



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



**DIVERGENCIA MORFOMÉTRICA Y GENÉTICA
DEL GÉNERO *Spondylus* L. (BIVALVIA:
SPONDYLIDAE) EN EL PACÍFICO MEXICANO
Y GOLFO DE CALIFORNIA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
EN
MANEJO DE RECURSOS MARINOS**

PRESENTA

JESÚS ARMANDO MEDINA ESPINOZA

LA PAZ, B.C.S., JUNIO DEL 2013



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 09 del mes de Mayo del 2013 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

**"DIVERGENCIA MORFOMÉTRICA Y GENÉTICA DEL GÉNERO *Spondylus* L.
(BIVALVIA: SPONDYLIDAE) EN EL PACÍFICO MEXICANO Y GOLFO DE CALIFORNIA"**

Presentada por el alumno:

MEDINA	ESPINOZA	JESÚS ARMANDO
Apellido paterno	materno	nombre(s)
Con registro:		
A	1	1
0	4	4
8		

Aspirante de:

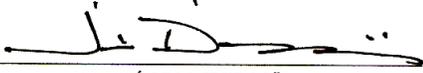
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Directores de Tesis


 DR. FRANCISCO JAVIER GARCÍA RODRÍGUEZ
 Director de Tesis

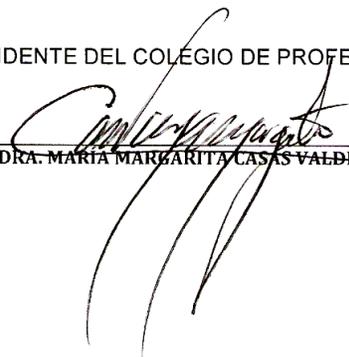

 DR. JOSÉ DE LA CRUZ AGÜERO


 DR. RICARDO PÉREZ ENRÍQUEZ


 M.C. MARCIAL TRINIDAD VILLALAJE FUERTE
 2º. Director de Tesis


 M.C. GUSTAVO DE LA CRUZ AGÜERO

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


 DRA. MARÍA MARGARITA CASAS VALDEZ



IPN
CICIMAR
DIRECCION



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 31 del mes Mayo del año 2013
el (la) que suscribe BM. JESÚS ARMANDO MEDINA ESPINOZA alumno(a) del
Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS
con número de registro A110448 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS
manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:
DR. FRANCISCO JAVIER GARCÍA RODRÍGUEZ Y MC. MARCIAL TRINIDAD VILLALEJO FUERTE
y cede los derechos del trabajo titulado:

"DIVERGENCIA MORFOMÉTRICA Y GENÉTICA DEL GÉNERO *Spondylus* L.
(BIBALVIA: SPONDYLIDAE) EN EL PACÍFICO MEXICANO Y GOLFO DE CALIFORNIA"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: armando.medina.e@gmail.com - fj_gr@yahoo.com - mvillale@ipn.mx
Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

BM. JESÚS ARMANDO MEDINA ESPINOZA

nombre y firma

... *“Aunque las hipótesis de especies son probablemente las hipótesis más probadas en las ciencias naturales, esto no implica, que los nombres asignados a cada una de ellas no sean hechos inmutables. Una vez asignado el nombre, este sigue siendo un hecho científico, siempre y cuando se siga corroborando con pruebas posteriores. Básicamente, los nombres de las especies son hipótesis evolutivas, de las relaciones genealógicas que pueden cambiar cuando vuelven a ser probadas con nuevos datos”* (De Carvalho et al., 2007).

..... *“Generalmente los taxónomos son reacios a describir una nueva especie basados únicamente sobre el estudio de un solo espécimen. Sin embargo, la escasez y / o singularidad del material a analizar pueden inducir al taxónomo a acuñar un nuevo nombre de la especie después de haber estudiado sólo una muestra, si una muestra es asignada con una especie incorrecta, la identificación errónea puede persistir en la literatura durante muchos años ”* (Ross, 1974).

...*“Cada naturalista que ha dirigido su atención al tema de la distribución geográfica de los animales y las plantas, debe haber estado interesado en los hechos singulares que presenta..... de los últimos años, ... una gran luz ha sido arrojada sobre el tema por las investigaciones geológicas , que han demostrado que el estado actual de la tierra, y los organismos que ahora habitan, no son más que la última etapa de una serie larga e ininterrumpida de cambios que han presentado y, por consiguiente, el tratar de explicar y dar cuenta de su actual condición sin ninguna referencia a los cambios (como con frecuencia se ha hecho) debe conducir a conclusiones muy imperfectas y erróneas ”*

Alfred Russel Wallace (1855)

A Itzia y Rodolfo

Fosforito el niño mas valiente que conozco, aún recuerdo todo el tiempo que te esperé, todo lo que caminé, todo lo que sudé por verte aquel día en donde por un instante el tiempo se detuvo para escucharte y verte sonreír por vez primera . El mundo a través de tus ojos parece ser tan fácil y maravilloso que me motivas todos los días a dar el máximo...

A Itzia, a quien con su paciencia y apoyo me ha ayudado a mantener los pies en el suelo, la que con su amor me ha permitido conocer esos momentos sobre los cuales vale la pena luchar por tus sueños y no dejarlos ir, gracias por darme ese motivo...

...gracias a ambos por darme la fuerza en los momentos mas difíciles, que fueron muchos... **Los amo**

AGRADECIMIENTOS

Al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del Instituto Politécnico Nacional (CICIMAR-IPN), por permitir el desarrollo y culminación del presente trabajo en sus instalaciones, así como darme la oportunidad de obtener el grado de Maestro en Ciencias.

A la Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional (SIP-IPN) por el apoyo otorgado a través de los proyectos “Diversidad molecular y variación morfológica de especies selectas del Pacífico mexicano” (clave 20110523), “Filogeografía de especies marinas selectas del Golfo de California y Pacífico mexicano” (clave 20120704), “Taxonomía y variabilidad genética de especies selectas de las costas de México” (clave 20131165), al proyecto SEMARNAT-CONACyT “caracterización reproductiva y del hábitat de la almeja burra *Spondylus calcifer* Carpenter 1857 entre regiones prioritarias del Golfo de California (clave 108230).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Programa Institucional de Formación de Investigadores del Instituto Politécnico Nacional (PIFI-IPN), por las becas otorgadas durante el desarrollo de la investigación de tesis.

A la comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas del Instituto Politécnico Nacional (COFFA-IPN) por el apoyo económico otorgado.

A mi director de tesis el Dr. Francisco Javier García Rodríguez, por la ayuda brindada en los análisis moleculares y de morfometría geométrica, así como en la aportación de todo el material, reactivos y muestras para los análisis efectuados, por las múltiples correcciones realizadas a las más de 5 versiones del escrito de tesis, además por la confianza depositada en mí, por su apoyo, paciencia, comentarios y enseñanzas que me han dejado hacia usted un profundo respeto y admiración, gracias por darme su amistad y consejos personales que me dieron esperanza en momentos difíciles, le agradezco esa seguridad que sembró en mí para culminar con éxito proyectos personales. Por ser un gran amigo...gracias.

Al Dr. José De La Cruz Agüero, antes que nada gracias por su amistad, consejos y puntadas que se dieron en horas interminables de charla y convivencia, agradezco el tiempo invertido al trabajo detectivesco aportado en la parte de nomenclatura y taxonomía de *Spondylus*, que aún y cuando no han sido de su agrado “los seres inferiores” (bivalvos, evolutivamente hablando) “demostró al mundo que podía crear obras de valor, y a los viejos peces gordos les causó un gran temor”, gracias además por dar su tiempo y espacio a la presente investigación.

A la comisión revisora del presente trabajo, al MC. Gustavo De La Cruz Agüero, por sus atinados comentarios y por poner ese ojo crítico en la redacción del documento, realmente agradezco el interés que mostró en el escrito, al MC. Marcial Trinidad Villalejo

Fuerte, agradezco las muestras proporcionadas de *Spondylus* (Agua Verde), así como el apoyo económico para material de laboratorio y congresos, además de sus comentarios en el escrito de tesis, al Dr. Ricardo Pérez Enríquez, gracias por sus observaciones y comentarios al desarrollo de la investigación, su experiencia en el campo ayudó a la estructura del trabajo escrito de tesis.

