2. Extracción de ADN y amplificación de microsatélites.....	31
V.3. Genotipificación.....	32
V.4. Análisis de datos.....	32
V.4.1. Estimación de diversidad genética.....	32
V.4.2. Estimación del tamaño de muestra.....	34
V.4.3. Estimación de estructura genética.....	34
VI. RESULTADOS.....	37
VI.1. Genotipificado de loci microsatelitales.....	37
VI.2. Diversidad de loci microsatelitales.....	38
VI.3. Acumulación de alelos y tamaño de muestra.....	41
VI.4. Diferenciación genética de grupos larvarios.....	43
VI.5. Distancia genética entre larvas.....	48
VII. DISCUSIÓN.....	50
VII.1. Diversidad.....	50
VII.2. Diferenciación genética.....	52
VII.3. Identificación de stocks: conservación y manejo.....	56
VII.4. Perspectivas.....	58
VIII. CONCLUSIONES.....	59
IX. LITERATURA CITADA.....	60
X. ANEXOS.....	66
Anexo 1. Morfología de larvas de sardina.....	66
Anexo 2. Primers y condiciones de amplificación de loci microsatelitales.....	67

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Fluctuaciones de la captura de sardina ( <i>Sardinops sagax caeruleus</i> ) durante 1917-2005 en las costas de California.....	3
2	Movimientos migratorios latitudinales de la sardina observados a través de un programa de marcado y recaptura Clark (1945).....	7
3	Máximos de captura asociados a intervalos de temperatura superficial del mar en las principales pesquerías de sardina frente a la costa del Pacífico de Norte América durante 1981-2002.....	11
4	Migración estacional-latitudinal de grupos de sardina del Pacífico en función del rango de temperatura que habitan y las principales áreas de desove.....	12
5	Patrón estacional de madurez y desove frente a la costa sur de California y Baja California .....	13
6	Patrón estacional de madurez y desove dentro de Bahía Magdalena.....	14
7	Patrón estacional de desove dentro del Golfo de California.....	15
8	Localidades de colecta frente a la costa su de California (1999) y Golfo de California (2006).....	30
9	Valores de heterocigosis observada promedio ( $H_o$ ) y error estándar por locus para la costa sur de California y Golfo de California.....	38
10	Curva de descubrimiento de alelos y porcentaje de alelos acumulados para nueve loci microsatelitales en función de un tamaño de muestra variable.....	42
11	Dendograma de distancias genéticas Nei ( $D_a$ ) 1983.....	49



## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
I Áreas de desove, estacionalidad y valores de temperatura asociados.....	5
II Áreas de desove de los grupos migratorios de sardina.....	10
III Tamaño de muestra, fecha y temperatura superficial del mar asociada al momento del muestreo.....	29
IV Número de individuos genotificados exitosamente por locus y por localidad.....	37
V Niveles de variación genética de larvas de <i>Sardinops sagax caeruleus</i> colectadas en la costa sur de California (1999) y Golfo de California (2006)..	39
VI Valores de $\chi^2$ de la prueba de homogeneidad alélica (bajo la diagonal) y valores de -p- por arriba de la diagonal.....	43
VII Prueba de homogeneidad alélica por locus; en negritas se indican los valores significativos después de la corrección de Bonferoni.....	43
VIII Valores de $\chi^2$ de la prueba de homogeneidad genotípica (bajo la diagonal) y valores de -p- (por arriba de la diagonal).....	44
IX Prueba de homogeneidad genotípica por locus. En negritas se indican los valores significativos después de la corrección de Bonferoni.....	44
X Valores de significancia -p- correspondientes a las pruebas $\chi^2$ de homogeneidad alelica (arriba de la diagonal) y genotípica (debajo de la diagonal) a partir de motivos de repetición.....	45
XI Estadístico $F_{ST}$ entre pares de localidades. Valores de $F_{ST}$ debajo de la diagonal, valores de p arriba de la diagonal, en negritas valores significativos después de la corrección de Bonferoni.....	46
XII Análisis de varianza molecular (AMOVA) entre poblaciones para cuatro loci microsatelitales (A7, C5, D6 y H4) a partir de motivos de repetición.....	46
XIII $R_{ST}$ pareados (debajo de diagonal) y sus valores de p (arriba de la diagonal).....	47
XIV Análisis de varianza Molecular (AMOVA) entre regiones y entre localidades dentro de cada región para cuatro loci microsatelitales (A7, C5, D6 y H4) a partir de motivos de repetición.....	47

**LISTA DE TABLAS (continuación)**

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
XV	Matrices de distancias genéticas Cavalli-Sforza y Edwards (Dc) arriba de la diagonal y Nei (Da) debajo de la diagonal.....	48
XVI	Valores de heterocigosis observada (Ho) en larvas y adultos de sardinas.....	50

## **I. Introducción**

La distribución espacio-temporal de la actividad reproductiva de la sardina Monterrey (*Sardinops sagax caeruleus*) a lo largo de la costa del Pacífico de norte América sugiere la existencia de diferentes grupos de desove, cada uno con preferencias térmicas distintas. Si estos grupos poseen una fisiología reproductiva característica, entonces podría esperarse aislamiento reproductivo y divergencia genética entre diferentes grupos de desove. Esta investigación planteó como hipótesis de trabajo la diferenciación genética de larvas de sardina provenientes de diferentes habitats de desove (costa sur de California y Golfo de California). El mecanismo que explicaría la diferenciación genética sería el aislamiento reproductivo de grupos de desove que presentan afinidad por desovar dentro de un rango específico de variables ambientales (e.gr. temperatura). Para probar esta hipótesis, se estimó el grado de variabilidad y diferenciación genética de larvas de sardina mediante el uso de marcadores genéticos (microsatélites). Los resultados de este trabajo tienen como objetivo documentar el grado de diferenciación genética entre grupos de desove. El enfoque en las etapas larvarias tiene la ventaja de reducir los posibles efectos de migración y mezcla que podrían tener los estudios que usan sardinias adultas para la caracterización de estructura genética. En comparación a los adultos, las larvas poseen una capacidad limitada de migración. Esta investigación es relevante ya que contribuirá a la identificación de diferentes grupos de desove de sardina Monterrey.

## II. Antecedentes

### II.1. La sardina del Pacífico: aspectos biológicos, ecológicos y pesqueros

La sardina del Pacífico (*Sardinops sagax caeruleus*), también conocida como sardina Monterrey, es una especie pelágica-costera de la familia Clupeidae (Whitehead *et al.*, 1985). Su rango de distribución es amplio a lo largo de la costa del Pacífico de Norteamérica, desde la Columbia Británica, Canadá, hasta el interior del Golfo de California, México (Cascorbi, 2004).

Históricamente, esta especie ha presentado variaciones latitudinales en su abundancia y distribución (Radovich, 1982; Baumgartner *et al.*, 1992; MacFarlane y Beamish 2001; Rodríguez-Sánchez, 2002; Cascorbi, 2004; Félix-Uraga *et al.*, 2004) (Figura 1a). El mecanismo responsable de estas variaciones históricas son eventos atmosféricos de escala decadal e interdecadal que repercuten en toda la cuenca del Pacífico a nivel oceanográfico y biológico (Lluch-Belda *et al.*, 1989; Chávez *et al.*, 2003; Lluch-Belda *et al.*, 2003). Estos autores señalan que series de tiempo físicas como: temperatura atmosférica global, índice de circulación atmosférica, niveles de dióxido de carbono atmosférico, así como la Oscilación Decadal del Pacífico y El Niño Oscilación del Sur (PDO y ENSO por sus siglas en inglés, respectivamente) se encuentran en fase con las variaciones de la captura de sardina en la cuenca del Pacífico frente a las costas de California, Japón y Perú-Chile. A partir de estas observaciones, Chávez *et al.* (2003) sugirieron un modelo de regimenes biológicos en función de la variabilidad oceanográfica. Estos regimenes tienen un ciclo aproximado de 50 años. Durante la mitad del ciclo, el Pacífico permanece en promedio más cálido debido a que la estratificación térmica en la

costa este del Pacífico ecuatorial y subtropical es mayor. Esto ocasiona que la termoclina sea más profunda y que los eventos de surgencia sean menos intensos, resultando en una disminución de la productividad. Durante estas condiciones (conocido como el régimen cálido de sardina) la sardina es muy abundante. Durante la otra mitad del ciclo, el Pacífico permanece más frío en promedio debido a que la estratificación térmica en la costa este del Pacífico ecuatorial y subtropical es menor, lo cual ocasiona que la termoclina sea más somera y que los eventos de surgencia sean más intensos, resultando en una mayor productividad. Durante este tiempo (conocido como régimen frío de anchoveta), la sardina es escasa mientras que la anchoveta es muy abundante.



**Figura 1.** Fluctuaciones de la captura de sardina (*Sardinops sagax caeruleus*) durante 1917-2005 en las costas de California.

Las variaciones en abundancia y distribución de la sardina del Pacífico como consecuencia de eventos atmosférico-oceanográficos, así como el amplio potencial migratorio de esta especie han constituido el principal problema al que tienen que enfrentarse las investigaciones que tratan de identificar stocks y sus límites geográficos a lo largo del rango de distribución (Lluch-Belda *et al.*, 2003; Smith, 2005). El stock está considerado como la unidad básica de manejo pesquero (Jennings *et al.*, 2001). Estas unidades de manejo se caracterizan por poseer parámetros de historia de vida particulares como: fecundidad, tasas de crecimiento, mortalidad y estructura de edades, que conllevan a una dinámica poblacional propia. Otros atributos de los stocks son su abundancia, rango de distribución, movimientos en espacio-tiempo, áreas de reproducción, y características fenotípicas, bioquímicas y genéticas. La identificación de stocks es necesaria porque de esa manera se pueden establecer estrategias de manejo y conservación de los recursos explotados (Jennings *et al.*, 2001).

Smith (2005) señala que la distribución geográfica y estacional del desove representa información clave para identificar y describir los límites geográficos entre stocks. Al respecto, se han reconocido mediante cruceros prospectivos las principales áreas de desove asociadas a diferentes temporadas del año, y se han medido variables oceanográficas como temperatura, salinidad e índices de surgencia con el objetivo de describir el hábitat de desove de los distintos grupos (Tabla I) (Lluch-Belda *et al.*, 1991; Hernández-Vázquez, 1994; Hamman *et al.*, 1998; Baumgartner *et al.*, 2000).

Tabla I. Áreas de desove, estacionalidad y valores de temperatura asociados.

Área de desove	Estación del año	Rango de temperatura °C durante el máximo de desove	Referencia
Pacífico noroeste (Vancouver)	verano	14-16	McFarlane <i>et al.</i> , 2005
Punta Concepción, California.	primavera	13-15	Lluch-Belda <i>et al.</i> , 1991
Costa sur de California	primavera	13-15	Lluch-Belda <i>et al.</i> , 1991
Punta Eugenia, B.C.	primavera-verano	15-16	Hernández-Vázquez, 1994
Bahía Magdalena, B.C.S. (dos máximos)	verano (fuera de la bahía) invierno (dentro de la bahía)	superior a 20 16-20	Lluch-Belda <i>et al.</i> , 1991
Golfo de California	Invierno	17-20	Hamman <i>et al.</i> , 1998

## II. 2. Identificación de stocks

### II.2. 1. Hábitat de desove

Planque et al. (2007) clasificaron el hábitat de desove de peces marinos en tres categorías: hábitat potencial, realizado y exitoso. El hábitat potencial se define dentro del rango de condiciones ambientales bajo las cuales una especie puede desovar. En algunas especies el rango puede ser muy amplio, por lo que el hábitat potencial puede ser inferido a partir de experimentos en un acuario en el que se tenga control de las variables físicas que influyen directamente en el desove (i.e. temperatura y fotoperíodo) (Nikolsky, 1963; Marshall, 1976). El hábitat de desove realizado es definido como la región donde los individuos de la especie de interés desovan en el presente y es el que generalmente se observa durante cruceros prospectivos. El hábitat de desove exitoso es definido como el

hábitat donde hubo desove y se obtuvo un reclutamiento exitoso a la población adulta. El hábitat de desove exitoso se encuentra contenido dentro del hábitat realizado y no puede ser documentado a partir de los patrones de desove pues se requiere que los juveniles sean reclutados a la población.

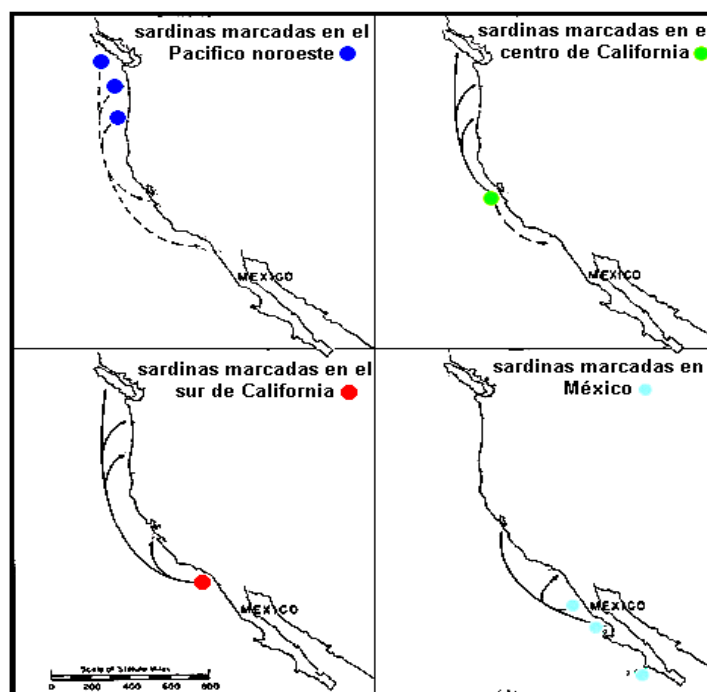
De acuerdo con el criterio de Planque *et al.* (2007) y las observaciones relacionadas con el hábitat de desove a lo largo del rango de distribución de la sardina (Lluch-Belda *et al.*, 1991; Hernández-Vázquez, 1994; Hamman *et al.*, 1998; Baumgartner *et al.*, 2000; McFarlane *et al.*, 2005) (Tabla I) se puede considerar que su hábitat de desove potencial se extiende desde las costas de Vancouver, donde la ocurrencia de huevos ha sido observada de forma esporádica (McFarlane *et al.*, 2002; Emmett *et al.*, 2005; McFarlane *et al.*, 2005), hasta las costas del centro del Golfo de California (Hamman *et al.*, 1998). El desove dentro del hábitat potencial puede ocurrir a lo largo de todo el año en el rango de 12-25° C (Tabla I), observándose dos máximos: el primero a 14-15° C y el segundo a temperaturas mayores a 18.5° C frente a las costas del Pacífico. En el interior del Golfo de California el desove ocurre entre los 17-20° C (Lluch-Belda *et al.*, 1991; Hamman *et al.*, 1998). Adicionalmente, se ha observado la presencia de huevos de sardina (con mayor frecuencia) cuando los índices de surgencia de Bakun son intermedios (Lluch-Belda *et al.*, 1991).

## **II.2. 2. Migración y principales áreas de desove de diferentes grupos de sardinas**

Clark (1945) estudió el potencial migratorio de la sardina mediante un programa de marcado y recaptura llevado a cabo a mediados del siglo pasado (desde 1936 hasta 1942). Las observaciones de este programa indicaron que individuos marcados frente a la costa sur



de California durante febrero-marzo fueron recapturados en latitudes más norteñas, frente a la Columbia Británica, en julio. En contraste, las sardinas marcadas frente a Columbia Británica durante julio-agosto fueron recapturadas frente a la costa sur de California durante diciembre-enero. Adicionalmente, sardinas marcadas frente a la Bahía Sebastián Vizcaino, Baja California, fueron recapturadas hasta la costa de San Francisco, California (Figura 2). El autor propuso que la rapidez de la migración latitudinal está asociada con la talla del pez, ya que las sardinas más grandes se desplazaron más rápidamente hacia campos pesqueros distantes mientras que sardinas de menor talla tendieron a mantenerse por más tiempo en la localidad en la cual fueron marcadas o hicieron migraciones más cortas.



**Figura 2.** Movimientos migratorios latitudinales de la sardina observados a través de un programa de marcado y recaptura Clark (1945).

Félix-Uraga et al. (2004) infirieron el movimiento migratorio latitudinal contemporáneo de la sardina asociando variables oceanográficas (i.e. datos mensuales de temperatura superficial del mar) y datos mensuales de captura comercial de los principales campos pesqueros durante el periodo 1981-2002. Sus observaciones indicaron que los máximos de captura comercial se encontraban dentro de tres intervalos de temperatura superficial del mar: el primero entre 13-17 °C, el segundo entre 17-22 °C y el tercero entre 22-27 °C (Figura 3). Con base en estas observaciones, Félix et al. (2004) consideran tres grupos de sardinas afines a los rangos de temperatura previamente mencionados (grupo frío, templado y cálido). Por ejemplo, las sardinas dentro del rango de 13-17 °C (grupo frío) son capturadas en la pesquería de San Pedro California de enero-abril (Figura 3 y 4). Entre abril y julio alcanza su rango de distribución más sureño (en ocasiones hasta Punta Eugenia, Baja California). Posteriormente, este grupo frío inicia su migración hacia el norte (Oregon, Washington y Columbia Británica) siguiendo la temperatura superficial del mar. Esta migración, que inicia en julio y termina a finales de octubre, se refleja en los datos de captura de esa región (McFarlane et al., 2005). En invierno, la migración es hacia el sur ya que la temperatura superficial del mar es menor a 13 °C en las latitudes más norteñas.

Las sardinas que tienen afinidad por el rango de 17-22° C (grupo templado) son capturadas dentro de Bahía Magdalena (límite latitudinal más sureño) de enero a junio, con un máximo en abril-mayo. Posteriormente, el grupo migra hacia el norte siguiendo ese rango de temperaturas hasta Ensenada y San Pedro California (límite latitudinal norteño). En Ensenada, el máximo de captura ocurre de septiembre a finales de noviembre entre 17-22° C, este grupo puede extenderse hasta San Pedro California. El grupo templado inicia nuevamente su movimiento hacia el sur en invierno, cuando la temperatura superficial del

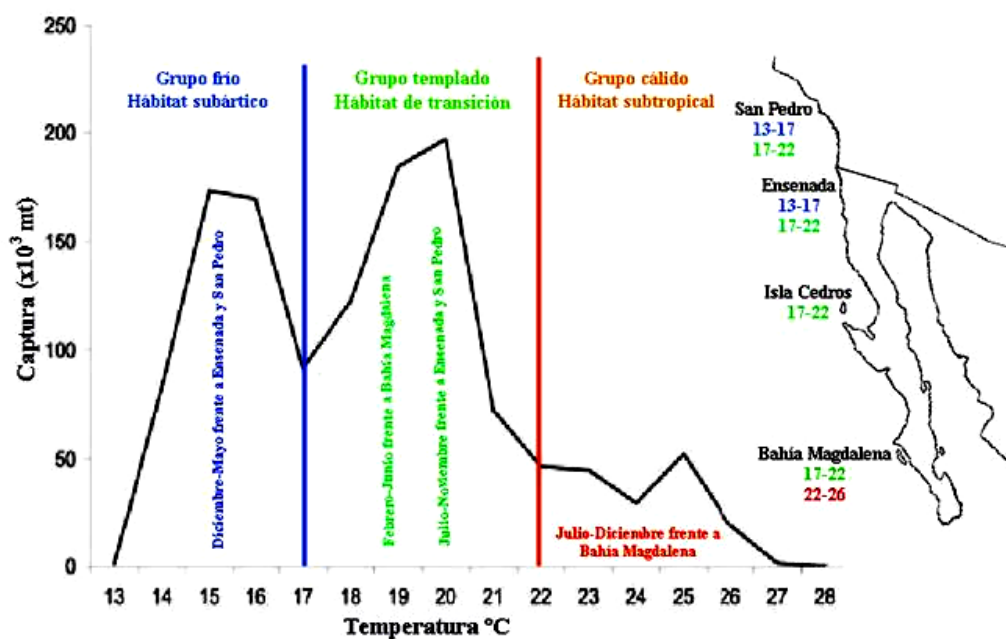
mar es menor a 17 °C (Figura 3 y 4). Nótese que este grupo (en su migración latitudinal) cruza dos veces al año la Bahía de Sebastián Vizcaíno, esto puede verse reflejado en la temperatura asociada a los datos de captura de la pesquería de Isla de Cedros a lo largo de todo el año, los cuales se encuentran dentro del rango de 17-22 °C. Adicionalmente, se ha observado un grupo de sardinas que habita entre los 22-27 °C (grupo cálido) y que es capturado fuera de Bahía Magdalena de agosto a octubre (Figura 3 y 4). Se sabe poco sobre la integridad y migración de este grupo, aunque se ha sugerido que se desplaza hacia la zona sur del Golfo de California (Félix-Uraga *et al.* 2004). La Tabla II indica las áreas y época del año en las cuales se ha observado el desove a través del rango de distribución e integra el modelo migratorio propuesto por Félix *et al.* (2004). Cabe mencionar que la temperatura y el fotoperíodo serían el mecanismo físico que establecería el ciclo migratorio latitudinal de la sardina, ya que estas variables están directamente relacionadas con la fisiología energética y reproductiva del organismo (Nikolsky, 1963; Marshall, 1976). El impacto de estas variables sobre la sardina del Pacífico ha sido escasamente estudiado. Sin embargo, se sabe que los peces migran por tres causas principales: alimentación, reproducción y para protegerse del invierno (Nikolsky, 1963; Marshall, 1976). Desde el punto de vista reproductivo, la temperatura y el fotoperíodo están directamente relacionados con el control de la síntesis de la hormona PPG (Gonadotropina Pituitaria Ictiológica, por sus siglas en inglés), que tiene como blanco las gónadas que sintetizaran las otras hormonas responsables de la maduración de los ovarios en las hembras y la producción de esperma en los machos (Nikolsky, 1963; Marshall, 1976). Estos cambios fisiológicos asociados al medio ambiente ocasionan un cambio en el comportamiento de los individuos que los llevaría a realizar movimientos migratorios con el fin de reproducirse

(Nikolsky, 1963; Marshall, 1976). Desde el punto de vista energético, diferentes temperaturas ocasionan un cambio en la tasa metabólica y en el consumo de oxígeno, lo cual lleva a un cambio en el comportamiento migratorio (Brown, 1957). Se debe destacar la falta de estudios fisiológicos detallados en la sardina del Pacífico que permitan explicar las causas de los movimiento migratorios (i.e. por alimentación, desove o para protegerse del invierno) en relación con la variabilidad ambiental interanual e interdecadal. Al respecto, Félix et al. (2004) mencionan que el movimiento migratorio de los grupos de sardina hacia el sur (en invierno) es favorecido por el fortalecimiento de la Corriente de California, mientras que en verano-otoño el movimiento hacia el norte es favorecido por el establecimiento de un flujo en contracorriente hacia el norte (Figura 4).

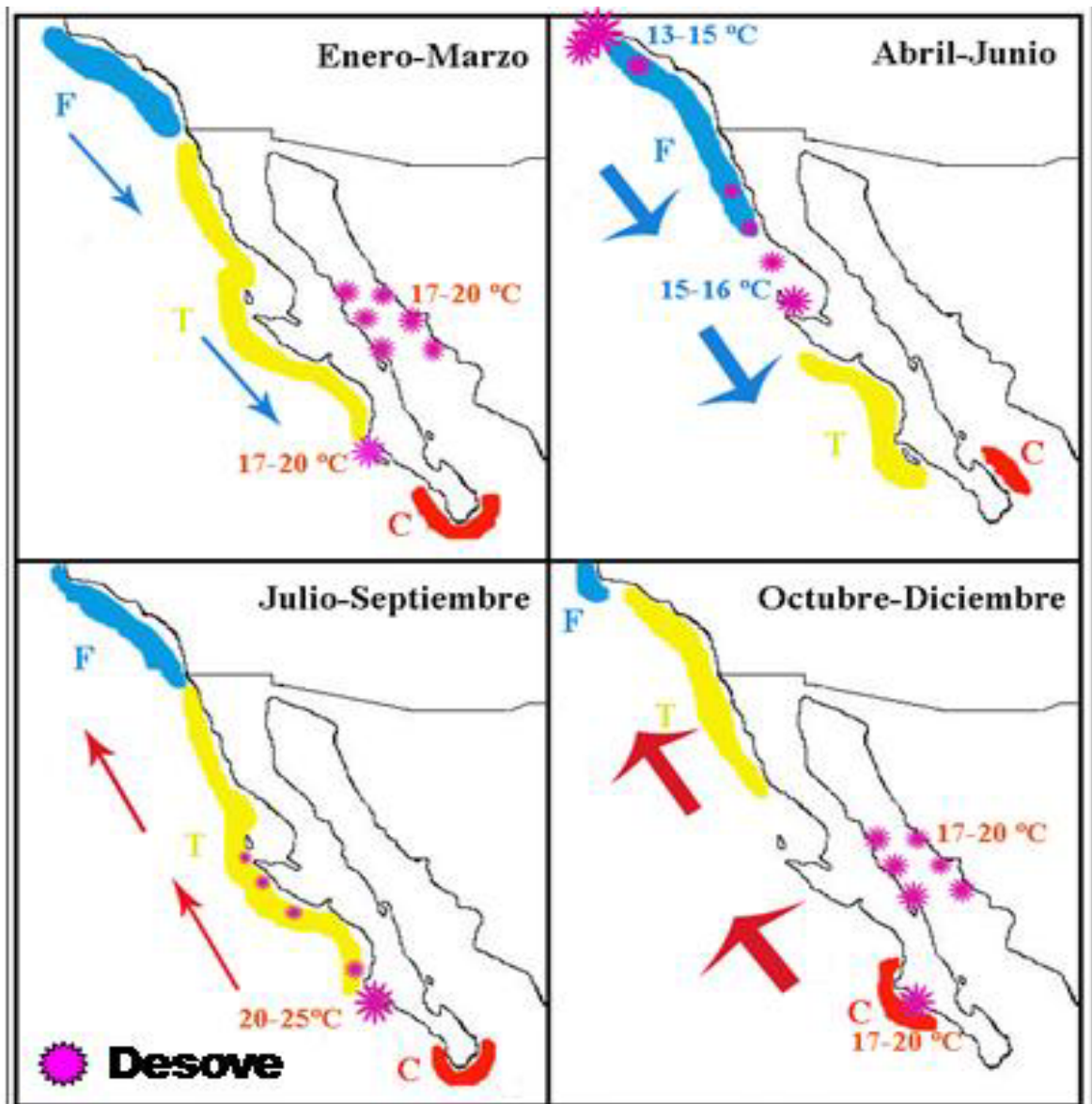
Tabla II. Áreas de desove de los grupos migratorios de sardina.

<b>Grupos migratorios Temp. °C (referencia)</b>	<b>Desova durante su migración hacia el norte</b>	<b>Desova durante su migración hacia el sur</b>
Frío 13-17 (1, 2, 5)	Pacífico noroeste (Vancouver, Washington y Oregon) VERANO	Costa de California y Baja California INVIERNO
Templado 17-22 (2, 3)	Hasta la costa sur de California VERANO	Bahía Magdalena INVIERNO
Cálido 22-27 (2)	Desde Bahía Magdalena hasta Punta Eugenia VERANO	(sin datos)
Golfo de California 17-23 (4)	Golfo de California (grupo residente) INVIERNO	

Referencias 1. McFarlane et al., 2004. 2. Lluch-Belda et al., 1991. 3. Hernández-Vázquez, 1994. 4. Hamman et al., 1998. 5. Baumgartner et al., 2000.

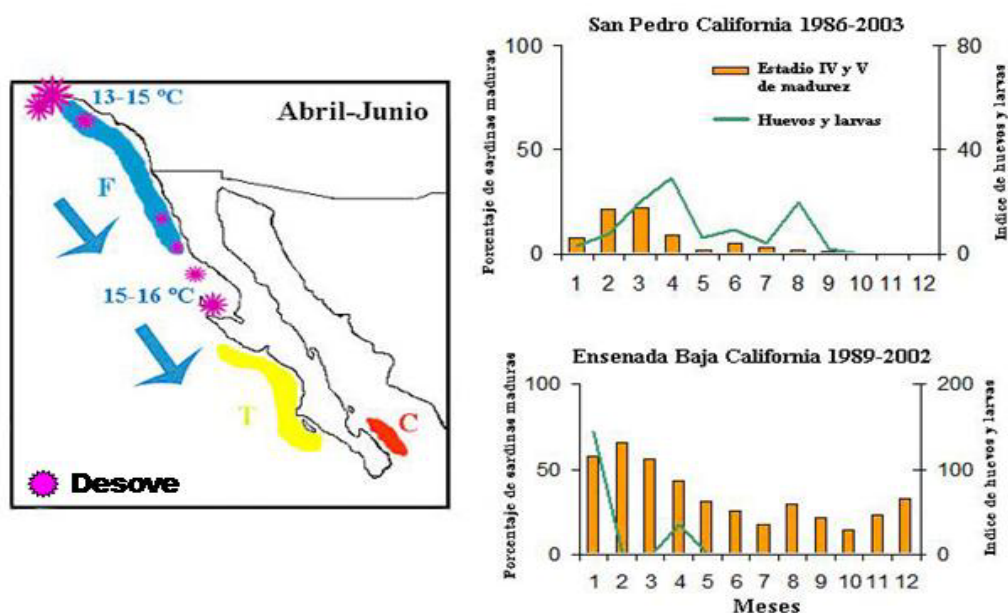


**Figura 3.** Máximos de captura asociados a intervalos de temperatura superficial del mar de las principales pesquerías de sardina frente a la costa del Pacífico de Norte América durante 1981-2002. Tomado de Félix-Uraga et al. (2004).



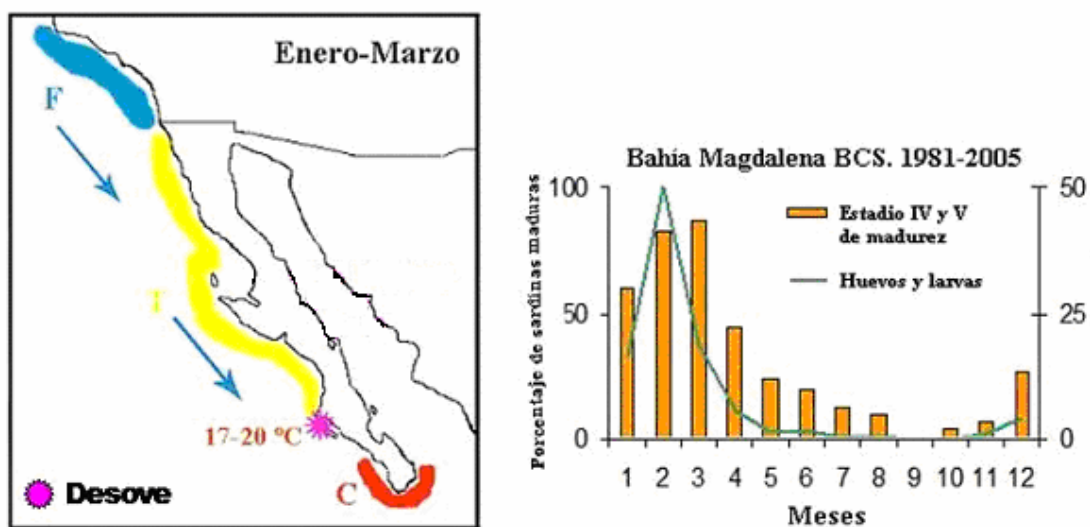
**Figura 4.** Migración estacional-latitudinal de grupos de sardina del Pacífico en función del rango de temperatura que habitan y las principales áreas de desove. (F) grupo frío, (T) grupo templado (C) grupo cálido. Flecha azul: migración hacia el sur. Flecha roja: migración hacia el norte. Tomado de Félix-Uraga et al. (2004).

El grupo subártico desova en la costa sur de California frente a San Pedro, de febrero a abril entre 13-15° C, asociado a valores altos de índices de surgencia (Lluch-Belda *et al* 1991). El mayor porcentaje de hembras en estado de madurez IV y V (pre-desove) se observa en febrero y marzo (Figura 5) mientras que el máximo de abundancia de huevos y larvas frente a esta costa se registra en abril y puede extenderse hasta la costa de Baja California (en ocasiones hasta Punta Eugenia). Adicionalmente, se puede observar un segundo máximo en la abundancia de huevos y larvas en agosto (Figura 5). En Ensenada, el mayor porcentaje de hembras maduras se observa en los primeros meses del año (Figura 5) mientras que el máximo de abundancia de huevos y larvas ocurre en abril entre 13-16° C. Cabe mencionar que el grupo subártico en su migración hacia el norte desova esporádicamente en el Pacífico noroeste (Vancouver) entre 14-16° C de mayo a septiembre (McFarlane *et al.*, 2005).