A mis padres y hermanos, Armando Medina y Bertha Espinoza, Julian, Isabel y Alejandro Medina quienes con su amor y sus buenos ejemplos me enseñaron que lo más importante es la familia, gracias por hacer de ella un lugar donde aprendí mucho y forjó en gran parte mi carácter, gracias por enseñarme a valorar lo que significa ser parte de ella.

A la familia López Cuadros, Esther, Liz y Yuri, por todo su apoyo, en las buenas, en las malas y en las peores, gracias por dejarme ser parte de su familia que ahora es la mía.

A la colección ictiológica y a mis compañeros, Víctor Cota, Adriana Martínez, Juan Ángel Payan, Francisco Javier Vergara, Víctor Tapia, Jorge Chollet, gracias por esos momentos de buena charla y convivencia, de ustedes fue de quien más aprendí (de la cocina), mi familia en CICIMAR, gracias por aceptarme en su círculo de ictiólogos, gracias por el cariño que le tienen a mi familia y en especial al apoyo brindado al cuidado de *fosforito*.

A mis compañeros de maestría, Mónica, Fabián, Andrés, Rocio, Julissa, Alfredo, Patsy, Fany, Mario, Pacorro, Carmen, Ehecatl, Nurens y Francisco, por sus comentarios al trabajo, y convivencia diaria que hicieron más amenas esas mañanas y clases en CICIMAR, así mismo a Marian Camacho y Josué Yee, gracias por el apoyo fuera de casa.

Al Dr. Adrián Munguía Vega, por su apoyo en la estancia de investigación en la Universidad de Arizona, y a los compañeros del laboratorio Ashwin Naidu, Alex Ochoa, Anastasia Klimova y Robert Fitak, por su amistad y ayuda durante este proceso, muy especialmente a la Dra. Melanie Culver, por su apoyo académico y permitirme realizar dicha estancia en su laboratorio, además de darme asilo político en su casa.

A las sociedades cooperativas de producción pesquera La Purísima, Leyes de Reforma, Luis Gomez Z., Exportadora de Sal S.A. de C.V., al Instituto Sudcaliforniano de la Juventud, y al Consejo Sudcaliforniano de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico brindado para estancia de investigación y congresos.

Finalmente gracias a todos los que han depositado en mí su confianza y han contribuido en mi formación académica y personal.

INDICE

LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABLAS	vi
GLOSARIO	viii
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. ANTECEDENTES	8
III. JUSTIFICACIÓN	13
IV. DISEÑO DE HIPÓTESIS	15
Planteamiento de premisas	15
Planteamiento de la hipótesis	15
V. OBJETIVOS	16
General	16
Particulares	16
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	17
Recolecta de muestras e identificación morfológica	17
Obtención de datos genéticos	20
i. Extracción de ADN	20
ii. Diseño de iniciadores	21
iii. Amplificación y edición de secuencias	22
Obtención de datos morfométricos	24
Análisis de Datos	27
i. Variabilidad inter-específica	27
ii. Variabilidad intra-específica	29
VII. RESULTADOS	32
Variabilidad Inter-específica	32
Variabilidad Intra-Específica de <i>Spondylus calcifer</i>	42
i. Datos moleculares	42

ii. Datos morfométricos.....	46
iii. Variación Intra-específica basado en la configuración de la “Charnela” ...	48
Variabilidad Intra-Específica <i>Spondylus princeps</i>	49
i. Datos moleculares.....	49
ii. Morfometría Geométrica.....	54
iii. Variación Intra-específica basado en la configuración de la “Charnela” ...	55
VIII. DISCUSIÓN	57
Aspectos taxonómicos.....	57
Aspectos Nomenclaturales en <i>Spondylus spp.</i> de la provincia Panámica.....	60
i. Clasificación taxonómica.	61
Aspectos filogenéticos.....	67
Análisis intraespecífico	69
i. <i>Spondylus calcifer</i>	69
Estructura poblacional.....	69
Demografía histórica.....	75
ii. <i>Spondylus princeps</i>	76
Estructura poblacional.....	76
Demografía histórica.	79
IX. CONCLUSIONES	81
X. RECOMENDACIONES	82
XI. LITERATURA CITADA	84
Anexo 1	110
Anexo 2	112
Anexo 3.....	114

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Valva izquierda de *Spondylus* representada con sus características estructurales, **Aa** Aurícula anterior, **Ap** Aurícula posterior, **U** Umbo, **Mb** Muesca bisal (sin muesca bisal para *Spondylus*), **E1** Espina primarias, **E2** Espinas secundarias, **E3** Espinas terciarias, **LC** Ligamento de la Charnela, **Me** Margen exterior, **Mi** Margen interior, **Cma** Cicatriz musculo aductor.....**4**
- Figura 2.** Distribución de las especies de *Spondylus* para la provincia Panámica: *Spondylus calcifer* (morado), *Spondylus princeps* y *Spondylus leucacanthus* (naranja). Especies reconocidas por autores como Skoglund y Mulliner (1996). **9**
- Figura 3.** Sitios de muestreo de *Spondylus* en el noroeste de México: 1) Laguna Ojo de Liebre, B.C.S.; 2) Las Cruces, B.C.S.; 3) Agua Verde, B.C.S.; 4) Isla Danzante, B.C.S.; 5) Santa Rosalía, B.C.S.; 6) Bahía de los Ángeles, B.C.; 7) Isla Ángel de la Guarda, B.C.; 8) La Cholla, Son.; 9) Isla Tiburón, Son.; 10) Acapulco, Gro. y 11) Puerto Ángel, Oax..... **20**
- Figura 4.** Ubicación de marcas naturales (Imagen izquierda superior), centro del ligamento de la charnela representada por el punto en color verde, (CLCh), interior izquierdo de la charnela en azul (ILCh) y el interior derecho de la charnela en rojo (IDCh). Figuras de lado derecho indican las referencias y el contorno de la forma representativa de la valva.....**25**
- Figura 5.** Configuración de las marcas empleadas para la comparación morfométrica de la valva izquierda de las especies de *Spondylus*..... **26**
- Figura 6.** Árbol de agrupación construido por medio del método *Neighbor Joining*, (*Bootstrap* 1000) y utilizando distancias genéticas basadas en el modelo de Kimura 2-parámetros. La anchura de los triángulos terminales refleja la variabilidad de todas las secuencias de cada clado y la altura el tamaño de muestra. Se pueden observar tres grupos genéticamente diferentes. *Spondylus sinensis* fue empleado como grupo externo..... **33**
- Figura 7.** Topología del árbol de *Neighbor-Joining* (Kimura 2 – parámetros) utilizando secuencias (Haplotipos) de la región del COI del ADNmt en ocho especies del género *Spondylus*, e incluyendo adicionalmente la especie *Etopera sanguinea* y la especie *Crassostrea gigas*, (grupo externo). Los valores de los nodos corresponden al soporte estadístico utilizado con 10,000 réplicas..... **36**
- Figura 8.** Topología del árbol de Máxima Parsimonia, utilizando secuencias (Haplotipos) de la región del COI del ADNmt en ocho especies del género *Spondylus*, e incluyendo la especie

Elopera sanguinea y la especie *Crassostrea gigas* (grupo externo). Los valores de los nodos corresponden al soporte estadístico utilizado con 10,000 réplicas..... **36**

Figura 9. Topología del árbol Bayesiano utilizando secuencias (Haplotipos) de la región COI del ADNmt, en ocho especies del género *Spondylus*, e incluyendo la especie *Elopera sanguinea* y la especie *Crassostrea gigas*, (grupos externos) utilizando el modelo y los parámetros arrojados por jModelTest (Tamura Nei93 + G + I, G= 0.61, I= 0.45). Los valores posteriores a los nodos corresponden al soporte probabilístico utilizado con 1,000,000 de generaciones, con una frecuencia de muestra de 100..... **37**

Figura 10. Gráfica del Análisis de Variables Canónicas correspondiente al contorno de la forma de la concha en las tres especies de *Spondylus*: *S.calcifer* (circulo), *S. princeps* (cruz) y *S. leucacanthus* (estrella).. **38**

Figura 11. Árbol sin enraizar que muestra la distancia morfométrica de los tres morfotipos estadísticamente separados. Lo anterior utilizando distancias cuadráticas de Mahalanobis (P<0.001). **39**

Figura 12. Gráfica del Análisis de Variables Canónicas correspondiente al contorno de la charnela de la concha en las tres especies de *Spondylus*: *S.calcifer* (círculos), *S. princeps* (cruz) y *S. leucacanthus* (estrella)..... **41**

Figura 13. Árbol no enraizado de las distancias cuadráticas de Mahalanobis de las marcas que delimitan el contorno de la charnela, mostrando a su vez tres morfotipos estadísticamente separados, P < 0.001..... **41**

Figura 14. Red de mínima expansión (*median joining*) realizada a partir de las similitudes existentes entre las secuencias del gen Citocromo Oxidasa sub-unidad I, de *Spondylus calcifer* provenientes de 8 localidades estudiadas del Golfo de California y Pacífico mexicano. Las porciones de color morado corresponden a Isla Tiburón, en amarillo a La Cholla, en verde a Ángel Norte, en negro a Bahía de los Ángeles, en azul a Santa Rosalía, en rojo a Agua Verde, en rosa a Las Cruces y en agua a Pacífico (Guerrero y Oaxaca). El tamaño de los círculos es proporcional a su frecuencia..... **44**

Figura 15. Distribuciones de las frecuencias las diferencias pareadas “*Mismatch Distributions*” del COI en *S. calcifer*: en donde la línea punteada representa las frecuencias esperadas calculadas basados en un modelos de expansión demográfica poblacional (Rogers, 1995), mientras que la línea continua representan las frecuencias de las distribuciones pareadas observadas. Las

frecuencias hacen referencia al número de iteraciones pareadas que muestran un “x” número de diferencias nucleotídicas..... **46**

Figura 16. Gráfica del AVC intra-específico en *Spondylus calcifer* utilizando la configuración total de la concha, Bahía de los Ángeles (círculo), Santa Rosalía (X), Agua verde (estrella), Las Cruces (cuadro) y Guerrero-Oaxaca (cruz)..... **47**

Figura 17. Gráfica del CVA-MANOVA intra-específico en *Spondylus calcifer* utilizando solo las marcas que conforman la configuración de la “Charnela”, Bahía de los Ángeles (círculo), Santa Rosalía (X), Agua verde (estrella), Las Cruces (cuadro) y Guerrero-Oaxaca (cruz). **48**

Figura 18. Red de mínima expansión (*median joining*) realizada a partir de las similitudes existentes entre las secuencias del gen COI, de *Spondylus princeps*, proveniente de cuatro sitios geográficos reconocidos, las porciones indican el número de haplotipos encontrados en Bahía de los Ángeles (morado), Santa Rosalía (negro), Agua Verde (azul) y Laguna Ojo de Liebre (rojo). El tamaño de los círculos es proporcional a su frecuencia. **51**

Figura 19. Las gráficas anteriores muestran las distribuciones pareadas “*Mismatch Distributions*” en las secuencias de COI, en *S. princeps* (localidades del Golfo de California y costa oeste de la Península de Baja California) en donde la línea punteada representa las frecuencias esperadas calculadas basados en un modelos de expansión demográfica poblacional (Rogers, 1995), mientras que la línea continua representan las frecuencias de las distribuciones pareadas observadas. De acuerdo con esto, las frecuencias hacen referencia al número de iteraciones pareadas que muestran un “x” número de diferencias nucleotídicas **53**

Figura 20. Gráfica del AVC intra-específico en *Spondylus princeps* , Santa Rosalía (círculo), Agua Verde (X) y Laguna Ojo de Liebre (estrella). **54**

Figura 21. Gráfica del AVC intra-específico en *Spondylus princeps* utilizando solo las marcas que conforman la configuración de la “Charnela”, Santa Rosalía (círculo), Agua Verde (X) y Laguna Ojo de Liebre (Estrella). **56**

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de la información requerida para la identificación de <i>Spondylus calcifer</i> , <i>Spondylus princeps</i> y <i>Spondylus leucacanthus</i> (tomado de Skoglund y Mulliner, 1996).....	18
Tabla 2. Localidades de muestreo y número de organismos utilizados por especie para el análisis genético (tejidos) y morfométrico (valvas). <i>Sc</i> = <i>Spondylus calcifer</i> ; <i>Sp</i> = <i>Spondylus princeps</i> ; <i>Sl</i> = <i>Spondylus leucacanthus</i>	19
Tabla 3. Porcentaje de divergencia genética dentro de cada especie.....	34
Tabla 4. Valores de divergencia genética (distancias genéticas * 100) encontrados en este estudio y obtenido de otros trabajos (<i>i.e.</i> Matsumoto, 2003). Debajo de la diagonal se encuentran las distancias genéticas y por encima de ésta los valores de sus desviaciones estándar.....	35
Tabla 5. Matriz de asignación correcta del género <i>Spondylus</i> , basada en las distancias cuadráticas de Mahalanobis de la forma de la concha.....	40
Tabla 6. Matriz de asignación correcta del género <i>Spondylus</i> , basada en las distancias cuadráticas de Mahalanobis de la forma de la concha.....	42
Tabla 7. Diversidad genética del gen COI en <i>S. calcifer</i> en los ocho sitios de recolecta. <i>nh</i> indica el número de haplotipos. Los valores de diversidad están acompañados de la desviación estándar.	43
Tabla 8. Comparaciones pareadas de los valores de Φ_{st} estimados a partir del COI, entre las localidades de <i>Spondylus calcifer</i> . Los valores sobre la diagonal representan el valor de Φ_{st} (Tamura-nei), mientras que los valores bajo la diagonal indican los niveles de significancia. En negritas (*) se indican las comparaciones estadísticamente significativas a un nivel de 0.05.	43
Tabla 9. Resultados de las pruebas de neutralidad “D” de Tajima y “F” de Fu, y los valores de las sumas de las desviaciones cuadradas del análisis de la distribución de las diferencias pareadas bajo el modelo de expansión repentino. En paréntesis se muestran los valores estadísticos de (<i>p</i>) para el análisis de las poblaciones de <i>Spondylus calcifer</i>	45
Tabla 10. Matriz de asignación correcta de la especie <i>Spondylus calcifer</i> , basada en las distancias cuadráticas de Mahalanobis del contorno de la concha.	47

Tabla 11. Matriz de asignación correcta de la especie <i>Spondylus calcifer</i> , basada en las distancias cuadráticas de Mahalanobis, utilizando la configuración que delimita únicamente el contorno de la “Charnela”.	49
Tabla 12. Diversidad genética del COI en <i>Spondylus princeps</i> en cuatro sitios de colecta. <i>nh</i> , indica el número de haplotipos. Los valores de diversidad están acompañados de la desviación estandar.	50
Tabla 13. Comparaciones pareadas de los valores de Φ_{st} estimados a partir del gen citocromo oxidasa sub-unidad I, entre localidades de <i>S. princeps</i> . Los valores sobre la diagonal representan el valor de Φ_{st} mientras que los mostrados debajo de la diagonal indican los niveles de significancia. En negritas se indican los valores de las comparaciones estadísticamente significativas a un nivel de significancia de 0.05.	51
Tabla 14. Resultados de las pruebas de neutralidad D de Tajima y F de Fu, y los valores de las sumas de las desviaciones cuadradas durante el análisis de “Mismatch” bajo el modelo de expansión repentino, en los paréntesis se muestran los valores estadísticos de (<i>p</i>) para el análisis de las poblaciones de <i>Spondylus princeps</i> .	52
Tabla 15. Matriz de asignación correcta de la especie <i>Spondylus princeps</i> , basada en las distancias cuadráticas de Mahalanobis, utilizando la configuración que delimita todo el contorno de la concha.	55
Tabla 16. Matriz de asignación correcta de la especie <i>Spondylus princeps</i> , basada en las distancias cuadráticas de Mahalanobis, utilizando la configuración que delimita únicamente el contorno de la charnela”.	56

GLOSARIO

A

ADNmt. ADN mitocondrial, Material genético contenido dentro de las mitocondrias, encargado de la codificación del RNA ribosómico, ARN transferencia y proteínas relacionadas con la respiración y generación de energía celular.