**Figura 5.** Patrón estacional de madurez y desove frente a la costa sur de California y Baja California. Tomado de Félix-Uraga *et al.* (2004).

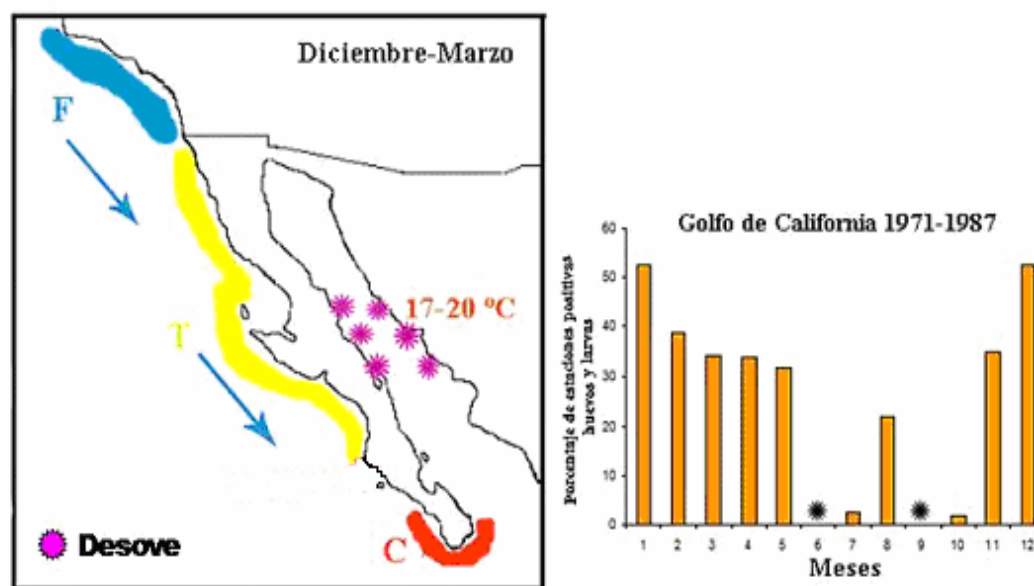
Dentro de Bahía Magdalena, el desove inicia en enero. El mayor porcentaje de hembras en estado de madurez IV y V (pre-desove) se observa en febrero y marzo (Figura 6) con un máximo en la abundancia de huevos y larvas en los mismos meses a una temperatura de 17-20 °C (Funes-Rodríguez *et al.*, 2001). Se puede observar un segundo máximo de desove que ocurre ocasionalmente en el exterior de la bahía durante julio-septiembre, y puede extenderse hacia el norte hasta Punta Eugenia a temperaturas mayores a 20 °C (Lluch-Belda *et al.*, 1991).



**Figura 6.** Patrón estacional de madurez y desove dentro de Bahía Magdalena. Tomado de Félix-Uraga et al. (2004).



En la zona centro del Golfo de California, se capturan sardinas en el rango de 17-23 °C desde noviembre hasta junio, con un máximo de captura en abril y mayo (Martínez, 1985). El desove puede ocurrir desde octubre hasta marzo entre los 17-20° C (Figura 7). El máximo de huevos y larvas en esta zona se ha observado durante diciembre-enero (Nevárez-Martínez, 1990; Hammann *et al.*, 1998). Respecto a la migración, Sokolov (1974) consideran que estas sardinas migran hacia el sur del Golfo en invierno con el fin de desovar, mientras que en verano migran hacia el norte para alimentarse. Sin embargo, no se tiene precisión en relación al límite de distribución de este cuarto grupo y tampoco se sabe si este realiza movimientos migratorios fuera del Golfo de California.



**Figura 7.** Patrón estacional de desove dentro del Golfo de California. Tomado de Nevárez-Martínez (1990).

El modelo conceptual previo integra de manera general los patrones migratorios y las áreas de desove de la sardina del Pacífico en asociación con la temperatura superficial del mar. Se debe tener en cuenta que la sardina es una especie que responde de forma muy dinámica a la variabilidad oceanográfica interanual e interdecadal, por lo que los límites de migración entre grupos así como la distribución espacial del desove que considera este modelo puede variar ampliamente de un año a otro. Se recomienda cautela al considerar este modelo conceptual como un fenómeno histórico regular.

### **II.2.3. Grupos identificados a partir de la variabilidad fenotípica**

Clark (1947) identificó una clina latitudinal norte-sur a partir del conteo de vértebras de sardinas colectadas de 1921-1941. Las sardinas norteñas colectadas desde el Alaska hasta Punta Eugenia tuvieron 51.7 vértebras en promedio, mientras que las sardinas del sur colectadas desde Bahía Magdalena al interior del Golfo de California tuvieron en promedio 50.9 vértebras. Posteriormente, Wisner (1961) analizó vértebras de sardinas colectadas entre 1950 y 1957. El autor observó 51.5 vértebras en promedio desde San Pedro hasta Bahía Magdalena y 51.02 en el interior del Golfo de California. Ambos autores identificaron dos grupos de sardinas, aunque establecieron diferentes límites de distribución. Clark (1947) consideró un grupo desde Alaska hasta Punta Eugenia y el segundo, desde Baja California Sur hasta Golfo de California, mientras que Wisner (1961) consideró un grupo frente a la costa del Pacífico y un segundo en el interior del Golfo de California.

Vrooman (1964) comparó la relación talla-edad de cinco grupos de sardinas colectados desde la Bahía de Tomales, California, hasta Guaymas, Sonora. Los resultados indicaron una diferencia entre Tomales y Guaymas de aproximadamente 100 milímetros. El grupo de Guaymas tuvo una longitud estándar promedio de 150 mm de longitud estándar para sardinas de dos y tres años de edad contra un promedio de 220 mm en la muestra de la Bahía de Tomales, para sardinas de la misma edad. Los resultados de este estudio indicaron una clina latitudinal norte-sur con respecto a la relación talla-edad.

Hedgecock et al. (1989) encontraron un rango de longitud estándar de 192-240 mm para sardinas provenientes del Sur de California y 145-162 mm para sardinas provenientes de Bahía Magdalena y el Golfo de California a una edad promedio agrupada de 1.5 años. En este estudio, se corroboró la clina latitudinal de tallas sugerida en estudios previos (Clark, 1947; Wisner, 1961; Vrooman, 1964).

Butler et al. (1996) observaron diferencias de tamaños entre el sur de California (162 mm promedio) y Baja California (142 mm promedio) para las sardinas de un año de edad durante 1991-1993, aunque con un cierto grado de traslape. La longitud estándar (promediada sobre todas las áreas de estudio) fue de 155 mm para sardinas de un año de edad.

Félix-Uraga et al. (2005) analizaron variables morfométricas de otolitos colectados desde Bahía Magdalena hasta Ensenada tomando en cuenta el modelo de migración propuesto por Félix-Uraga et al. (2004). Los resultados de este estudio indicaron diferencias significativas entre grupos aunque con un cierto grado de traslape. Esto se tomó como evidencia a favor de la existencia de tres stocks (frío, templado y cálido). Los autores

consideran que las diferencias morfométricas de los otolitos están determinadas por las condiciones ambientales locales.

Los estudios previos son evidencia de la existencia de variabilidad fenotípica de la sardina a través de su rango de distribución. El patrón que ha podido observarse es el de una clina norte-sur que puede ser explicada por la variabilidad del hábitat en el que se desarrollan los organismos (e.gr. diferentes rangos de temperatura). Dependiendo del autor y el estudio, se han identificado diferentes grupos de sardinas que presentan límites de distribución variables. La variabilidad en los límites de distribución puede deberse a que estos grupos no se encuentran completamente aislados, ya que se observa un cierto grado de traslape en las variables morfométricas medidas debido posiblemente al alto potencial migratorio y a la ausencia de barreras geográficas que prevengan la mezcla de sardinas de diferentes grupos, especialmente en las áreas de contacto entre los grupos.

#### **II.2.4. Variabilidad genética**

Los primeros estudios que brindaron información indirecta sobre variabilidad genética de la sardina se llevaron a cabo en la década de 1960 utilizando reacciones cruzadas de antígenos de eritrocitos. Los antígenos de grupos sanguíneos son carbohidratos asociados a la membrana celular que inducen la formación de anticuerpos debido a que el sistema inmune los reconoce como extraños. En estos estudios, se observaron diferencias entre sardinas del grupo norteño (colectadas frente a Monterrey, San Pedro, San Diego en California y Ensenada, México), el sureño (colectadas en Bahía Vizcaíno, Punta Eugenia y Bahía Magdalena) y del Golfo de California (Sprague y Vrooman. 1962; Vrooman 1964). Por lo tanto, los autores hipotetizaron la existencia de tres subpoblaciones de sardinas. Cabe mencionar que los anticuerpos son moléculas que resultan de la expresión de genes, y que los estudios inmunológicos de la década de 1960 no pudieron cuantificar la variabilidad nucleotídica debido a que los procedimientos técnicos para poder estimarla aún no habían sido desarrollados. En la actualidad, se cuenta con la capacidad técnica que permitiría estimar la variabilidad de estos genes, sin embargo, estos estudios no han sido realizados.

El primer estudio de genética poblacional utilizó aloenzimas, que son marcadores bioquímicos resultantes de la expresión de formas alélicas de genes mendelianos involucrados en rutas metabólicas. Hedgecock et al., (1989) estudiaron 32 loci aloenzimáticos en sardinas adultas provenientes de cinco sitios de muestreo desde la Bahía de Tómales, California, hasta Guaymas, Sonora. La heterocigosis observada fue extremadamente baja (en promedio 1% para los cinco sitios de muestreo). Los autores observaron nueve loci polimórficos de entre los 32 analizados. Ocho de ellos presentaron solamente dos variantes alélicas, mientras que el locus 6PGDH presentó tres alelos en una

muestra de Guaymas. Los 23 loci restantes fueron monomórficos, por lo cual no fue posible encontrar diferenciación alélica entre poblaciones. Adicionalmente, se compararon los niveles de variación aloenzimática con respecto a otras 15 especies de clupeidos, la heterocigosis promedio fue de 7%, mientras que la heterocigosis promedio observada en la sardina fue de 1%. Los autores atribuyeron la baja variabilidad genética a un cuello de botella genético que ocurrió en un pasado distante, el cual eliminó casi toda la variación aloenzimática. Los autores consideraron como evidencia las variaciones históricas de abundancia estimadas a partir de la deposición de escamas en sedimentos anaeróbicos de la cuenca de Santa Bárbara en el sur de California (Soutar y Isaacs, 1969). Una hipótesis alternativa que discuten Hedgecock et al. (1989), es que la sardina haya colonizado recientemente el sistema de la Corriente de California, y que los niveles de variación genética tan bajos sean resultado de un pequeño número de fundadores. Esto sería consistente con el estudio de Fitch (1969), que reportó que los restos fósiles de *Sardinops* están ausentes en sedimentos de la costa sur de California durante el Plioceno y Pleistoceno, mientras que sí hay fósiles de otras especies pelágicas como *Clupea pallasii*, *Engraulis mordax*, *Merluccius productus*, *Scomber japonicus* y *Trachurus symmetricus*. Adicionalmente, la baja variabilidad de loci aloenzimáticos podría ser explicada por el efecto de selección a favor de los alelos predominantes, lo cual no ha sido evaluado. Por último, los autores señalan que los resultados de su estudio deben de ser tomados con cautela, dado el tamaño de muestra pequeño de algunos sitios. El estudio de las aloenzimas (al igual que el de antígenos) no cuantificó la variabilidad nucleotídica de los genes involucrados en la expresión de estas proteínas. Cabe mencionar que no se realizaron

estudios de genética poblacional de la sardina Monterrey durante los 14 años subsiguientes al estudio de Hedgecock et al. (1989).

Recientemente, Lecomte et al. (2004) estudiaron secuencias nucleotídicas del gen mitocondrial citocromo b de sardinas provenientes de la captura de cuatro sitios de muestreo (Isla de Vancouver, San Diego, Bahía de Todos Santos y Guaymas), para evaluar distintas hipótesis acerca de la biogeografía histórica de la sardina. Los autores proponen dos modelos biogeográficos: el modelo de cuenca y el modelo de autoreclutamiento. El modelo de cuenca considera que durante periodos en los que las condiciones ambientales son adversas, la distribución de sardina se restringe a un rango geográfico (cuenca) donde prevalecen condiciones ambientales apropiadas. Bajo este modelo, se considera que la diversidad genética se concentra en el núcleo de la cuenca y disminuye hacia los extremos de la misma cuando los organismos se dispersan nuevamente al reestablecerse condiciones favorables. Por otra parte, el modelo de autoreclutamiento considera que durante condiciones adversas la sardina se contrae a una serie de subpoblacionales locales semi-aisladas, con la posibilidad de que algunas de ellas no puedan completar su ciclo de vida dentro del ambiente local y sean extirpadas. Bajo este modelo, se espera un grado de estructura genética poblacional debido a dicho aislamiento, y no se predice la existencia de un gradiente geográfico en la diversidad genética. Lecomte et al. (2004) observaron niveles altos de diversidad haplotípica (San Diego  $h = 0.92$ ,  $SD = 0.04$ ) mientras que el mínimo de diversidad se encontró en uno de los extremos del rango (Guaymas  $h = 0.83$ ,  $SD = 0.07$ ). Además, se observaron diferencias significativas en el número de haplotipos entre localidades ( $\text{Chi}^2 = 10.61$   $p = 0.001$ ). Estas observaciones fueron consistentes con la hipótesis del modelo de cuenca, colocando a San Diego como el núcleo geográfico de la

cuencia. Sin embargo, el análisis de homogeneidad de las frecuencias haplotípicas entre subpoblaciones no fue significativo, indicando ausencia de estructura poblacional. En consecuencia, los autores consideraron que la sardina del Pacífico posee una sola poza genética a través de su rango de distribución para el marcador molecular que emplearon. Adicionalmente, se estimó el tiempo de coalescencia para los haplotipos asumiendo 2% de divergencia por millón de años entre linajes y un tiempo generacional de 4.4 años. Los haplotipos estudiados convergieron hace 241,000 años, fecha en la que teóricamente existió el haplotipo ancestral a los haplotipos actuales. Finalmente, los autores no pudieron distinguir patrones filogeográficos al elaborar genealogías con los haplotipos estudiados y consideraron como causa de la ausencia de estructura filogeográfica el alto potencial migratorio de la sardina, el cual podría estar homogeneizando genéticamente a las subpoblaciones hipotéticas sugeridas a partir de estudios de diferencias morfométricas y merísticas (Clark, 1947; Wisner, 1961; Vrooman, 1964; Hedgecock *et al.*, 1989). Los autores consideraron que las diferencias fenotípicas son respuestas ontogenéticas a las condiciones ambientales en las que se encuentran inmersos los organismos y no a adaptaciones locales o al aislamiento reproductivo.

Finalmente, Gutiérrez-Flores (2007) estudió secuencias de genes mitocondriales (NAD5 y NAD6) así como ocho loci nucleares (microsatélites) en muestras de sardinas adultas colectadas desde la isla de Vancouver hasta Guaymas entre 2003 y 2006 durante diferentes estaciones del año, para evaluar la hipótesis de la existencia de tres stocks de sardinas afines a diferentes rangos de temperatura (stock frío, templado y cálido de Félix-Uraga *et al.*, 2004). La autora encontró 137 haplotipos para NAD5 y 128 para NAD6. No se encontró un patrón latitudinal con respecto a la diversidad haplotípica mitocondrial, a



diferencia del estudio de Lecomte et al. (2004). En los ocho microsátélites evaluados, encontró altos niveles de polimorfismo, con valores de heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) entre 0.89 y 0.93 y tampoco mostraron ninguna clina latitudinal. Los índices de fijación ( $F_{st}$ ) obtenidos con los datos mitocondriales y nucleares no fueron significativos, indicando homogeneidad genética espacio-temporal de las sardinas muestreadas a lo largo de su rango actual de distribución. Adicionalmente, genealogías de los genes NAD5 y 6 no reflejaron ningún patrón filogeográfico. La autora considera que los valores altos de diversidad genética que observó se mantienen a pesar de las fluctuaciones demográficas históricas debido a un efecto de almacenamiento de genotipos en adultos, así como a un amplio traslape entre generaciones. También considera que la falta de patrones filogeográficos se debe a que no ha transcurrido el tiempo suficiente para generar diferenciación entre linajes y que las diferencias fenotípicas reportadas para la especie son el resultado de la alta plasticidad de la sardina dentro de su hábitat.

En resumen, los estudios de genética poblacional de la sardina del Pacífico realizados con sardinas provenientes de las pesquerías no han podido rechazar la hipótesis nula de que esta especie constituye una población panmíctica a través de su rango de distribución. Estos resultados genéticos contradicen la evidencia de variabilidad fenotípica (morfométrica y merística), así como los patrones de preferencias a rangos de temperatura que han servido para identificar y proponer la existencia de diferentes subpoblaciones. Esta aparente paradoja constituye el principal problema en la identificación de stocks y el establecimiento de sus límites geográficos. El origen de esta problemática reside en una dinámica compleja en la biología histórica y contemporánea de la sardina monterrey que involucra los siguientes factores:

1. La posible colonización reciente (post-Pleistoceno) de la costa del Pacífico de Norteamérica asociada a un número pequeño de individuos que colonizaron el área
2. El alto potencial migratorio en ausencia de barreras oceanográficas que limiten el flujo genético de esta especie
3. Las contracciones y expansiones de los límites geográficos de sub-poblaciones en respuesta a la variabilidad oceanográfica interanual e interdecadal
4. Las fluctuaciones demográficas a lo largo del tiempo asociadas a la variabilidad oceanográfica interanual e interdecadal
5. La naturaleza de los marcadores moleculares estudiados y las fuerzas evolutivas que actúan sobre los grupos de sardina del Pacífico

#### **II.2.5. Los microsatélites: marcadores moleculares empleados en la identificación de subpoblaciones**

Los microsatélites son fragmentos de ADN, en su mayoría no codificante, presentes en los cromosomas nucleares de eucariontes. Se caracterizan por (1) tener una secuencia de dos a seis nucleótidos repetidos en tándem (motivos de repetición), como por ejemplo  $(GATA)_n$ , donde  $n$  es el número de veces que se repite dicho motivo, (2) tener altas tasas de mutación, en el rango de  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  mutaciones por locus por generación, (3) estar ampliamente distribuidos en los genomas nucleares, (4) segregarse independientemente de forma Mendeliana y (5) ser codominantes. Los microsatélites presentan altos niveles de polimorfismo debido a sus altas tasas de mutación, que pueden aumentar o disminuir el número de motivos de repetición durante la replicación del ADN (Schlotterer, 2000).

Los loci microsatelitales se ajustan a la teoría neutral de evolución molecular propuesta por Kimura (1968). Esta teoría sugiere que las variantes alélicas presentes en una población no están sujetas a selección natural y en consecuencia sólo sufren el efecto de la mutación y de la deriva genética al azar. Por lo anterior, la cantidad de variación genética en loci microsatelitales es función de la tasa de mutación y del tamaño efectivo de la población, de lo cual depende la magnitud del efecto de deriva genética (Balloux y Lugon-Moulin 2002). Debido a su alto nivel de polimorfismo, los microsatélites han sido utilizados en estudios de genética poblacional para evaluar diversidad e identificar estructura genética, así como para el establecimiento de relaciones de parentesco (Zhang y Hewitt, 2003).

### **III. Objetivos**

#### **III.1 Objetivo general**

Estimar el grado de diferenciación genética de larvas de *Sardinops sagax caeruleus* asociadas a diferentes temperaturas y grupos de desove mediante el uso de marcadores moleculares (microsatélites).

#### **III.2. Objetivos particulares**

1. Obtener larvas de diferentes grupos de desove de sardina Monterrey
2. Estimar la diversidad genética (i.e. heterocigosis y número de alélos por locus) para cada localidad
3. Estimar el tamaño mínimo de muestra necesario para caracterizar de manera representativa la diversidad genética de la población
4. Estimar los niveles de diferenciación genética

#### **IV. Hipótesis**

Tomando en cuenta el modelo de migraciones latitudinales de grupos de sardinas afines a diferentes rangos de temperatura, se esperaría detectar diferencias genéticas en la descendencia de los mismos. El mecanismo que explicaría las diferencias genéticas de la descendencia sería el aislamiento reproductivo, debido a la supuesta afinidad térmica que tienen los adultos por el hábitat en el que desovan.

Alternativamente, existe la posibilidad de no encontrar diferencias genéticas en la descendencia proveniente de diferentes grupos de desove a pesar de haber sido originada en distintos habitats, debido a que no hay aislamiento reproductivo entre grupos.

## **V. Materiales y métodos**

### **V.1 Obtención de muestras**

Se obtuvieron 271 larvas provenientes de la costa sur de California. Las larvas fueron colectadas por medio de arrastres de plancton oblicuos con redes tipo Bongo y preservadas en etanol (95%) durante los cruceros organizados por California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations (CALCOFI por sus siglas en inglés) durante abril de 1999 (Tabla II). Estas muestras forman parte de la colección de larvas de ictioplancton del National Marine Fisheries Service Southwest Fisheries Science Center (SWFSC) en San Diego, California.

Se obtuvieron 94 larvas provenientes de la costa oeste del Golfo de California. Las larvas fueron colectadas por medio de arrastres verticales con redes tipo Bongo y preservadas en etanol (95%) a bordo del Crucero Prospectivo de Pelágicos Menores del Golfo de California realizado por el Instituto Nacional de la Pesca en Guaymas, Sonora, durante diciembre de 2006 (Tabla III). Debido al pequeño tamaño de muestra obtenido en el Golfo, se decidió agrupar las muestras en Grupo A y Grupo B separadas por una distancia de 200 km el uno del otro. Las larvas provenientes de la costa sur de California fueron separadas por personal de SWFSC, mientras que las larvas provenientes del Golfo de California fueron separadas en CICESE. Para identificar correctamente las larvas de sardina se compararon caracteres morfológicos clave dependiendo del estadio ontogenético (Moser *et al.*, 1996) (Anexo 1). En el estadio larvario de saco vitelino, se observó la presencia de la gota de aceite y pigmentos característicos en la parte dorsal de la cabeza. En el estadio de preflexión-flexión, se observó la forma del cuerpo (tubular-alargado). Además

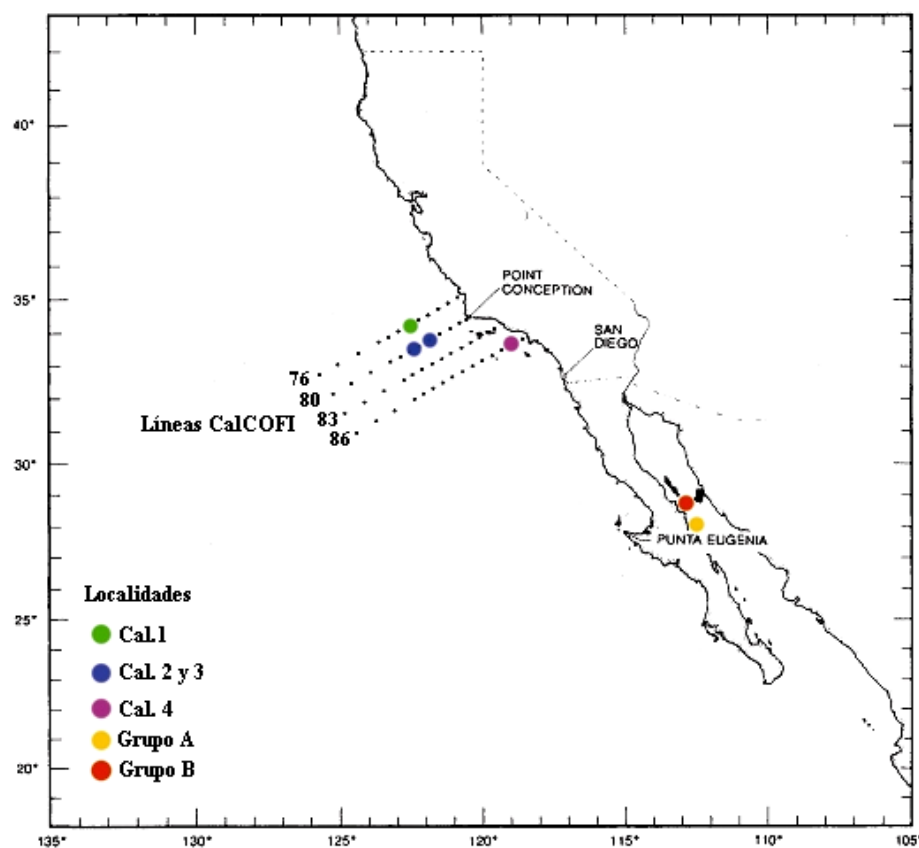
se observaron pigmentos característicos dispuestos en ambos lados de la parte dorsal del intestino y en la aleta caudal. Para el estado de flexión, se observó la separación entre la aleta dorsal y anal por 5-6 paquetes musculares (Anexo 1). La identificación de cada larva para análisis genéticos fue validada por el Dr. William Watson, experto en identificación de ictioplancton del SWFSC San Diego, California.

Tabla III. Tamaño de muestra, fecha y temperatura superficial del mar al momento del muestreo.

Región	Estación	Coordenadas Geográficas (lat. N lon. W)	Tamaño de muestra	Temperatura superficial del mar
Costa sur de California (abril 1999)	Cal. 1	33° 43' 123° 38'	70	12.28
	Cal. 2	33° 29' 122° 32'	74	12.28
	Cal. 3	33° 09' 123° 13'	75	12.69
	Cal. 4	32° 59' 120° 21'	52	13
Golfo de California (diciembre 2006)	Golfo 1	26° 55' 111° 56'	31	19
	Golfo 2	27° 15' 112° 09'	20	19
	Golfo 3	28° 06' 112° 46'	14	19
	Golfo 4	28° 12' 112° 47'	11	19
	Golfo 5	29° 20' 113° 17'	18	19.5

\* Con la finalidad de incrementar los tamaños de muestra las estaciones del Golfo de California se agruparon como sigue: Grupo A: Golfo 1 y 2; Grupo B: Golfo 3, 4 y 5.

Durante la etapa de identificación se observó que el etanol (95%) usado para preservar el tejido puede deformar a las larvas debido a la deshidratación. El encogimiento dificulta hacer mediciones precisas de la longitud pero no interfiere con la identificación a menos que la larva se encuentre dañada debido a una mala conservación o daño físico del tejido.



**Figura 8.** Localidades de colecta frente a la costa su de California (1999) y Golfo de California (2006).



## V.2. Extracción de ADN y amplificación de microsatélites

Se extrajo ADN geonómico de un globo ocular o de una porción de tejido del extremo posterior de la cola de la larva (aproximadamente 1 mm). Las disecciones se hicieron con la ayuda de un microscopio estereoscópico. El tejido de cada larva se depositó en viales para PCR de 0.2 ml que contenían 125  $\mu$ l de la resina Chelex 100 (10%). Posteriormente, los tejidos fueron incubados a 60 °C por 20 minutos y a 99 °C por 25 minutos para liberar el ADN genómico del tejido. Las extracciones se mantuvieron a 4 °C hasta el momento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés).

Se amplificaron nueve loci microsatelitales específicos para *Sardinops sagax caeruleus*: A7, A8, A11, C5, D1, D6, D9, H11, H4 vía PCR con pares de cebadores desarrollados por Pereyra et al. (2004) (Anexo 2). Las reacciones de PCR (12  $\mu$ l de volumen total) consistieron de: 1X amortiguador de reacción, 0.2 mM de dNTP, 0.5  $\mu$ M del cebador forward con marca fluorescente, 0.5  $\mu$ M del cebador reverse, 0.3 unidades de Taq polimerasa (New England Biolabs) y 2  $\mu$ l de ADN geonómico. Los ciclos de temperatura se muestran en el Anexo 2.

Adicionalmente, se probaron dos loci correspondientes a *Sardina pilchardus* (Sp2 y Sapi44) así como los loci H4F y G9 específicos para sardina, desarrollados por Pereyra et al. (2004). Sp2, Sapi44 y H4F fueron excluidos porque tuvieron un porcentaje de amplificación muy bajo y G9 se excluyó por presentar exceso de homocigotos lo cual sugiere la presencia de alelos nulos.

### **V.3. Genotipificación**

El tamaño y la intensidad de fluorescencia de los microsatélites amplificados vía PCR fue registrado por medio de electroforesis en capilares con gel desnaturizante de poliacrilamida al 6% en un secuenciador automático Gene Analyzer ABI 3100 (Applied Biosystems Inc, CA). Posteriormente, la información registrada por el secuenciador pasó por un control de calidad con el programa GeneMapper™ v.3.5. El control de calidad consistió en la comparación de la muestra con un patrón gráfico previamente establecido para cada locus y se excluyeron datos con patrones atípicos. Los genotipos que pasaron satisfactoriamente el análisis de calidad fueron utilizados en la elaboración de los estadísticos que se muestran en la sección de resultados

### **V.4 Análisis de datos**

#### **V.4.1. Estimación de diversidad genética**

Para cuantificar el grado de diversidad genética se estimó la heterocigosis ( $H$ ) por locus para cada localidad. Esta medida representa la proporción de individuos ( $2n$ ) muestreados que poseen dos copias alélicas distintas. La heterocigosis toma valores entre cero y uno, el cero se interpreta como ausencia de heterocigosis (i.e. locus con una sola variante alélica) mientras que un valor de uno refleja la ausencia de homocigotos (i.e. individuos con un par de alélos idénticos). La heterocigosis fue calculada con el programa GENEPOP versión 3.4 (Raymond y Rousset, 1995). También se estimó la heterocigosis esperada ( $H_e$ ), la cual puede ser entendida como la probabilidad esperada de que un genotipo ( $2n$ ) sea heterocigoto al muestrear un par de alelos de la poza genética suponiendo

equilibrio de Hardy-Weinberg (i.e., unión aleatoria de gametos y ausencia de fuerzas evolutivas) a partir de la ecuación:

$$He = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^n x_i^2\right)$$

n = número de individuos analizados  $x_i$  = frecuencia de cada alelo

Adicionalmente, se obtuvieron valores de otras medidas de variabilidad genética como el número total de alelos ( $na$ ) y el número de alelos privados a cada sitio de colecta ( $u$ ). El número de alelos privados corresponde a aquellas variantes alélicas que fueron observadas únicamente en una localidad. Ambos valores fueron determinados por conteo directo del número de alélos. Posteriormente, se realizó una prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg, la cual asume unión aleatoria de gametos y ausencia de fuerzas evolutivas (i.e. selección natural, mutación, flujo genético y deriva genética). De existir equilibrio de Hardy-Weinberg, las frecuencias alélicas y genotípicas permanecerán constantes de una generación a otra. La prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg se realizó por locus, para cada uno de los sitios de muestreo con el programa Genepop v.3.4 (Raymond y Rousset, 1995) y su significancia se estimó por el método de cadena de Markov (Guo y Thompson, 1992).

#### **V.4.2. Estimación del tamaño de muestra**

Para examinar el patrón de incremento de alelos por locus en función del tamaño de muestra, se construyeron curvas de acumulación de alélos con el programa Resampling Stats v3.0 (Simon, 2006). Para esto se realizaron 1000 remuestreos con reemplazo tomando diferentes tamaños de muestra. El número total de alélos descubierto en estos 1000 remuestreos fue promediado y graficado en función del número de alelos muestreados (tamaño de muestra diploide  $-2n-$ ).

#### **IV.4.3. Estimación de estructura genética**

Para cuantificar el grado de diferenciación genética entre localidades se realizaron pruebas de homogeneidad alélica y genotípica con el programa Genepop v.3.4. Para las pruebas alélicas se elaboran tablas de contingencia para cada localidad. La hipótesis nula de esta prueba es que las frecuencias alélicas son idénticas en todas las localidades. La prueba de hipótesis consiste en una  $\text{Chi}^2$  a través del método de Fisher, como se describe en Raymond y Rousset (1995). Para las pruebas de homogeneidad genotípica también se elaboran tablas de contingencia de los genotipos en cada localidad. De manera similar, la hipótesis nula es que la distribución genotípica es idéntica en todas las localidades. Las pruebas de homogeneidad alélica y genotípica se realizaron tomando en cuenta el tamaño alélico expresado en pares de bases y motivos de repetición de los microsatélites. Adicionalmente, se estimó el índice de fijación  $F_{ST}$  con el programa Arlequín v 3.1 (Excoffer y Schneider, 2005). El estadístico  $F_{ST}$  compara la pérdida de heterocigosis promedio para todos los loci asumiendo equilibrio de Hardy-Weinberg en cada localidad contra la heterocigosis promedio esperada (asumiendo equilibrio de Hardy-Weinberg) en la población a partir de la siguiente ecuación:

$$\overline{F}_{ST} = \frac{\overline{H}_T - \overline{H}_S}{\overline{H}_T}$$

$\overline{H}_T$  = heterocigosis promedio esperada para la población

$\overline{H}_S$  = heterocigosis promedio esperada para la subpoblación

Cuando  $F_{ST}$  tiende a 0, la heterocigosis en las subpoblaciones será igual a la heterocigosis de la población lo cual indica ausencia de estructura genética debido al apareamiento aleatorio en toda la población. Si  $F_{ST}$  tiende a la unidad, entonces habrá diferencias en las frecuencias de heterocigotos en cada subpoblación (debido a pérdida-fijación de alelos) con respecto a la frecuencia esperada en la población.