AMOVA. Análisis de Varianza Molecular. Método para explicar la diferenciación genética poblacional directamente de los datos moleculares y que permite probar hipótesis acerca de dicha diferenciación.

Árbol filogenético. Representación gráfica de las relaciones evolutivas.

Auctorum non. En latín significa: Usado para nombres mal aplicados o por error para un taxón, el cual es otro diferente al que está publicado por el autor como tal.

Aurículas. Extensión de la bisagra en forma de ala, característica de la superfamilia Pectinacea.

Análisis de Variables Canónicas. Método estadístico para encontrar los ejes sobre los cuales los grupos son mejor discriminados. Los ejes (variables canónicas) maximizan la varianza entre grupos, relativos a la varianza dentro del grupo.

C

Carácter taxonómico. Estructura observable de un organismo, utilizada para distinguirlo o discriminarlo de otros.

Características Gerónicas. Rasgos fenéticos que solamente pueden ser observados o característicos de etapas adultas.

Charnela. Región articulada que une las dos valvas de un molusco bivalvo.

COI. Subunidad I del gen del Citocromo oxidasa.

Convergencia evolutiva. Proceso mediante el cual dos estructuras similares han evolucionado independientemente a partir de estructuras ancestrales distintas y por procesos de desarrollo muy diferentes, resultando en estructuras o ambientes compartidos.

Criterio de Información Akaike. Medida de la bondad relativa de ajuste de un modelo estadístico. Ofrece una medida acerca de la pérdida de información cuando un determinado modelo se utiliza para describir la realidad de los datos.

Criterio de Información Bayesiano. Es un criterio para la selección de un modelo entre un set finito de modelos, basado en parte por funciones de máxima verosimilitud.

Cuello de botella. Evento en el cual una población o especie ha experimentado un drástico descenso en el número de miembros, dando como consecuencia una disminución en su diversidad genética.

D

Dispersalismo. Supone que las especies se originan en centros de origen, a partir de las cuales se dispersan al azar, atraviesan barreras preexistentes y colonizan nuevas áreas.

Distancias de Mahalanobis. Medida de distancia entre dos variables aleatorias en un espacio multidimensional.

Divergencia Evolutiva. Proceso de especiación en donde grupos relacionados con un ancestro común, se han separado evolutivamente, adaptándose casi completamente al nuevo ambiente.

E

Especie. Categoría taxonómica sujeta a varias definiciones. Fenética, conjunto de organismos que se parecen entre sí y que pueden distinguirse de otros conjuntos análogos. Biológica, grupo natural de individuos que pueden cruzarse entre sí, pero que están aislados reproductivamente de otros grupos afines.

Estructura Poblacional (genética).

Se refiere a cómo se encuentran constituidas las poblaciones en términos genéticos a través del tiempo y el espacio. Una disminución del flujo genético entre ellas propicia una diferencia en la conformación y frecuencias alélicas.

Evolución. Cambio de las frecuencias alélicas a través del tiempo, originando diversidad de formas, a partir de un antepasado común.

Evolución Molecular Neutral. Modelo que sugiere que la gran mayoría de los cambios evolutivos a nivel molecular son causados por deriva génica de mutaciones selectivamente neutros.

F

Filogenia. Historia y relación del desarrollo evolutivo de un grupo de organismos o taxa.

Fenotipo. Expresión del genotipo en función de una determinada presión ambiental dada.

Forma. Es toda aquella información geométrica de un objeto una vez que ha sido removida, la posición, escala y rotación.

F_{st}. Índice de fijación de Wright, que indica el grado de diferenciación genética de las poblaciones analizadas.

G

Gen. Secuencia ordenada de nucleótidos del ADN, que contiene información necesaria para la síntesis de proteínas.

Genética. Es el campo de la biología que busca comprender los procesos relacionados con la herencia biológica que se transmite de generación en generación.

Genotipo. Información genética que posee un organismo.

H

Haplotipo. En el caso del ADNmt es una secuencia de nucleótidos única, o un marcador genético heredado de uno de los progenitores, generalmente de la madre.

Homología. Relación que existe entre dos partes orgánicas diferentes cuando sus determinantes genéticos tienen el mismo origen evolutivo.

I

ICZN. Abreviatura en Ingles de: Código Internacional de Nomenclatura Zoológica.

Iniciador. Oligonucleótido de 10 a 20 pares de bases (pb). aproximadamente. Secuencia con la que se inicia la replicación *in vitro* del ADN mediante la utilización de la polimerasa (PCR).

L

Lambda de Wilks. Estadístico empleado en el análisis de datos multivariados que mide las desviaciones que se producen dentro de cada grupo, respecto a las desviaciones totales sin distinción de grupo.

Larva Planctotrófica. Larva que sobrevive alimentándose generalmente de plancton.

M

MANOVA. Análisis de varianza que cubre los casos donde hay más de una variable dependiente que no puede ser combinada de manera simple. Identifica si las variables independientes tienen efectos significativos en las variables dependientes.

Máxima Parsimonia. Método de generación de hipótesis filogenéticas, la cual se basa en encontrar la solución con el menor número de sucesos evolutivos en forma de caracteres derivados compartidos.

Máxima Verosimilitud. Método que busca el árbol filogenético que tenga la mayor probabilidad de explicar los datos observados utilizando como criterio un modelo de cambio.

Método Filogenético Bayesiano. Aproximación estadística utilizada para la inferencia de filogenias, en donde a partir de observaciones se calcula la probabilidad de que una hipótesis sea verdadera o modificar las probabilidades calculadas previamente.

Método de Superposición Procrustes. Una superposición de la forma que minimiza las distancias entre el arreglo de las configuraciones, eliminando el sesgo por posición, rotación y tamaño.

Mismatch. De idioma Inglés. Es una contabilización del número de diferencias en sitios específicos entre las secuencias de ADN específica de dos individuos en una muestra o población.

Mutación. Alteración o cambio en la información genética (genotipo) de un organismo. Puede o no producir un cambio en las características del fenotipo; regularmente se puede presentar al azar, se puede transmitir o heredar a la descendencia.

Morfometría Geométrica. Conjunto de métodos útiles para el análisis multifactorial, con el fin de evaluar la forma, a partir de coordenadas en un plano cartesiano.

N

nh. Numero de haplotipos encontrados

Nomenclatura. En taxonomía es el procedimiento para asignar los nombres científicos a los organismos de acuerdo con los códigos pertinentes.

Nucleótido. Unidades orgánicas monoméricas de ADN o ARN conformados por una base nitrogenada (purina o pirimidina), un grupo fosfato y un azúcar.

P

Panmixia. Es el sistema de apareamiento que se realiza al azar, es decir no existe una estructura de grupos o restricción de apareamiento en la población, todos los individuos son parejas potenciales de recombinación.

PCR. (Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en Inglés) Reacción en Cadena de la Polimerasa. Técnica aplicada en biología molecular, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN en particular. A partir de un fragmento original o molde.

Población. Conjunto local de individuos que pertenece a una misma especie, que tienen la posibilidad de reproducirse entre sí, en un tiempo y espacio dado.

Polimorfismo. Hace referencia a la existencia de múltiples alelos de un gen o locus en una población, es decir variación en la secuencia de un lugar determinado de ADN entre los individuos de una población. También puede ser referido a múltiples expresiones morfológicas.

Potencial genético. Se puede deducir como el límite de rasgos adaptativos, y no adaptativos (en su momento) contenidos en un genotipo.

R

Radiación adaptativa. Proceso que se desarrolla en un determinado número de especies para ocupar una determinada cantidad de nichos ecológicos, cuyos procesos para realizarlo pueden ser la mutación, deriva génica y selección natural.

Φ_{st} . Índice análogo al F_{st} , que mide así mismo la diferenciación entre las poblaciones, tomando en cuenta la diversidad nucleotídica y no la diversidad Haplótipica.

S

SSD. Idioma Inglés (sum of square deviations). Suma de desviaciones cuadradas entre dos distribuciones de frecuencias.

Subespecie. Nivel taxonómico inferior al de especies, y que se componen de individuos que, además de los caracteres propios de la misma, tienen en común otros caracteres morfológicos por los cuales se asemejan entre si y se distinguen de los de las demás subespecies.

T

Taxonomía. Rama o disciplina de la Biología que se encarga de ordenar y clasificar a los organismos.

U

Unidad Taxonómica Operacional. (OTU, "Operational Taxonomic Unit", por sus siglas en inglés), definida como aquellos individuos o poblaciones que son el objeto del estudio y pueden ser representados en un dendograma.

V

Vicarianza. Proceso de fragmentación de la distribución de las especies ancestrales, por el surgimiento de barreras geológicas o de otro tipo, luego de lo cual las especies pueden evolucionar separadamente.

RESUMEN

En México, se distribuyen tres especies reconocidas del género *Spondylus* (Bivalvia: Spondylidae): *Spondylus calcifer*, *S. princeps* y *S. leucacanthus*; sin embargo las variaciones morfológicas intra e inter-específicas y el traslape de caracteres empleados para su identificación, aún generan dudas respecto a la robustez del número de especies existentes. El género *Spondylus* ha jugado un papel económico, político y cultural importante en comunidades costeras del Pacífico Oriental Tropical; particularmente *S. calcifer* cuyo músculo ha sido altamente valorado. Actualmente, debido a la disminución del tamaño poblacional, esta especie se encuentra enlistada bajo la categoría de Protección Especial (NOM-059) en México. El objetivo del presente trabajo fue estimar el grado de diferenciación morfométrica y genética de las especies del género *Spondylus* distribuidas en el Golfo de California y Pacífico mexicano con la intención de realizar su revisión taxonómica y variación intra-específica. Se revisaron 286 valvas izquierdas y 383 muestras de tejido muscular para las tres especies. Se realizaron análisis de morfometría geométrica basados en las configuraciones de la valva y charnela y análisis moleculares basados en secuencias de la Subunidad I del gen Citocromo Oxidasa (COI) del ADNmt, para revisar las variaciones inter e intra-específicas. Los análisis morfométricos basados en variables canónicas soportaron estadísticamente la existencia de tres morfotipos, en donde la VC1 (79.8%) discriminó a *S. calcifer* del resto (Λ wilks=0.01, $P<0.001$), y la VC2 (20.2%) separó el morfotipo *S. princeps* de *S. leucacanthus* (Λ Wilks=0.1, $P<0.001$). Por su parte, los datos genéticos soportaron también la existencia de tres entidades taxonómicas asociadas a las tres especies reconocidas, ya que los niveles de divergencia intra-específico (entre el 0.1% y 0.4%) presentaron ordenes de magnitudes muy por debajo de las divergencias encontradas entre especies (del 3.7% al 16.9%). Estos valores de diferenciación inter-específica son congruentes con los reportados para otras especies del mismo género. Un análisis de diferenciación poblacional realizado en *S. calcifer* y *S. princeps* no detectó una estructura genética clara en ninguna de las dos especies ($\Phi_{st} = 0.00621$, $P = 0.139$, para *S. calcifer*, y $\Phi_{st}=0.027$, $P= 0.041$ para *S. princeps*); sin embargo, estudios con marcadores moleculares más polimórficos podrían arrojar mayor información sobre esta estructura. Se reconoce la existencia taxonómica y validez nomenclatural de las tres especies del género *Spondylus* presentes en el Pacífico mexicano y Golfo de California.

Palabras clave: *Spondylus*, ADNmt, COI, morfometría geométrica, taxonomía, filogenia, método Bayesiano.

ABSTRACT

In Mexico, three recognized species of the genus *Spondylus* (Bivalvia: Spondylidae) *Spondylus calcifer*, *S. princeps*, and *S. leucacanthus* are distributed, however, the morphological variations at intra- and inter-specific levels and the overlapping of characters used for identification still raise doubts about the robustness of the number of the existing species. The genus *Spondylus* has played an important economic, political, and cultural role in tropical Pacific coastal communities, particularly *S. calcifer*, whose abductor muscle is highly valued. Currently, due to the decrease in population size, this species is now listed under the category of Special Protection (NOM-059) in Mexico. The aim of this study was to estimate the degree of morphometric and genetic differentiation of the species in genus *Spondylus*, distributed in the Gulf of California and the Mexican Pacific to review its taxonomic status and intra-specific variation. A total of 286 left valves and 383 samples of muscle tissue of the three species were analyzed. Geometric morphometrics analyses based on the configurations of the valve and hinge were made, and molecular analyses of the mtDNA COI gene sequences were performed to review morphometric and genetic variations within and between-groups respectively. The canonical variable analysis from morphometric data, statistically supported three morphotypes, where CV1 (79.8%) discriminated *S. calcifer* against the rests of the species (Λ Wilks = 0.01, $P < 0.001$) and CV2 (20.2%) separated the morphotype *S. princeps* from *S. leucacanthus* (Wilks Λ = 0.1, $P < 0.001$). Moreover, genetic data also supported the existence of three taxa associated with the three recognized species, since the levels of intra-specific divergence (between 0.1% and 0.4%) presented orders of magnitude well below the differences found among species (from 3.7% to 16.9%). These values of inter-specific differentiation are consistent with those reported for other species of the same genus. An analysis of population differentiation performed in *S. calcifer* and *S. princeps* (for samples having different localities) did not detect any genetic structure for neither of the species (Φ_{st} = 0.00621, P = 0.139 for *S. calcifer*, and Φ_{st} = 0.027, P = 0.041 for *S. princeps*); nevertheless, molecular studies with more polymorphic markers could bring more information on this structure. The taxonomic and nomenclatural validity of the three species of the genus *Spondylus* present in the Mexican Pacific and Gulf of California are recognized.

Keywords: *Spondylus*, mtDNA, COI, geometric morphometrics, taxonomy, phylogeny, Bayesian method.

I. INTRODUCCIÓN

Los moluscos, integrantes de la clase Bivalvia Linnaeus, 1758, son conocidos por poseer una concha integrada por dos valvas calcáreas unidas por una bisagra (denominada charnela) en la parte dorsal; que son conectadas por un ligamento elástico parcialmente calcificado y uno o dos músculos abductores encargados del sistema de cierre-apertura de las valvas (Keen, 1971; Giribet y Wheeler, 2002).

Dentro de la clase de los bivalvos se encuentra la subclase Pteriomorphia, la cual integra individuos que se caracterizan principalmente por tener conchas de formas muy variadas, por ser principalmente sedentarios, con márgenes del manto de forma libre y que pueden llegar a presentar fijación o cementación (Keen, 1971). Algunas de las familias ubicadas dentro de esta subclase tienen gran importancia económica como las familias Ostreidae (ostras), Pectinidae (almejas), Mytilidae (mejillones), Pinnidae (Callos de hacha) y Spondylidae (escarlopas).