En este estudio, se calculó el estadístico  $F_{ST}$  entre regiones (costa sur de California y Golfo de California) y entre localidades (usando las muestras agrupadas; Fig. 8). El método estadístico utilizado por el programa Arlequín consiste en un análisis jerárquico de varianza de las frecuencias genotípicas, que descompone la varianza total en componentes de varianza en función de los niveles jerárquicos establecidos dentro de subpoblaciones, entre subpoblaciones y entre grupos (Weir y Cockerham, 1984). Adicionalmente, se hizo un análisis de varianza molecular (AMOVA por sus siglas inglés). El AMOVA mide el nivel de estructura genética tomando en cuenta diferentes niveles jerárquicos: dentro de localidades, entre localidades y entre regiones geográficas. Para medir el nivel de estructura genética el AMOVA elabora sumas de cuadrados de los tamaños alélicos expresados en motivos de repetición, asumiendo el modelo de mutación por pasos (Kimura y Ohta, 1978). Este modelo considera que cada mutación crea un nuevo alelo, ya sea adicionando o

eliminando una unidad de repetición del microsatélite con una probabilidad  $u/2$  en ambas direcciones. En consecuencia, alelos de muy diferentes tamaños estarán menos relacionados en comparación con alelos de tamaño similar. Por medio del AMOVA se obtuvo el estadístico  $R_{ST}$ , el cual es análogo al estadístico  $F_{ST}$ . Cuando  $R_{ST}$  tiende a cero, la varianza molecular en cada localidad es la misma que la varianza poblacional, lo cual indica ausencia de diferencias genéticas. Cuando  $R_{ST}$  tiende a la unidad, la varianza en la localidad es mayor que la varianza poblacional, indicando diferencias entre localidades en nivel genético.

Cabe mencionar que para las estimaciones de diferenciación genética se utilizaron solamente aquellas larvas para las cuales la amplificación y genotipificación de microsatélites fue exitosa en cuatro o más loci. Para el estadístico  $F_{ST}$  se tomaron en cuenta cinco de los nueve loci (A7, C5, D1, D6, H4), mientras que para el AMOVA se tomaron en cuenta cuatro (A7, C5, D6, H4). No se incluyeron los loci restantes porque tuvieron más de 25% de los datos faltantes debido a problemas técnicos asociados con la amplificación, genotipificado o asignación del número de motivos de repetición.

Finalmente, se estimó la distancia genética de Nei ( $D_a$ ) y la distancia de Cavalli-Sforza y Edwards ( $D_c$ ) entre muestras. La distancia genética puede ser entendida como una medida del tiempo de divergencia genética de una subpoblación con respecto a una población ancestral. La distancia genética toma valores entre cero y uno. El cero indica ausencia de diferencias genéticas entre las muestras comparadas, mientras que la unidad indica que las muestras comparadas no tienen alelos en común y divergen totalmente una de otra. La matriz de distancias genéticas de Nei se utilizó para elaborar un dendrograma

con el método de Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA por sus siglas en inglés).

## VI. Resultados

### VI.1 Genotipificado de loci microsatelitales

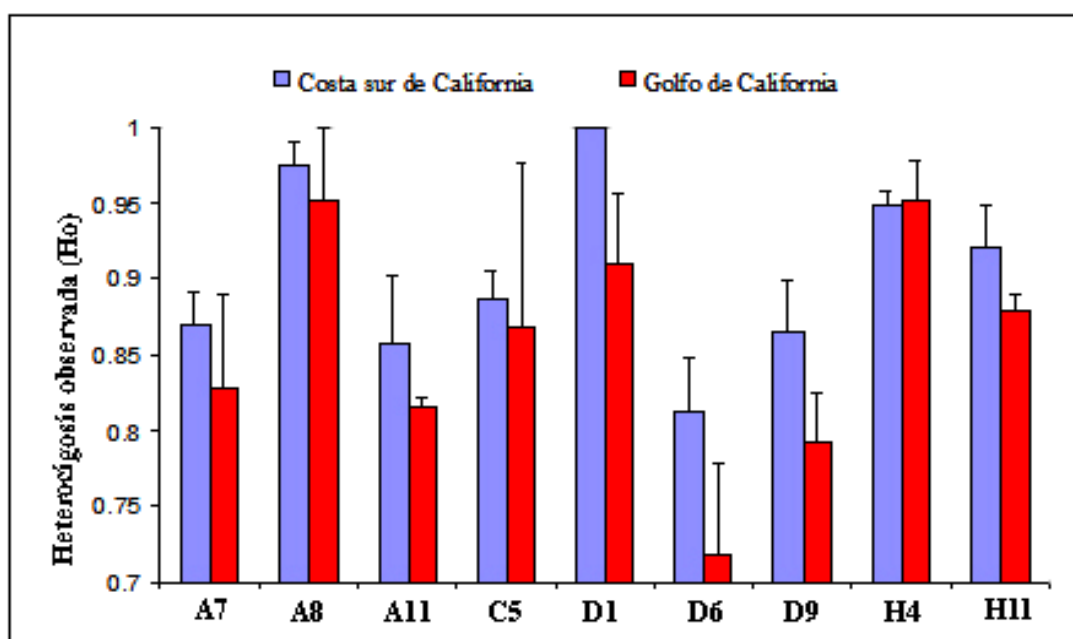
La Tabla IV indica el número total de individuos muestreados por locus para los cuales la amplificación y genotipificación fue exitosa en cada una de las estaciones de la costa sur de California y Golfo de California. Cabe mencionar que no todos los ensayos de laboratorio fueron exitosos debido a problemas de preservación de tejido, así como problemas técnicos relacionados con la amplificación y genotipificación, por lo que la cantidad de individuos totales para cada locus de la Tabla IV es menor al tamaño de muestra colectado en cada localidad.

Tabla IV. Número de individuos genotipificados exitosamente por locus y por localidad.

Locus	Localidades					
	Cal. 1	Cal. 2	Cal. 3	Cal. 4	Grupo A	Grupo B
A7	47	65	69	46	33	24
A8	27	38	31	30	42	28
A11	27	26	23	26	42	26
C5	42	63	64	41	44	29
D1	41	46	41	37	45	28
D6	55	48	63	47	39	27
D9	24	14	22	26	40	29
H11	33	31	23	34	46	27
H4	44	59	50	38	49	27

## VI.2. Diversidad de loci microsatelitales

Se observaron altos niveles de polimorfismo en los nueve loci evaluados. El número mínimo de alelos fue de 19 para el locus D6, mientras que el máximo fue de 56 para A8. En promedio se observaron 35 alelos por locus. El número promedio de alelos privados por locus en la costa sur de California fue de nueve, mientras que en el Golfo se observaron 15 alelos privados por locus en promedio. Se observaron valores de heterocigosis promedio mayores en la costa sur de California  $H_o = 0.904$  y  $H_e = 0.926$  en comparación con las muestras del Golfo  $H_o = 0.857$  y  $H_e = 0.905$ . El máximo valor de diversidad (i.e. uno) se observó en el locus D1 en la costa sur de California (Figura 9) (Tabla V).



**Figura 9.** Valores de heterocigosis observada promedio ( $H_o$ ) y error estándar por locus para la costa sur de California y Golfo de California.



Se encontró desequilibrio de Hardy-Weinberg en las frecuencias genotípicas de los loci A11, C5, D1, D6, H4 y H11 en larvas de sardina colectadas en algunas localidades de la costa sur de California y del Golfo de California luego de aplicar la corrección secuencial de Bonferoni. Cabe mencionar que el desequilibrio de frecuencias genotípicas no fue recurrente para alguna localidad o para algún locus en particular. En todos los casos el desequilibrio fue ligero, ya sea con un exceso o déficit de heterocigotos en relación a la frecuencia esperada (Tabla V).

Tabla V. Niveles de variación genética de larvas de *Sardinops sagax caeruleus* colectadas en la costa sur de California (1999) y Golfo de California (2006).

	Costa sur de California 1999					Golfo de California 2006		
	Cal. 1	Cal. 2	Cal. 3	Cal. 4	Promedio	Grupo A	Grupo B	Promedio
<b>A7 (65-148 pb)</b>								
N	47	65	69	46	56.75	33	24	28.5
na (u)	23	23	26 (2)	28 (1)	31(3)	22 (8)	18 (4)	26 (12)
Ho	0.894	<b>0.846</b>	0.913	0.826	0.870 +/- 0.02	<b>0.767</b>	0.889	0.828+/- 0.061
He	0.921	<b>0.877</b>	0.910	0.915	0.905	<b>0.876</b>	0.811	0.843
<b>A8 (196-291 pb)</b>								
N	27	38	31	30	31.5	42	28	35
na (u)	31 (4)	35 (4)	35 (4)	32 (4)	56 (16)	42 (15)	32 (5)	47 (20)
Ho	1.000	1.000	0.935	0.966	0.975+/- 0.016	0.905	1.000	0.952+/- 0.047
He	0.974	0.959	0.978	0.976	0.972	0.978	0.971	0.974
<b>A11 (236-399 pb)</b>								
N	27	26	23	26	25.5	42	26	34
na (u)	16 (2)	17 (2)	19 (4)	16 (2)	33 (10)	22 (9)	16 (3)	25 (12)
Ho	<b>0.741</b>	0.846	0.957	<b>0.884</b>	0.857+/- 0.045	0.810	<b>0.821</b>	0.816+/- 0.006
He	<b>0.923</b>	0.920	0.935	<b>0.923</b>	0.925	0.926	<b>0.908</b>	0.917
<b>C5 (109-203 pb)</b>								
N	42	63	64	41	52.5	44	29	36.5
na (u)	30 (3)	36 (2)	40 (7)	27	50 (12)	30 (12)	24 (6)	36 (18)
Ho	<b>0.857</b>	0.905	0.859	0.927	0.887+/-0.017	0.978	<b>0.759</b>	0.868+/- 0.109
He	<b>0.945</b>	0.959	0.956	0.948	0.952	0.888	<b>0.955</b>	0.921

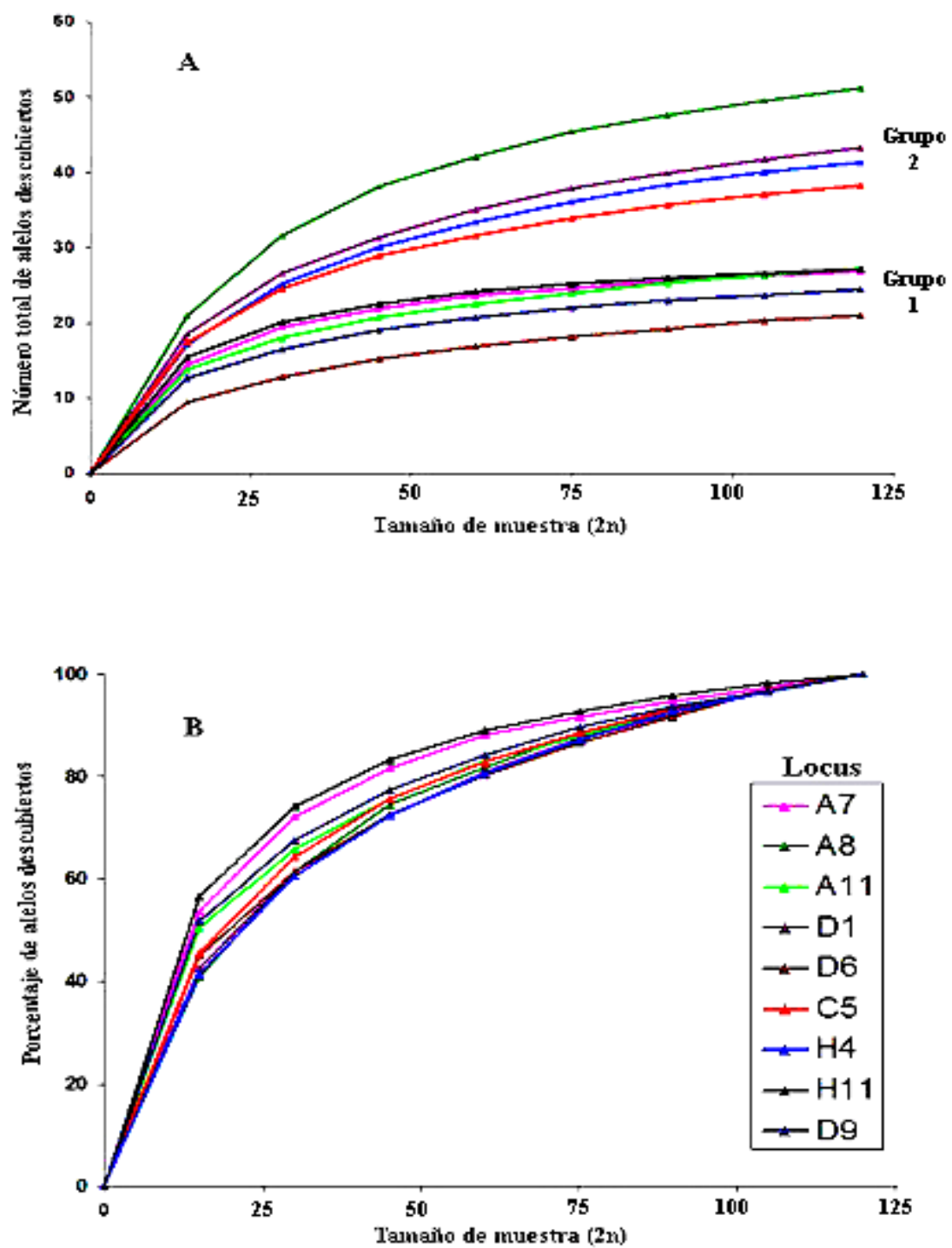
Tabla V. Continuación

	Costa sur de California 1999					Golfo de California 2006		
	Cal. 1	Cal. 2	Cal. 3	Cal. 4	Promedio	Grupo A	Grupo B	Promedio
<b>D1 (161-376 pb)</b>								
N	41	46	41	37	41.25	45	28	36.5
na (u)	31 (2)	30 (4)	29 (3)	27 (2)	46 (11)	32 (17)	26 (11)	43 (28)
Ho	<b>1.000</b>	1.000	1.000	1.000	1.000+/- 0	0.956	0.862	0.909+/- 0.047
He	<b>0.959</b>	0.959	0.960	0.954	0.958	0.962	0.949	0.955
<b>D6 (109-191 pb)</b>								
N	55	48	63	47	53.25	39	27	33
na (u)	16 (1)	16 (4)	15	15 (2)	28 (7)	13 (6)	13 (6)	19 (12)
Ho	0.873	0.729	0.777	0.870	0.812+/- 0.036	0.658	<b>0.778</b>	0.718+/- 0.060
He	0.851	0.746	0.802	0.825	0.806	0.644	<b>0.820</b>	0.732
<b>D9 (254-326 pb)</b>								
N	24	14	22	26	21.5	40	29	34.5
na (u)	18 (3)	12 (1)	14 (1)	14 (2)	25 (7)	21 (7)	17 (3)	24 (10)
Ho	0.875	0.929	0.773	0.885	0.865+/- 0.033	0.825	<b>0.759</b>	0.792+/- 0.033
He	0.941	0.910	0.914	0.913	0.919	0.920	<b>0.932</b>	0.926
<b>H4 (171-263 pb)</b>								
N	44	59	50	38	47.75	49	27	38
na (u)	31 (4)	29 (2)	24 (2)	26 (5)	49 (13)	27 (11)	21 (5)	32 (16)
Ho	0.977	0.932	0.940	0.947	0.949+/- 0.01	0.979	0.926	0.952+/- 0.027
He	0.945	0.950	0.930	0.946	0.943	0.934	0.946	0.940
<b>H11 (145-192 pb)</b>								
N	33	31	23	34	30.25	46	27	36.5
na (u)	22 (1)	23 (3)	19	24 (1)	31 (5)	25 (7)	21 (3)	28 (10)
Ho	0.879	0.967	0.870	<b>0.970</b>	0.921+/- 0.027	<b>0.869</b>	0.889	0.879+/- 0.01
He	0.949	0.951	0.947	<b>0.951</b>	0.949	<b>0.939</b>	0.930	0.934
Ho promedio	0.899	0.906	0.891	0.919	0.904	0.861	0.854	0.857
He promedio	0.934	0.915	0.926	0.928	0.926	0.896	0.914	0.905

(n) total de individuos examinados, (na) número de alelos observados, (u) número de alelos privados para la localidad (H<sub>O</sub>) Heterocigosis observada +/- error estándar (H<sub>E</sub>) Heterocigosis esperada. En negritas, frecuencias en desequilibrio de Hardy-Weinberg después de aplicar corrección secuencial de Bonferoni.