La familia Spondylidae (Gray, 1826), se encuentra representada por un solo género, *Spondylus* (Linnaeus, 1758) que integra individuos conocidos comúnmente como “escarlopas” u “ostras espinosas” y comprende cerca de 76 especies alrededor del mundo (Lamprell, 2006). La familia Spondylidae presenta una concha de tamaño mediano a grande, fuertemente esculpida con costillas radiales y espinas, aurículas pequeñas y sin muesca bisal (extensiones de la bisagra en forma de ala, característico de la superfamilia Pectinacea) (Figura 1) (Coan y Valentich-Scott, 2012). La concha se adhiere al sustrato cerca del umbo de la valva derecha la cual es convexa. Los organismos poseen una concha con una cicatriz grande asociada al músculo aductor. Son monomiarios (un solo musculo aductor), presentan una gran área cardinal de la bisagra en la valva derecha, bisagras con dos grandes dientes en cada valva, un ligamento profundo en ranura triangular y en adultos muestran dos crestas cruales adyacentes al ligamento (Keen, 1971). Los espondílidos se han relacionado con los pectínidos por compartir la característica de ojos complejos alrededor del manto y un sistema nervioso relativamente desarrollado (Mackensen *et al.*, 2011).

Los bivalvos son organismos que han invadido una gran variedad de ambientes marinos. Su habilidad para dispersarse ha tenido consecuencias ecológicas y evolutivas, favoreciendo “la divergencia simultánea de numerosas líneas con ancestría común, a la formación de grupos con características a otras zonas adaptativas diferentes” (Simpson, 1953). Como resultado de su potencial genético y adaptativo, ha surgido una alta variabilidad de expresiones morfológicas relacionadas con su amplio rango de distribución y con eventos de convergencias y divergencias evolutivas. Esa amplia diversidad fenotípica existente, asociada a la incertidumbre de los procesos causales, ha dificultado la determinación taxonómica y el soporte de las propuestas filogenéticas en el grupo (Johnson *et al.*, 2001).

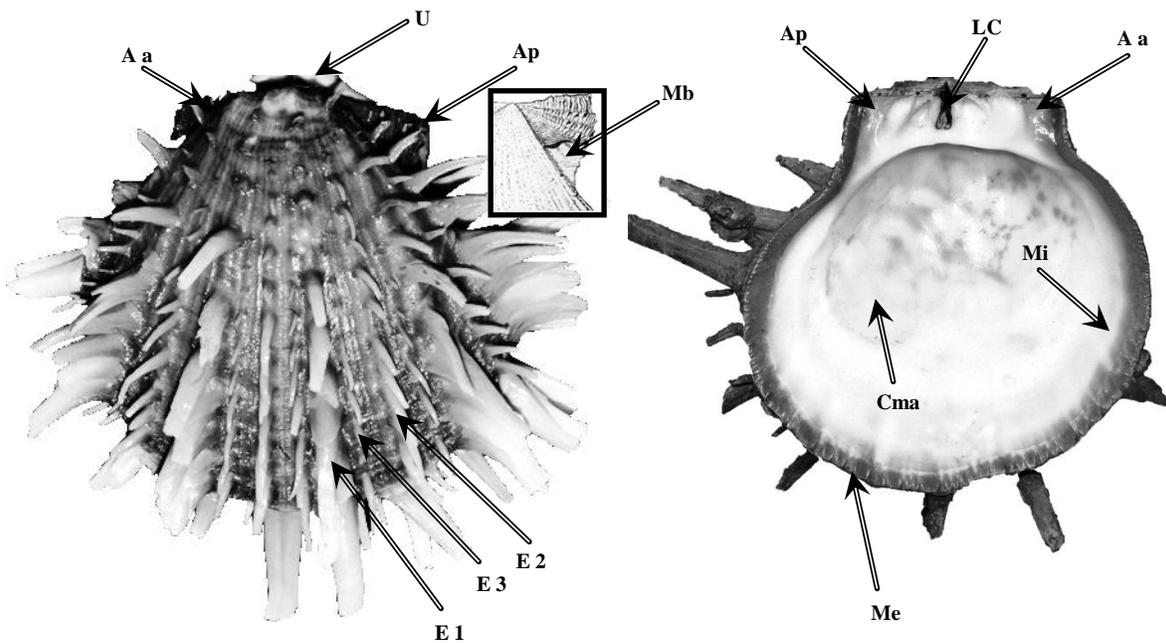


Figura 1. Valva izquierda de *Spondylus* representada con sus características estructurales, **Aa** Aurícula anterior, **Ap** Aurícula posterior, **U** Umbo, **Mb** Muesca bisal (sin muesca bisal para *Spondylus*), **E1** Espina primarias, **E2** Espinas secundarias, **E3** Espinas terciarias, **LC** Ligamento de la Charnela, **Me** Margen exterior, **Mi** Margen interior, **Cma** Cicatriz musculo aductor.

Los integrantes del grupo de los Bivalvos han sido reclasificados en varias ocasiones en casi todos los niveles (*i.e.*, género, subgénero, especie, subespecie e incluso variedades), lo cual ha derivado en confusiones filogenéticas y problemas nomenclaturales (Therriault *et al.*, 2004; Coan y Valentich-Scott, 2008).

La taxonomía de los bivalvos marinos debe ser revisada debido a que se piensa que pueden existir varias especies aún no descritas y que los criterios empleados para la definición e identificación de especies son imprecisos. Por tal motivo, se requiere realizar una revisión más profunda empleando procedimientos metodológicos alternos a los actualmente utilizados que permitan un mejor soporte de las propuestas taxonómicas y filogenéticas.

En particular, las especies del género *Spondylus* distribuidas en la provincia Panámica han presentado controversias taxonómicas. Específicamente, para el Noroeste de México durante algún tiempo se reconoció la existencia de dos especies (Keen, 1971), pero posteriormente fue sugerida por Skoglund y Mulliner (1996) una especie más. Considerando el área que comprende las islas Revillagigedo, recientemente la riqueza específica se incrementó a cuatro si se toma en cuenta el trabajo de Coan y Valentich-Scott (2012), en donde se propone como una cuarta especie a *S. gloriosus*. Estos esfuerzos requieren del soporte de estrategias alternas a las revisiones morfológicas tradicionales, tales como el empleo de técnicas que permitan cuantificar las diferencias morfológicas de la concha y que aporten datos sobre los niveles de divergencia genética entre las especies; las cuales aún no han sido implementadas.

El presente trabajo se enfoca específicamente al estudio del género *Spondylus* distribuido en el Pacífico mexicano, incluyendo el Golfo de California, con la intención de evaluar las variaciones morfométricas, y genéticas y la de aportar argumentos sólidos para definir su situación taxonómica. En este estudio se emplean marcadores moleculares basados en secuencias de ADN mitocondrial y variables morfométricas basadas en la forma de la concha.

Debido a que la variación en la forma es un fenómeno multivariado y la morfología de los individuos es multidimensional, la morfometría geométrica ha permitido

medir la variación en la forma y por tal razón ha permitido ser aplicada a la resolución de problemas taxonómicos (Zelditch *et al.*, 2004).

La técnica de morfometría geométrica consiste en la detección y registro de marcas corporales homologas (*i. e.* hitos, cotas corporales, *Landmarks*) empleando coordenadas (X, Y) que permiten representar de manera numérica la forma del cuerpo (configuración). Estas aproximaciones permiten cuantificar las diferencias entre entidades taxonómicas con base en la intensidad y dirección del cambio de forma. También permiten observar de manera gráfica las diferencias a partir de una gradilla (Bookstein, 1989), la cual representa la deformación entre las configuraciones y es basada en interpolaciones de los cambios de forma entre las marcas. La aplicación más común en trabajos taxonómicos ha sido para discriminar grupos y cuantificar las diferencias entre éstos (*i.e.* Rohlf, 1998; Adams *et al.*, 2004; Zelditch *et al.*, 2004).

La taxonomía basada en análisis moleculares ha sido ampliamente utilizada para la determinación e identificación de especies, haciendo que el término de “Taxonomía molecular” sea cada vez más frecuente. En particular, el ADN mitocondrial (ADNmt) ha permitido aportar nueva información sobre la historia de las especies y sobre procesos evolutivos (Matsumoto, 2003; Lee, 2004; Vogler y Monaghan, 2006). Su naturaleza no recombinante permite reconstruir la taxonomía e historia filogenética de las especies o poblaciones (Shaklee y Bentzen, 1998; Díaz-Ferguson *et al.*, 2010; Alejandrino *et al.*, 2011; Matsumoto, 2003).