### **VI.3. Acumulación de alelos en función del tamaño de muestra**

La Figura 10a muestra el número de alelos acumulados en función del tamaño de muestra para cada locus, mientras que la Figura 10b representa el porcentaje acumulado de alelos. En ambas figuras se observa que el número de alelos descubiertos disminuye conforme aumenta el tamaño de muestra ( $-2n$ ). Más del 80% de las variantes alélicas se encuentra en un tamaño de muestra de  $2n=75$  individuos. En la Figura 10a se distinguen dos grupos: el primer grupo posee menos de 25 alelos (A7, A11, D6, D9, H11) mientras que el segundo posee más de 30 alelos (A8, C5, D1, H4). Ya que el número promedio de alelos para cada grupo es distinto, se sugiere un tamaño mínimo de muestra de  $2n=75$  a 100 individuos por localidad. Tamaños de muestra de 75 a 100 individuos permiten tener representados más del 80% de los alelos que se pueden encontrar en estos nueve loci (Figura 10b), aumentando el poder de las inferencias estadísticas que se emplean en genética de poblaciones.



**Figura 10.** Curva de descubrimiento de alelos y porcentaje de alelos acumulados para nueve loci microsatelitales en función de un tamaño de muestra variable.

#### VI.4. Diferenciación genética de grupos larvarios

Las pruebas de homogeneidad alélica a partir de tamaños alélicos resultaron en una heterogeneidad global significativa entre las muestras ( $\chi^2=\infty$ ,  $df=18$   $p=0.005$ ). Los análisis entre pares de localidades indicaron diferencias significativas entre el Grupo A con respecto a Cal.1, Cal. 3 y Cal. 4 (Tabla VI). Estos resultados implican que la distribución alélica entre estas localidades es distinta. Las pruebas de homogeneidad alélica por locus correspondientes indicaron que estas diferencias son atribuibles a los loci A11, C5 y D6 (Tabla VII).

Tabla VI.- Valores de  $\chi^2$  de la prueba de homogeneidad alélica (bajo la diagonal) y valores de -p- por arriba de la diagonal. En negritas, se indican los valores significativos después de la corrección de Bonferoni.

	Cal. 1	Cal. 2	Cal. 3	Cal. 4	Grupo A	Grupo B
Cal. 1	-	0.018	0.840	0.237	<b>0.001</b>	0.397
Cal. 2	32.551	-	0.630	0.005	0.074	0.244
Cal. 3	12.121	15.454	-	0.482	<b>0.001</b>	0.635
Cal. 4	21.872	36.827	17.603	-	<b>0.001</b>	0.017
Grupo A	$\infty$	27.249	$\infty$	$\infty$	-	0.005
Grupo B	19.00	21.712	15.383	32.801	37.147	-

Tabla VII. Prueba de homogeneidad alélica por locus; en negritas se indican los valores significativos después de la corrección de Bonferoni.

	Loci								
	A7	A8	A11	C5	D1	D6	D9	H4	H11
P-value	0.442	0.906	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	0.330	<b>0.001</b>	0.940	0.709	0.745

Las pruebas de homogeneidad genotípica a partir de tamaños alélicos resultaron en una heterogeneidad global significativa entre las muestras ( $\chi^2=32.58$ ,  $df= 18$   $p=0.018$ ). Los análisis entre pares de localidades indicaron una diferencia significativa entre el Grupo A y Cal 4 (Tabla VIII). Estas diferencias fueron atribuidas a los loci A11 y D6 al realizar las pruebas de heterogeneidad genotípica por locus (Tabla IX). No se observaron diferencias significativas en las pruebas de homogeneidad alélica y genotípica al examinar motivos de repetición (Tabla X).

Tabla VIII.- Valores de  $\chi^2$  de la prueba de homogeneidad genotípica (bajo la diagonal) y valores de -p- (por arriba de la diagonal). En negritas, se indican los valores significativos después de la corrección de Bonferoni.

	Cal. 1	Cal. 2	Cal. 3	Cal. 4	Grupo A	Grupo B
Cal. 1	-	0.027	0.912	0.273	0.008	0.566
Cal. 2	31.169	-	0.733	0.005	0.272	0.305
Cal. 3	10.54	13.928	-	0.583	0.005	0.758
Cal. 4	18.903	37.067	16.127	-	<b>0.002</b>	0.073
Grupo A	35.246	21.137	34.087	39.176	-	0.136
Grupo B	16.369	20.494	13.537	27.326	24.61	-

Tabla IX Prueba de homogeneidad genotípica por locus. En negritas se indican los valores significativos después de la corrección de Bonferoni.

	Loci								
	A7	A8	A11	C5	D1	D6	D9	H4	H11
P-value	0.772	0.888	<b>0.017</b>	0.024	0.101	<b>0.005</b>	0.905	0.727	0.866

Tabla X.- Valores de significancia -p- correspondientes a las pruebas  $\chi^2$  de homogeneidad alelica (arriba de la diagonal) y genotípica (debajo de la diagonal) a partir de motivos de repetición.

	Cal. 1	Cal. 2	Cal. 3	Cal. 4	Grupo A	Grupo B
Cal. 1	-	0.026	0.766	0.938	0.131	0.199
Cal. 2	0.083	-	0.722	0.235	0.845	0.235
Cal. 3	0.868	0.887	-	0.779	0.161	0.292
Cal. 4	0.963	0.352	0.803	-	0.605	0.400
Grupo A	0.153	0.809	0.120	0.607	-	0.213
Grupo B	0.244	0.252	0.354	0.463	0.283	-

El estadístico  $F_{ST}$  indicó pequeñas diferencias genéticas significativas (cerca de cero) al comparar entre regiones: costa sur de California ( $n=199$ ) y Golfo de California ( $n=77$ ) ( $F_{ST}=0.0026$   $p=0.0059$ ). También se encontraron pequeñas diferencias genéticas significativas (cerca de cero) al comparar entre pares de localidades de la muestra del Golfo de California (Grupo A) y entre las estaciones Cal. 3 y Cal. 4 de la costa sur de California (Tabla XI). Se observó un  $F_{ST}$  significativo entre los grupos del Golfo de California (Grupo A y B). Cabe mencionar que antes de la corrección secuencial de Bonferroni también se observaron diferencias entre las muestras Grupo A y Cal. 1 y entre Grupo B y Cal. 4 (Tabla XI en cursivas). Los valores negativos de  $F_{ST}$  son un artefacto estadístico que sucede cuando por efecto de redondeo la suma de las diferencias cuadradas entre poblaciones es ligeramente menor a la suma de las diferencias cuadradas dentro de poblaciones, lo cual resulta en un número negativo que debe interpretarse como un valor de cero.

Tabla XI Estadístico  $F_{ST}$  entre pares de localidades. Valores de  $F_{ST}$  debajo de la diagonal, valores de  $p$  arriba de la diagonal, en negritas valores significativos después de la corrección de Bonferoni.

	Cal. 1	Cal. 2	Cal. 3	Cal. 4	Grupo A	Grupo B
Cal. 1	-	0.999	0.999	0.920	<i>0.016</i>	0.460
Cal. 2	-0.012	-	0.985	0.991	0.061	0.998
Cal. 3	-0.007	-0.004	-	0.192	<b>0.002</b>	0.787
Cal. 4	-0.003	-0.005	0.001	-	<b>0.001</b>	<i>0.026</i>
Grupo A	<i>0.006</i>	0.003	<b>0.007</b>	<b>0.009</b>	-	<b>0.001</b>
Grupo B	-0.005	-0.010	-0.002	<i>0.006</i>	<b>0.01</b>	-

El AMOVA global entre muestras de la costa sur de California y el Golfo de California indicó ausencia de diferenciación genética ya que la prueba resultó no significativa (Tabla XII). El mayor componente de varianza se encontró dentro de las localidades de colecta.

Tabla XII.- Análisis de varianza molecular (AMOVA) entre poblaciones para cuatro loci microsatelitales (A7, C5, D6 y H4) a partir de motivos de repetición.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación	Índice de fijación $R_{ST}$	Valor p
Entre poblaciones	5	186.36	-0.5	-0.58	-0.005	0.890
Dentro de poblaciones	672	69084.77	102.8	100.58		
Total	677	69271.13	102.2			



Los valores de  $R_{ST}$  para poblaciones pareadas indicaron ausencia de diferencias significativas (Tabla XIII). El AMOVA jerárquico de tres niveles también indicó ausencia de diferenciación genética, ya que toda la varianza molecular se encontró dentro de poblaciones locales y ninguna entre poblaciones o entre regiones, por lo cual los valores de los índices R no fueron significativos (Tabla XIV).

Tabla XIII.  $R_{ST}$  pareados (debajo de diagonal) y sus valores de p (arriba de la diagonal).

	Cal. 1	Cal. 2	Cal. 3	Cal. 4	Grupo A	Grupo B
Cal. 1	-	0.916	0.912	0.630	0.958	0.994
Cal. 2	-0.009	-	0.362	0.196	0.649	0.432
Cal. 3	-0.010	0.001	-	0.179	0.680	0.791
Cal. 4	-0.004	0.006	0.006	-	0.843	0.900
Grupo A	-0.016	-0.004	-0.005	-0.010	-	0.666
Grupo B	-0.031	-0.001	-0.010	-0.014	-0.008	-

Tabla XIV.- Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) entre regiones y entre localidades dentro de cada región para cuatro loci microsatelitales (A7, C5, D6 y H4) a partir de motivos de repetición.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Varianza	Porcentaje de variación	Índices de fijación	Valor p
Entre regiones	1	-93.97	-0.693	-0.68	$R_{CT}$ -0.0068	1
Entre poblaciones dentro de cada región	4	280.33	-0.284	-0.28	$R_{SC}$ -0.0027	0.69
Dentro de poblaciones	672	69084.77	102.80	100.96	$R_{ST}$ 0.0096	0.90
Total	677	69271.13	101.82			

## VI. 5 Distancia genética entre larvas

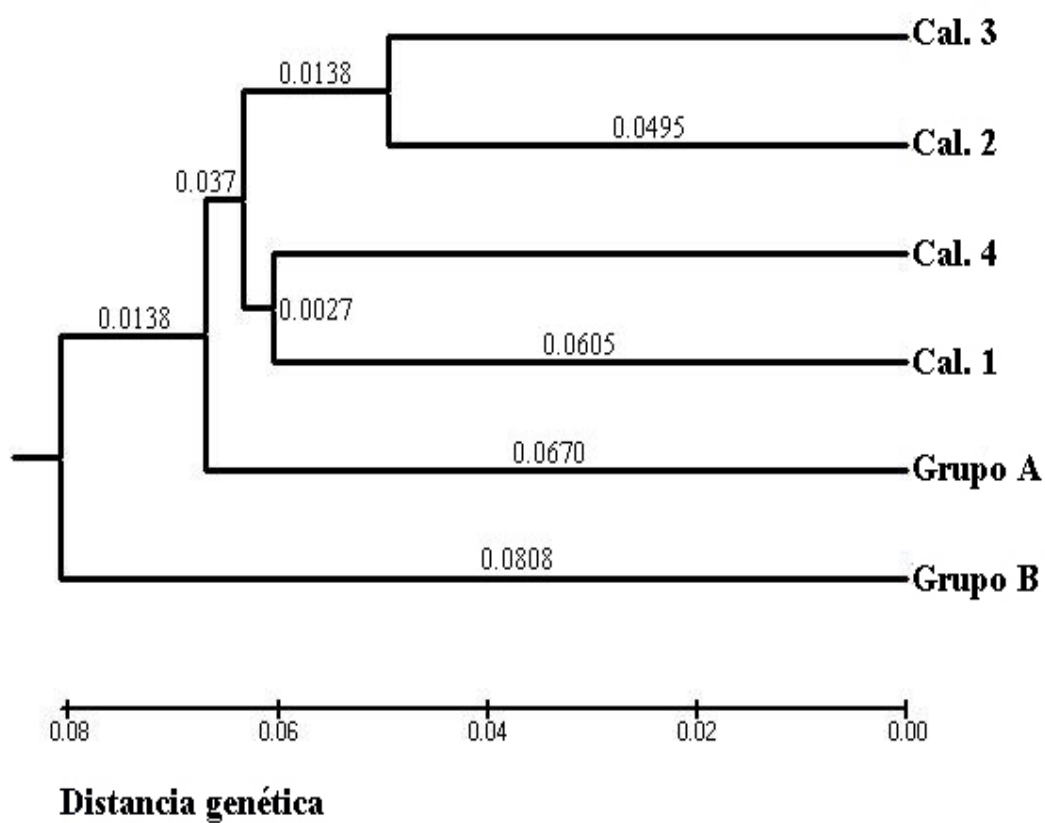
Se calculó la distancia genética de Cavalli-Sforza y Edwards (Dc), así como la distancia genética de Nei (Da) entre pares de muestras (Tabla XV) y se elaboró un dendrograma con el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) para cada matriz de distancia. Las topologías resultaron idénticas para ambas matrices por lo que se presenta solamente la topología obtenida con (Da) (Figura 6).

Tabla XV.- Matrices de distancias genéticas Cavalli-Sforza y Edwards (Dc) arriba de la diagonal y Nei (Da) debajo de la diagonal.

	Cal. 1	Cal. 2	Cal. 3	Cal. 4	Grupo A	Grupo B
Cal. 1	-	0.142	0.130	0.122	0.140	0.167
Cal. 2	0.333	-	0.099	0.129	0.114	0.146
Cal. 3	0.318	0.277	-	0.120	0.141	0.162
Cal. 4	0.309	0.319	0.308	-	0.121	0.166
Grupo A	0.334	0.299	0.331	0.309	-	0.163
Grupo B	0.361	0.339	0.359	0.362	0.359	-

El dendrograma de distancias genéticas de Nei (Da) (Figura 6) indica que las larvas del Grupo B del Golfo son las más distintas genéticamente de las de otras localidades. Se destaca la formación de un grupo formado por larvas de la misma área geográfica, CalCOFI línea 80 estaciones 8 y 9 (Cal. 2 y Cal. 3) que son genéticamente más similares entre sí en comparación con otras localidades del sur de California. Esto podría sugerir la presencia de al menos un grupo de desove discreto dentro del hábitat subártico, aunque no esté lo

suficientemente diferenciado como para producir estadísticos que indiquen niveles significativos de estructura genética.



**Figura 11.** Dendrograma de distancias genéticas Nei (Da) 1983

## VII Discusión

### VII.1. Diversidad

Los nueve loci utilizados en este estudio fueron altamente polimórficos; cinco loci (A7, A11, D6, D9, H11) presentaron en promedio menos de 25 alelos, mientras que A8, C5, D1 y H4 presentaron más de 30 alelos. Las razones que pueden explicar el alto nivel de polimorfismo son tasas de mutación ( $\mu$ ) altas, tamaño efectivo poblacional ( $N_e$ ) grande y deriva genética baja, lo cual resulta en la acumulación de un alto número de alelos (Balloux y Lugon-Moulin 2002).

Los valores de diversidad genética ( $H_o$ ) promedio de las larvas fueron cercanos al máximo teórico (i.e. 1) y resultaron más altos que los observados para las sardinas adultas estudiadas por Gutiérrez-Flores (2007) (Tabla XVI). Esta observación puede ser explicada a partir de la contribución al pool de larvas por varias cohortes de sardinas en etapa reproductiva, ya que la contribución gamética de una sola cohorte (i.e. una fracción de la población reproductiva) resultaría en la disminución de la variabilidad genética de la descendencia en relación al total de la población reproductiva (Hedgecock 1994).