La taxonomía molecular se sustenta sobre la idea de que las divergencias de las secuencias de ADNmt son mucho más grande entre especies que al interior de cada especie, lo cual resulta en genealogías que generalmente capturan las discontinuidades biológicas reconocidas por los taxónomos como especies (Hebert *et al.*, 2004).

El estudio del ADNmt muestra una perspectiva evolutiva en estudios de genética de poblaciones y filogeografía, por lo que al estudiar una variedad de poblaciones de una misma especie, se pueden generar árboles filogeográficos, que permiten

inferir patrones de demografía histórica y de flujo genético entre un taxón en particular (Avice *et al.*, 1987; Palumbi, 1994).

Los estudios de filogeografía tratan de comprender cómo los acontecimientos históricos han ayudado a dar forma a la dispersión geográfica actual de los genes, poblaciones y especies. Lo anterior debido a que los procesos actuales de flujo de genes pueden tener poca semejanza con las conexiones históricas entre poblaciones, pero ambos son relevantes para las distribuciones actuales de las especies y genes (Avice *et al.*, 1987; Avice, 2000).

II. ANTECEDENTES

El género *Spondylus* presenta una incertidumbre taxonómica respecto al número de especies reconocidas. Actualmente, se ubica dentro de la familia Spondylidae, aunque desde el tratado sobre paleontología de invertebrados realizado por Cox *et al.*, (1969-1971), se han propuesto diversas clasificaciones basadas en variaciones de un solo carácter (Atkins, 1936-1938; Stasek, 1963; Taylor *et al.*, 1969; Yonge, 1978), lo cual dificulta el consenso sobre el estado taxonómico del género. Aún a nivel de familia, en Spondylidae existen algunas discrepancias, ya que su ubicación taxonómica ha sido poco consistente, de este modo se le ha ubicado dentro de la superfamilia Ostreoidea (Turgeon *et al.*, 1998), y recientemente dentro de la superfamilia Pectinoidea (Matsumoto, 2003).

En la costa oeste de América el género *Spondylus* se distribuye principalmente en el Pacífico Oriental Tropical (POT), desde el Golfo de California, México, hasta Ecuador; sin embargo se ha reportado que el género puede colonizar las costas de Perú (Puerto Lima) como resultado de eventos Niño, cuando las aguas cálidas imperan en el lugar (Keen, 1971; Sandweiss, 1992; Poutiers, 1995) (Figura 2). Keen (1971), reconoce que en el Pacífico mexicano se distribuyen dos especies (*Spondylus calcifer* y *S. princeps*) y dos subespecies (*S.princeps princeps* y *S.princeps unicolor*) para esta última. Sin embargo, Skoglund y Mulliner (1996) sugieren que *S. princeps unicolor* deba ser considerada como una especie distinta de *S. princeps* y proponen que sea denominada *S. leucacanthus*, reconociéndola como una especie válida.

Según Skoglund y Mulliner (1996), las tres especies difieren solo por características gerónticas tales como peso y tamaño de la concha, y número de dientes en posición vertical. *Spondylus leucacanthus* posee dientes blancos en la bisagra, una cicatriz profunda en el músculo aductor, con callo pronunciado, ausencia de costillas radiales largas y estrechas, frecuentemente espinas largas y habita zonas más profundas (~25-90m) que las otras especies. *Spondylus princeps* posee dientes de color café en las bisagras de la valva izquierda, una cicatriz en la

base del músculo aductor, sin callo sobre el lado ventral, una banda ancha en el borde interno, espinas espatuladas cortas (normalmente no blancas), color exterior púrpura o naranja, y se encuentra regularmente a profundidades entre los 3 y 28 m, aunque en ocasiones se puede localizar a más de 32 m. (Skoglund y Mulliner, 1996). Por último, *S. calcifer*, es la especie de mayor talla, habita en la zona intermareal y submareal, tiene los dientes de las bisagras en color café (marrón), una cicatriz plana en el músculo aductor, y una banda ancha interior. El color exterior comúnmente es púrpura, naranja o una combinación de ambos. Esto es usualmente atribuido en mayor proporción a la valva derecha. Los especímenes jóvenes pueden tener espinas espatuladas cortas lo cual es usualmente extraño en ejemplares adultos (Skoglund y Mulliner, 1996).

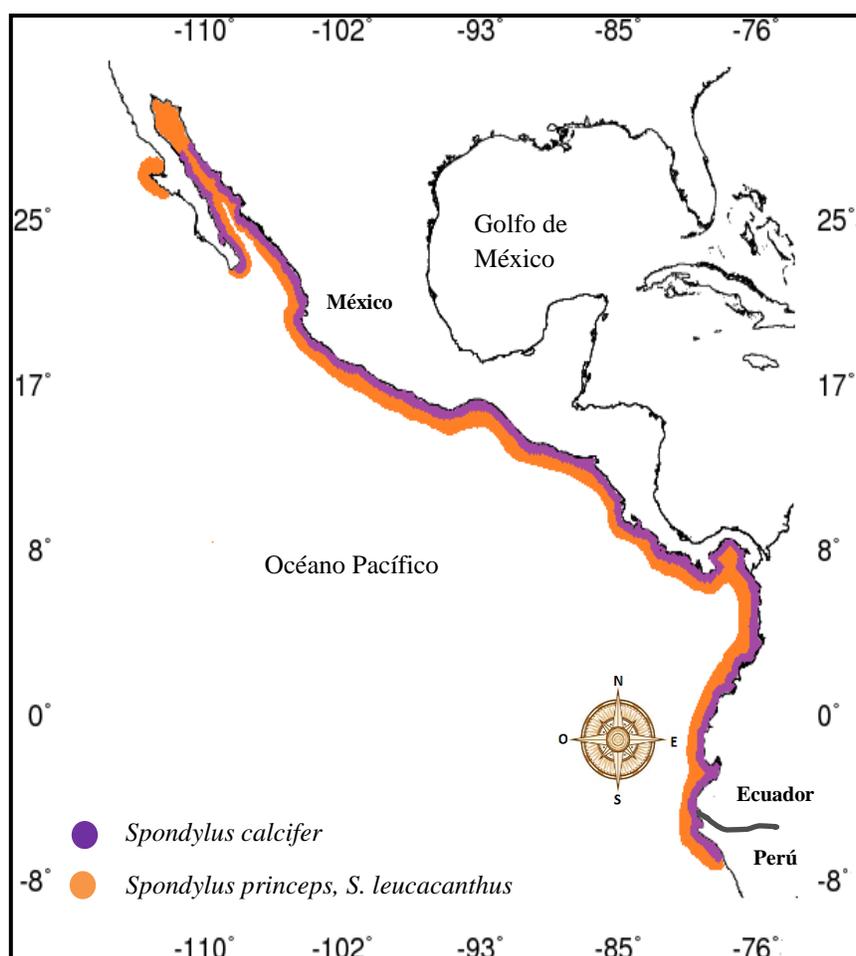


Figura 2. Distribución de las especies de *Spondylus* para la provincia Panámica: *Spondylus calcifer* (morado), *Spondylus princeps* y *Spondylus leucacanthus* (naranja). Especies reconocidas por autores como Skoglund y Mulliner (1996).

A pesar de las características puntuales que Skoglund y Mulliner (1996) describen de cada especie, las diferencias entre éstas a partir de tales criterios no son claras. *Spondylus princeps* y *S. calcifer* son difíciles de distinguir, sobre todo en etapas juveniles, ya que son similares en color y tienen espinas bastantes conspicuas (Holguín-Quiñonez y González-Pedraza, 1994; Skoglund y Mulliner, 1996; Cudney-Bueno, 2007). Villalejo-Fuerte y Muñetón-Gómez (2002) sostienen que ambas especies pueden distinguirse por el tamaño y coloración del riñón. Según sus observaciones, en *S. princeps* y *S. leucacanthus* el riñón es de color negro y más grande que el de *S. calcifer* cuya coloración es café claro.