Tabla XVI. Valores de heterocigosis observada ( $H_o$ ) en larvas y adultos de sardinas.

	Loci microsatelitales								
	A7	A8	A11	C5	D1	D6	D9	H4	H11
Larvas									
Sur California (1999)	0.87	0.97	0.85	0.88	1	0.81	0.86	0.94	0.92
Golfo California (2006)	0.82	0.95	0.81	0.86	0.90	0.71	0.79	0.95	0.87
Adultos									
Gutierrez (2003-2006)	0.75	0.89	0.77	0.80	0.92	0.78	0.80	ND	0.78

ND (Sin datos disponibles)

Los niveles de diversidad genética observados en larvas y sardinas adultas analizadas en estudios previos (Lecomte *et al.*, 2004; Gutiérrez, 2007) son muy distintos a los bajos niveles de variabilidad (casi nulos) observados por medio de aloenzimas (Hedgecock *et al.*, 1989). Los valores de diversidad genética tan contrastantes entre aloenzimas y microsatélites pueden ser explicados en parte porque las aloenzimas desempeñan un papel funcional y pueden estar sujetas a selección natural. En cambio, los microsatélites no están sujetos a presión selectiva y, en consecuencia, la deriva genética y la tasa de mutación determinan los niveles de polimorfismo. Cabe mencionar que los altos niveles de polimorfismo y heterocigosis observada en microsatélites y ADN mitocondrial sugieren que estos loci no parecen haber sufrido pérdidas significativas de diversidad como resultado de las fluctuaciones demográficas drásticas ocurridas a mediados del siglo pasado, o a las ocurridas históricamente (Baumgartner *et al.*, 1992). Por otro lado, si bien los microsatélites han sido considerados como marcadores selectivamente neutrales, estudios recientes en el genoma humano han revelado que algunos desórdenes neurológicos y varias enfermedades de tipo degenerativo se encuentran asociadas a variaciones en el número de motivos de repetición de microsatélites en regiones codificantes y reguladoras de genes estructurales (Mirkin, 2007; Pearson., *et al* 2005). Sin embargo, hasta la fecha no se tiene evidencia que indique cuál es el efecto que tienen los microsatélites sobre la sobrevivencia en peces y si existe alguna implicación sobre las estimaciones de genética poblacional.

## VII. 2. Diferenciación genética

Se observó diferenciación genética significativa entre regiones por medio del estadístico  $F_{ST}$  ( $F_{ST}=0.0026$   $p<0.01$ ). Adicionalmente, se observaron diferencias significativas entre dos pares de localidades de la costa sur de California y el Golfo de California ( $F_{ST}=0.009$  y  $0.007$   $p<0.01$  tomando en cuenta cinco loci) (Tabla XI). Sin embargo, no se detectaron diferencias genéticas tomando en cuenta cuatro loci por medio del AMOVA. Estos resultados opuestos pueden ser explicados a partir de múltiples puntos de vista y su interpretación debe de ser cuidadosa. Desde el punto de vista ecológico, Hedgecock (1982) considera que diferencias genéticas observadas en larvas de peces de diferentes localidades podrían deberse a la retención de las mismas en la zona donde fueron originadas; la magnitud de estas diferencias dependerá de cuánta mezcla de larvas se presente entre diferentes localidades a través del tiempo. Si la mezcla de larvas entre localidades es alta, entonces será imposible distinguir diferencias ya que las muestras serán genéticamente homogéneas. En este estudio, las larvas provinieron de campos de desove lejanos (más de 2000 km. de separación) y fueron colectadas en diferentes años, por lo que la mezcla de larvas puede ser descartada. Adicionalmente, no existe evidencia que indique migraciones de sardinas del Golfo hasta la costa de California y viceversa, por cual lo que las diferencias genéticas observadas entre regiones podrían estar reflejando la diferenciación entre grupos de desove producida por el aislamiento entre regiones debido a la distancia y la afinidad térmica del hábitat, incluyendo el de desove.

Por otra parte, las diferencias que resultaron del estadístico  $F_{ST}$  podrían explicarse a partir de un muestreo sesgado de las larvas que llevaría a rechazar la hipótesis nula de homogeneidad genética cuando esta es cierta por lo que se estaría cometiendo un error de

tipo I. Alternativamente, las muestras podrían estar sesgadas si ciertos genotipos fueron seleccionados de manera fortuita, pudiendo haber sobrerrepresentado alguna cohorte a expensas de otra, debido a que las sardinas maduras no desovan sincrónicamente, ni la tasa de supervivencia de las larvas es constante. Adicionalmente, las capturas se realizaron en un pequeño intervalo de tiempo en una pequeña área dentro del hábitat de desove, por lo cual los datos genéticos podrían provenir de un subconjunto no representativo del grupo de desove. Para saber si las muestras son representativas, se sugiere el muestreo sistemático de larvas asociadas a habitats y grupos de desove a través del tiempo y su comparación genética usando los mismos marcadores moleculares. De encontrarse los mismos patrones genéticos, entonces podrían definirse diferentes grupos de desove. Se debe tener en cuenta que las diferencias observadas también podrían deberse al efecto del agrupamiento artificial que se hizo de los individuos provenientes del Golfo de California debido a los tamaños de muestra bajos obtenidos para cada localidad. Este agrupamiento pudo aumentar la probabilidad de obtener una prueba estadísticamente significativa en el estadístico  $F_{ST}$  y en las pruebas de heterogeneidad genotípica y alélica al sobre-o sub-representar la frecuencia de algunos genotipos. Por lo tanto, es necesario un estudio genético de la descendencia proveniente de diferentes habitats de desove a través del tiempo.

Las estimaciones de diferenciación genética ( $F_{ST}$  y  $R_{ST}$ ) no fueron congruentes debido a que son sensibles a los distintos modelos de mutación que suponen. En el caso de la  $F_{ST}$ , se supone el modelo mutacional de alelos infinitos. Este modelo considera que cada mutación genera un alelo diferente a una tasa de mutación ( $\mu$ ). Las estimaciones bajo este supuesto no consideran la posibilidad de homoplasia alélica. La homoplasia indica convergencia o paralelismo evolutivo, es decir, que dos alelos del mismo tamaño (i.e. alelos

idénticos en estado) resulten ser idénticos por convergencia (i.e., dos alelos mutantes provenientes de alelos distintos convergen en un mismo tamaño, uno por borrado y otro por adición de un motivo de repetición) y no por co-ancestría. Por lo tanto, al estimar  $F_{ST}$  mediante tamaños alélicos se puede perder información sobre el proceso evolutivo de los microsatélites. Debido a que los microsatélites muestran altas tasas de mutación, aproximadamente de  $10^{-3}$  (Schlotterer, 2000), la probabilidad de identificar dos alelos idénticos disminuye y por lo tanto este estadístico resultará en valores poco precisos (Rousset, 1996). Por otra parte, el estadístico  $R_{ST}$ , que considera el modelo de mutación por pasos, es más afín al proceso evolutivo de los microsatélites. Sin embargo, la desventaja de este estadístico radica en el alto nivel de varianza asociada a los tamaños alélicos. Por ejemplo, si se observan alelos de todos tamaños (no congruentes con el patrón de pérdida o aumento de motivo) entonces la varianza alélica será muy alta y el estadístico  $R_{ST}$  (al basarse en la varianza de los tamaños alélicos) será menos preciso (Nauta y Weissing, 1996). En nivel estadístico, se ha observado que el desempeño de  $F_{ST}$  y  $R_{ST}$  depende del sesgo y de la varianza de los estimadores. De acuerdo con Hartl y Clark (1997), se ha sugerido que valores de  $F_{ST}$  entre 0-0.05 indican poca diferenciación genética, valores entre 0.05-0.15 indican diferenciación moderada, valores entre 0.15-0.25 alta diferenciación y valores por arriba de 0.25 marcada diferenciación genética. Balloux y Lugon-Moulin (2002) consideran que un valor de  $F_{ST}$  de 0.05 es razonablemente bajo y se puede estar cometiendo un error de tipo 1 al rechazar la hipótesis nula de panmixia cuando esta es verdadera. En el medio ambiente marino, donde las barreras geográficas no son evidentes, se ha observado que muchas especies de peces tienen alta capacidad de dispersión y una tasa alta de flujo genético, por lo que la señal de diferenciación entre poblaciones es débil.



Ward et al. (1994) revisó valores de  $F_{ST}$  en 57 especies de peces marinos y encontraron una mediana en el valor de  $F_{ST}=0.020$ . Los autores indican que esta observación es consistente con el alto potencial migratorio que poseen los peces de ambiente marino en comparación con especies de ambiente anádromo y dulceacuícola en los cuales el flujo genético es más restringido. Una forma de reducir la varianza de los estadísticos es a través del incremento en el número de individuos por población analizada, o en el número de loci evaluados (Gaggiotti et al., 1999; Balloux y Lugon-Moulin, 2002).

En resumen, se debe ser cauteloso respecto a la interpretación de los resultados de diferenciación obtenidos por medio de  $F_{ST}$  y pruebas heterogeneidad genotípica y alélica. Los valores obtenidos fueron someros pero significativos y probablemente estén asociados a una agrupación artificial de muestras. Sin embargo, también existe la posibilidad de que las diferencias genéticas observadas estén indicando diferenciación incipiente entre las sardinas del Golfo y de la Costa sur de California como resultado del aislamiento reproductivo debido a la afinidad térmica a la que se da el desove. Cabe mencionar que los valores de diferenciación obtenidos provienen de la comparación entre dos puntos en el tiempo 1999 y 2006, para la costa sur de California y Golfo de California, respectivamente. Dados estos resultados, se sugiere la realización de muestreos contemporáneos a través del tiempo con tamaños de muestra que sean representativos del número de alelos así como de las frecuencias alélicas y genotípicas dentro de cada grupo de desove. Estos muestreos son necesarios para confirmar o rechazar los resultados de diferenciación obtenidos en este estudio.

### **VII.3. Identificación de stocks: conservación y manejo**

Desde el punto de vista de la genética de la conservación, el objetivo es mantener la variabilidad genética dentro y entre poblaciones, pues esta variabilidad es considerada como la materia prima que dará lugar a las futuras adaptaciones de la especie en respuesta a cambios en el medio y de esa manera, poder continuar su proceso evolutivo (Awise, 1996). Desde la perspectiva pesquera, el objetivo se centra en el mantenimiento de los recursos genéticos dentro de las poblaciones sin perderlos como consecuencia de la explotación (Allendorf y Leary, 1988; Graves, 1996 Hindar *et al.*, 2004). Para esto es necesario caracterizar el hábitat, la composición poblacional a través del rango de distribución, los patrones de migración, el número efectivo de individuos migrantes de la especie de interés, así como tener estimaciones precisas del grado de diferenciación genética y del tamaño efectivo poblacional. El conocimiento de estos parámetros es crucial para la identificación de diferentes stocks (Allendorf *et al.*, 1997).

En este estudio, se encontraron indicios de diferenciación genética en muestras de larvas de sardina colectadas en la costa sur de California y la zona centro del Golfo de California, que deben ser consideradas en conjunto con evidencias biológicas (i.e. porcentaje de hembras maduras, máximo de abundancia de huevos y larvas) oceanográficas (i.e. temperatura superficial del mar, salinidad e índice de surgencia) que señalan la existencia de diferentes grupos de desove a través del rango de distribución. En este estudio, se estudiaron dos grupos: el primero desova en el presente frente a la costa sur de California, mientras que el segundo grupo desova en el interior del Golfo de California. Adicionalmente, sería de gran relevancia el estudio microquímico de estructuras calcáreas (i.e. otolitos) de larvas y juveniles como indicadores de áreas de procreación y retención. Es

importante mencionar que en este estudio las diferencias en nivel genético fueron muy ligeras, por lo que se podría llegar a cuestionar su significado en el establecimiento de diferentes grupos de sardinas. Para tratar de resolver esto se cuenta con evidencia derivada de máximos estacionales de captura, así como estudios de talla-edad. Sin embargo, el encontrar diferencias merísticas no implica que éstas se deban a un componente genético por lo que se necesitan estudios más detallados que estén directamente relacionados con la variabilidad fenotípica en respuesta al ambiente (i.e. genes involucrados en la expresión de proteínas responsables del crecimiento). Alternativamente, la identificación de grupos de sardinas que habitan diferentes habitats puede hacerse mediante estudios de genes involucrados en la expresión de proteínas indicadoras de estrés, así como en la expresión de anticuerpos. Quizás la contribución más importante de este estudio es la revaloración de los habitats de desove y su potencial para la identificación de diferentes grupos de sardinas. Los habitats de desove representan un punto clave en el ciclo reproductivo de sardinas ya que la descendencia será reclutada a la población. Si las diferencias genéticas que se observaron en las larvas son consistentes en el tiempo y las sardinas desovantes exhiben características particulares a nivel demográfico y morfológico, entonces esto podría implicar un evento de divergencia genética incipiente y la existencia de grupos de sardinas locales que estarían adaptándose a rangos de condiciones ambientales propias de cada zona.

#### **VII.4 Perspectivas**

En vista de los resultados de esta investigación, se hace necesario un estudio genético más detallado de las etapas larvarias en la costa sur de California y Golfo de California. Específicamente, es necesario corroborar si las diferencias genéticas encontradas son persistentes en el tiempo. Para este estudio se requiere de un muestreo representativo de larvas (entre 75 y 100 como tamaño mínimo de muestra) Adicionalmente, se debe aumentar el porcentaje de amplificaciones exitosas para cada locus para poder incluir más loci en los estadísticos de diferenciación. También se recomienda la evaluación genética en paralelo de los adultos reproductivos cercanos al hábitat de desove de interés. En los próximos estudios se debe tomar en cuenta el comportamiento reproductivo de la especie, así como el registro detallado de las variables oceanográficas asociadas a los habitats de desove. Adicionalmente, se deben incluir variables de tipo demográfico y morfométrico, así como datos de captura y ambientales, para aumentar la resolución en cuanto a la identificación de diferentes grupos de desove.

## VIII. Conclusiones

- Los marcadores moleculares empleados en este estudio resultaron ser altamente polimórficos. Los niveles de diversidad genética en larvas de sardina fueron muy altos y mayores a los de sardinas adultas obtenidos con los mismos marcadores moleculares.
- Las estimaciones de  $F_{ST}$  indicaron diferenciación genética ligera pero estadísticamente significativa entre regiones, específicamente entre el grupo A que proviene del Golfo de California con las estaciones Cal. 3 y Cal. 4 que corresponden a la costa sur de California. Las diferencias genéticas estimadas son someras y podrían ser el resultado de un muestreo no representativo de los grupos de desove hipotetizados. Sin embargo, los resultados obtenidos hacen patente la necesidad de la evaluación genética de una serie de tiempo de larvas en las áreas de desove del sur de California y golfo de California para confirmar la diferenciación genética observada en este estudio.
- Se recomienda la adopción del principio precautorio en el manejo de la sardina monterrey, considerando distintas a las de la costa del Pacífico de las del Golfo de California, debido a que el conjunto de evidencia a nivel morfométrico, habitats de desove, datos de captura, así como las estimaciones genéticas de este estudio indican diferencias.

## IX. Literatura citada

- Allendorf, F. W. y Leary, R.F. 1988. Conservation and distribution of genetic variation in a polytypic species, the Cutthroat Trout. *Conservation Biology* 2(2):170-184.
- Allendorf, F. W., Bayles, D., Bottom, D. L., Currens, K. P., Frissell, C. A., Hankin, D., Lichatowich, J. A. 1997. Prioritizing pacific salmon stocks for conservation. *Conservation Biology* 11:140-152.
- Avise, J. C. 1996. The scope of conservation genetics. En: Avise y Hamrick (eds.). *Conservation genetics*. Chapman & Hall, New York. 1-12 pp.
- Balloux, F. y Lugon-Moulin, N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* 11:155-165.
- Baumgartner, T. R., Soutar, A., Ferreira-Bartrina, V. 1992. Reconstruction of the history of Pacific sardine and northern anchovy populations over the past two millenia from sediments of the Santa Barbara Basin. *California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports* 33:24-40.
- Baumgartner, T. R., Loya, D., de la Campa, S., Curiel, C. 2000. Seasonal changes in the distribution and character of spawning habitat of the Pacific sardine (*Sardinops sagax caeruleus*) off Baja California during the year 2000. CICESE, Ensenada, México.
- Brown, 1957. *The physiology of fishes Vol I*. Academic Press, New York 447 pp.
- Butler, J.L., Granados, M. I., Barnes, J. T., Macewicz, B. J. 1996. Age composition, growth, and maturation of the Pacific sardine (*Sardinops sagax*) during 1994. *California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports* 37:152-159.
- Cascorbi, A. 2004. *Seafood watch and seafood report: sardines*. Vol 1. Monterrey Bay Aquarium. February 2004.
- Chávez, F. P., Ryan, J., Lluch-Cota, S. E., Ñiquen, M. 2003. From anchovies to sardines and back: multidecadal change in the Pacific Ocean. *Science* 299:217-221.
- Clark, F. N. 1945. Movements and abundance of the sardine as measured by tag returns. *California Fish Game Bulletin* 61:1-42.
- Clark, F. N. 1947. Analysis of populations of the Pacific sardine on the basis of vertebral counts. *Fish Bulletin* 65:26-35

- Emmett, R., Brodeur, R., Miller, T., Pool, S., Krutzikowsky, G., Bentley, P., McCrae, J. 2005. Pacific Sardine (*Sardinops sagax*) abundance, distribution, and ecological relationships in the Pacific Northwest. California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports 46:122-143.
- Excoffer, L.G. y Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online 1:47-50.
- Félix-Uraga, R., y Garcia-Franco, W. 2004. On the existence of Pacific Sardine groups off the west coast of Baja California and Southern California. California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports 45:146-151.
- Félix-Uraga, R., Quiñonez-Velazquez, C., Gómez-Muñoz, V. 2005. Pacific Sardine (*Sardinops Sagax*) Stock discrimination off the west coast of Baja California and Southern California using otolith morphometry. California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports 46:113-121.
- Fitch, J. E. 1969. Fossil records of certain schooling fishes of the California Current System. California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports 13:71-80.
- Funes-Rodríguez, R., Hinojosa-Medina, A., Avendaño-Ibarra, M. 2001. Spawning of small pelagic fishes in Bahía Magdalena, Baja California Sur, Mexico, at the beginning of the 1997–1998 El Niño Event. Estuarine, Coastal and Shelf Science 53:653-664.
- Gaggiotti, O. E. y Vetter, R.D. 1999. Effect of life history strategy, environmental variability, and overexploitation on the genetic diversity of pelagic fish populations. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 56:1376-1388.
- Goudet, J., Raymond, M., De Meëus, T. and Rousset, F. 1996. Testing differentiation in diploid populations. Genetics 144:1933-1940
- Graves, J. E. 1996. Conservation genetics of fishes in the pelagic realm. En: Avise y Hamrick (eds.). Conservation genetics. Chapman & Hall, New York. 335-366 pp.
- Guo, S. y Thompson, E. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. Biometric. 48: 361-372p.
- Gutiérrez-Flores, C. 2007. Estructura genética poblacional de la sardina del Pacífico Nororiental *Sardinops sagax ceruleus*. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Ensenada, B.C. 106 pp.

- Hamman, G., Nevarez-Martinez, M., Green-Ruiz, Y. 1998. Spawning habitat of the pacific sardine (*Sardinops sagax*) in the Gulf of California: Egg and larval distribution 1956-1957 and 1971-1991. California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports 39:169-179.
- Hartl, D. L y Clark, A.G. 1997. Principles of population genetics 3<sup>a</sup> edicion. Sinauer Associates 519 pp.
- Hedgecock, D. 1982. Genetic consequences of larval retention: theoretical and methodological aspects. En: Kennedy, V.S. (eds.). Estuarine comparisons. Academic Press 709 pp.
- Hedgecock, D. 1994. Does variance in reproductive success limit effective population sizes of marine organisms? En: Beaumont, A. (eds.). Genetics and evolution of aquatic organisms. Chapman & Hall. London 122-134 pp.
- Hedgecock, D., Hutchinson, E. S., Li, G., Sly, F. L., Nelson, K. 1989. Genetic and morphometric variation in the pacific sardine, *Sardinops sagax caerulea*: Comparisons and contrasts with historical data and with variability in the Northern Anchovy, *Engraulis mordax*. Fishery Bulletin 87:653-671.
- Hernández-Vázquez, S. 1994. Distribution of eggs and larvae from sardine and anchovy off California and Baja California, 1951-1989. California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports 35:94-107.
- Hindar, K., Tufto, J., Magnus Sættem, L., Balstad, T. 2004. Conservation of genetic variation in harvested salmon populations. Journal of Marine Science. 61:1389-1397.
- Jennings, S., Kaiser, M. J., Reynolds, J. D. 2001. Getting the data: stock identity and dynamics. En: Blackwell. Science editors. Marine Fisheries Ecology. Blackwell UK 384 pp.
- Kimura, M. 1968. Evolutionary rate at the molecular level. Nature 217:624-626.
- Kimura M, Ohta T (1978) Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 75:2868-2872.
- Lecomte, F., Grant, W. S., Dodson, J. J., Rodríguez Sanchez, R., Bowen, B.W. 2004. Living with uncertainty: genetic imprints of climate shifts in East Pacific anchovy (*Engraulis mordax*) and sardine (*Sardinops sagax*). Molecular Ecology 13:2169-2182.



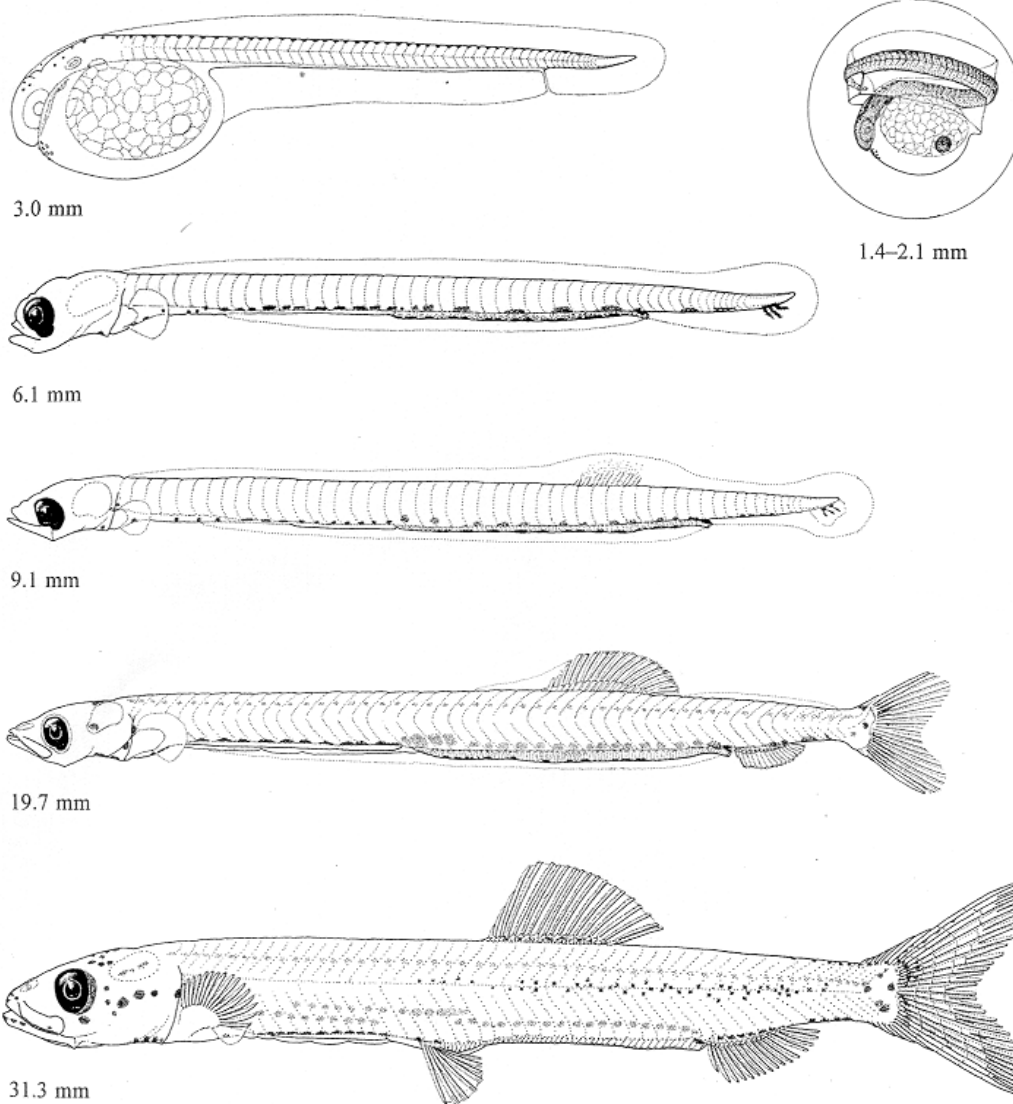
- Lluch-Belda, D., Crawford, R. J. M., Kawasaki, T., MacCall, A. D., Parrish, R. H., Schwartzlose, R. A., Smith, P. E. 1989. World-wide fluctuations of sardine and anchovy stocks: The regime problem. *South African Journal of Marine Science* 8:195-205.
- Lluch-Belda, D., Luch-Cota, D. B., Hernández-Vazquez, S., Salinas-Zavala, C. A., Schwartzlose, R. A. 1991. Sardine and anchovy spawning as related to temperature and upwelling in the California Current System. *California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports* 32:105-111.
- Lluch-Belda, D., Lluch-Cota, D., Lluch-Cota, S. 2003. Scales of interannual variability in the California Current System: associated physical mechanisms and likely ecological impacts. *California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports* 44: 76-85
- Marshal, N.B. 1976. *The life of fishes*. 5<sup>a</sup> edición. Universe Books 402 pp.
- Martínez-Aguilar, E. 1985. Influencia de la temperatura superficial del mar en la pesquería de la sardina Monterrey *Sardinops sagax caeruleus*, Girard (1854). en el Golfo de California. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada B.C. 71 pp.
- MacFarlane y Beamish, 2001 The re-occurrence of sardines off British Columbia characterizes the dynamic nature of regimes. *Progress in Oceanography* 49: 151-165
- McFarlane, G. A., Smith, P. E., Baumgartner, T. R., Hunter, J. R. 2002. Climate variability and Pacific sardine populations and fisheries. *American Fisheries Society Symposium*. 32:195-213.
- McFarlane, G., Schweigert, J., Macdougall, L., Hrabok, C. 2005. Distribution and biology of pacific sardines (*Sardinops sagax*) off British Columbia, Canada. *California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports* 46:144-160.
- Mirkin, S. M. 2007. Expandable DNA repeats and human disease. *Nature* 447:932-940.
- Moser, H. G. (eds). 1996. *The early stages of fishes in the California Current region*. California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Atlas No. 3, 1505 pp.
- Nauta, M.J., Weissing, F.J. 1996. Constraints on allelic size at microsatellite loci: implications for genetic differentiation. *Genetics* 143:1021-1032.

- Nevárez-Martínez, M. O. 1990. Producción de huevos de la sardina Monterrey *Sardinops sagax caeruleus* en el Golfo de California: una evaluación y crítica. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Ensenada, B.C. 144 pp.
- Nikolsky, G.V. 1963. The ecology of fishes. Academic Press 352 pp.
- Pereyra, R. T., Saillant, E., Pruett, C. L., Rexroad, C. E., Rocha-Olivares, A., Gold, J. R. 2004. Characterization of polymorphic microsatellites in the Pacific sardine *Sardinops sagax sagax* (Clupeidae). *Molecular Ecology Notes* 4:739-741.
- Pearson, C. E., Nichol-Edamura, K., Cleary, J. D. 2005. Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nature Review Genetics* 6:729-747.
- Planque, B., Bellier, E., Lazure, P. 2007. Modelling potential spawning habitat of sardine (*Sardina pilchardus*) and anchovy (*Engraulis encrasicolus*) in the Bay of Biscay. *Fisheries Oceanography* 16: 16-30
- Radovich, J. 1982. The collapse of the California sardine fishery what have we learned? *California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports* 23:56-78.
- Raymond, M. y Rousset, F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86:248-249
- Rodríguez-Sánchez, R. 2002. Ecología pesquera de la sardina monterrey (*Sardinops caeruleus*) en el sistema de la Corriente de California. Tesis de doctorado. Universidad de Colima, Colima, México, pp. 106.
- Rousset, F. 1996. Equilibrium values of measures of population subdivision for stepwise mutation processes. *Genetics* 142:1357-1362.
- Schlotterer, C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109:365-371.
- Simon, J. L. 2006. Resampling Stats Add-In for Excel. Ver. 3.0.
- Smith, P. E. 2005. A history of proposals for subpopulation structure in the Pacific sardine (*sardinops sagax*) population off Western North America. *California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports* 46:75-82.
- Sokolov, V. A. 1974. Investigaciones biológico pesqueras de los peces pelágicos del Golfo de California. *California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports* 17:92-96

- Soutar, A. y Isaacs, J. D. 1969. History of fish populations inferred from fish scales in anaerobic sediments off California. California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports. 13:63-70.
- Sprague, L. M. y Vrooman, A. M. 1962. A racial analysis of the Pacific sardine (*Sardinops caerulea*), based on studies of erythrocyte antigens. Annals of the New York Academy of Science. 97: 131-138p.
- Vrooman, A. M. 1964. Serologically differentiated subpopulations of the Pacific sardine, *Sardinops caerulea*. Journal of Fisheries Research Board Canada 21:691-701.
- Ward, R. D., Woodwark, M., Skibinski, D. O. (1994). A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. Journal of Fish Biology 44:213-232.
- Weir, B. S., y Cockerham, C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution 38:1358-1370.
- Whitehead, P. J., Nelson, G. J., Wongratana, T. 1985. FAO species catalogue. Clupeoid fishes of the world (Suborder Clupeoidei). An annotated and illustrated catalogue of the herrings, sardines, pilchards, sprats, anchovies and wolf-herrings. FAO Fisheries Synopsis:1-303.
- Wisner, R. L. 1961. Evidence of a Northward movement of the stocks of the Pacific Sardine based on the number of vertebrae. California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports 8:75-82
- Zhang, D. y Hewitt, G. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. Molecular Ecology 12: 563-584

## X. Anexos

### Anexo 1. Morfología de larvas de sardina



Etapas larvarias de *Sardinops sagax caeruleus*: Huevo, 1.4-2.1 mm; larva en saco vitelino, 3.0 mm; larva en preflexión, 6.1 mm; larva en flexión, 9.1 mm; larva en postflexión, 19.7 mm; transformación, 31.3 mm. Tomado de Moser *et al.*, 1996

## Anexo 2. Primers y condiciones de amplificación de loci microsatelitales

Secuencia, motivo de repetición y temperatura de alineamiento para los cebadores empleados en este estudio. Elaborados por (Pereyra *et al.*, 2004).

Nombre del cebador	Secuencia del cebador (5'-3')	Motivo de repetición	Temperatura de alineamiento °C
A7	CTCCTCACTCAGCCGCTAAGGA GGGTAACATTTTCGGCAAGTGCT	(GA)12	64
A8	GTGATACTCTCTGCCTTGGA GCACTTTGTCCTAGTAAATAGC	(CA)26	54
A11	GAGCTGGAAATCTGGTGATATTTAG CCTGTTTACAAGTTAGAGCATTC	(GATA)2GCTA(GATA)5GCTA(GATA)8	64
C5	GAACGCAGACATAAAAGGGTC GGGTATGTGGTGATTATCGTTC	(TC)5TT(TC)4	58
D1	GCTCTGGTCGGAGGCTCTATC GGTGTTCACGTGGGCTGGTA	(CA)29GG(CA)3	64
D6	CGGCTATTCTTAGACTAGGTG CCCCATCAGCAATGAATAAG	(TG)18	54
D9	GGTCATCTGCTTCAACAACAC GCAGCCTGTCTGAAACTCTG	(CA)9(GA)8	58
H4	CGAGTTTGTCCCACACCTGGAG CTCCAAGCACCGAGAGCATC	(GT)9	54
H11	CACGGCACGTTACGTTTCAG CCAGCGTGTGCATGAAATGATG	(TG)11TA(TG)6	64

Temperatura, tiempo y número de ciclos empleados para la amplificación por medio de PCR de nueve loci microsatelitales.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)	Número de ciclos
1	94	3:00	1
2	94	0:45	30
3	alineamiento	0:30	30
4	72	1:00	30
5	72	10:00	1
6	4	∞	FIN