Recientemente, Coan y Valentich (2012) proponen cambios nomenclaturales a las especies reconocidas por Skoglund y Mulliner (1996) y reconocen una cuarta especie adicional para el POT (*S. gloriosus* Dall, Bartsch y Rehder, 1938) distribuida en las Islas Revillagigedo. Según estos autores éstas cuatro especies pueden ser identificadas a partir de crenulaciones ubicadas en los márgenes interiores de las conchas.

La alta similitud morfológica en las especies del género *Spondylus* permite plantear la duda si las diferencias podrían reflejar variantes intra-específicas o la existencia de caracteres diagnósticos de cada especie. Existen varios ejemplos en la literatura (Stanley, 1970; Anderson y Roopnarine, 2005; Alejandrino *et al.*, 2011) que indican que en bivalvos la morfología de la concha se encuentra influenciada por efectos ambientales y genéticos, y en algunos estudios realizados en otros moluscos como gasterópodos, señalan que un mismo genotipo puede dar lugar a una gran diversidad de formas y colores como resultados de un alto polimorfismo en donde el genotipo se expresa de formas distintas a distintos ambientes (Gould *et al.*, 1974; Woodruff y Gould, 1980, Lam y Calow, 1988; Sánchez *et al.*, 2011).

En general, las especies del género *Spondylus*, y en particular las del POT, han sido poco estudiadas, principalmente respecto a su taxonomía y aun previo al presente estudio, ningún análisis taxonómico basado en datos genéticos o en la cuantificación de las diferencias en la forma de la concha había sido realizado. Los trabajos existentes contemplan principalmente descripciones anatómicas y

morfológicas (Yonge, 1973; Dakin, 1928a, b, Muñetón-Gómez *et al.*, 2001; Villalejo-Fuerte y Muñetón-Gómez, 2002; Villalejo-Fuerte *et al.*, 2005).

Tomando en cuenta lo anterior, se requiere de una propuesta más sólida para adoptar una postura clara del estado taxonómico de este género. La utilización de métodos alternos a los empleados a la fecha, tales como los basados en medidas detalladas y objetivas de la morfología y en datos genéticos resultan de gran utilidad (Zelditch *et al.*, 2004; Lee, 2004). Las técnicas morfométricas permiten cuantificar las diferencias existentes en la forma del cuerpo, lo cual resulta importante debido a que muchos procesos biológicos tales como enfermedades, desarrollo ontogenético, adaptación a factores geográficos locales, o divergencias debido a procesos evolutivos producen cambios en la forma de los individuos (Zelditch *et al.*, 2004).

Particularmente, la aplicación de técnicas de morfometría geométrica ha permitido reconocer variaciones morfológicas difíciles de detectar mediante otras aproximaciones (Márquez *et al.*, 2010). Estas técnicas también han permitido visualizar gráficamente los cambios en la forma ocurridos entre especies y entre poblaciones (Márquez *et al.*, 2010; Pereira y Silva, 2011; Vergara-Solana, 2012). Por otra parte, el empleo de datos genéticos resulta primordial para determinar los niveles de divergencia y de relaciones filogenéticas. Por tal motivo, el uso de secuencias de ADN, principalmente ADN mitocondrial, correspondientes a genes tales como el 16SrRNA y la sub-unidad I del Citocromo Oxidasa (COI), ha sido ampliamente utilizados en estudios taxonómicos y de sistemática (Matsumoto, 2003; Campbell *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2009).

El ADN mitocondrial (ADNmt) se ha utilizado ampliamente en estudios filogenéticos (Matsumoto, 2003, Chen *et al.*, 2009) y poblacionales (García-Rodríguez y Pérez-Enríquez, 2006; Medina-Espinoza, 2010). Sus ventajas para fines taxonómicos y filogenéticos resultan de la presencia de una tasa de sustitución nucleotídica de 5 a 10 veces mayor que la del genoma nuclear y a la presencia de una herencia matrilineal. Su arreglo espacial y su tamaño mantienen genes con un alto grado de conservación entre especies de distintos niveles

taxonómicos, lo cual facilita la resolución de diferencias entre individuos de especies cercanamente emparentadas (Brown, 1985; Moritz *et al.*, 1987; Saccone *et al.*, 1999). Algunas regiones del ADNmt son variables (COI, D-loop), lo cual ha permitido su uso en estudios poblacionales (Shearer *et al.*, 2002; Arnaud *et al.*, 2003; Pfeiler *et al.*, 2005).

Debido a que la mayoría de los estudios producidos en México sobre el género *Spondylus* (Baqueiro *et al.*, 1982; Holguín-Quiñonez y González-Pedraza, 1994; Villalejo-Fuerte y García-Domínguez, 1998; Cudney-Bueno, 2000; Muñetón-Gómez *et al.*, 2001; Villalejo-Fuerte y Muñetón-Gómez, 2002; Villalejo-Fuerte *et al.*, 2002, 2005; SEMARNAT, 2005; Cudney-Bueno, 2007; Cudney-Bueno y Rowell, 2008) consideran el trabajo de Skoglund y Mulliner (1996) y reconocen tres especies, en el presente estudio la asignación *a priori* de las entidades se basa en esta postura, la cual no necesariamente deberá ser compartida en el planteamiento de la hipótesis.

III. JUSTIFICACIÓN

El presente estudio aportará información que permitirá estimar los niveles de divergencia genética y variabilidad morfométrica de los individuos integrantes del género *Spondylus* distribuidos en el Pacífico mexicano. Su realización se sustenta en lo siguiente:

La situación taxonómica de los integrantes del género *Spondylus* no es clara. Las propuestas existentes reconocen por una parte la presencia de dos especies, una de las cuales se encuentra integrada por dos subespecies. Alternativamente, otros autores aceptan la existencia de tres a cuatro entidades en el rango de especie, para las cuales incluso, aplican una nomenclatura diferencial. Este desacuerdo tiene como causa el empleo de caracteres diagnósticos poco consistentes, que en ocasiones permiten discriminar grupos con facilidad, pero en otras, generan confusiones y dudas debido a la dificultad de ubicar individuos en algún determinado grupo taxonómico.

Los organismos integrantes del género *Spondylus* han sido de gran interés económico, por lo que las decisiones aplicadas para su manejo y conservación deben tener una consideración clara del conocimiento biológico y taxonómico del recurso. En el noroeste de México, las especies del género *Spondylus* y en particular *S. calcifer* son reportadas como sobre-explotadas (Baqueiro *et al.*, 1982), consideración por la cual esta especie, fue designada en la categoría de protección especial en la Norma Oficial Mexicana NOM-059. Si los resultados obtenidos de una revisión más profunda sobre la sistemática de este género soportan a *Spondylus calcifer* como entidad con validez taxonómica, las decisiones de protección como una unidad de manejo pueden ser justificadas. Sin embargo si las evaluaciones taxonómicas sustentadas en métodos alternos sugieren un arreglo taxonómico que involucre una relación filogenética mayor entre *Spondylus calcifer* con otra entidad reconocida ahora como especie distinta, un planteamiento diferente de administración del recurso debería ser considerado.

Tomando en cuenta lo anterior, llama la atención que a la fecha no exista un respaldo sólido sobre aspectos básicos de la biología de las especies que integran el género, como es la validación de las entidades taxonómicas. Una vez clarificada con mayor rigor ésta, será conveniente para fines de manejo, conocer de manera particular otros aspectos básicos de cada entidad reconocida, como los niveles de abundancia y los niveles de variabilidad genética. En el presente estudio además de considerar la variabilidad inter-específica como referencia al planteamiento taxonómico, también se aportará información sobre la variabilidad intra-específica como una aproximación para inferir la estructura poblacional en dos de las tres entidades revisadas.

IV. DISEÑO DE HIPÓTESIS

Planteamiento de premisas:

- La propuesta planteada por (*i.e.* Keen, 1971) reconocen que el género *Spondylus* está integrado por dos especies para la provincia Panámica (*S. calcifer* y *S. princeps*); una de las cuales integrada por dos sub-especies (*S. princeps princeps*, y *S. princeps unicolor*).
- Las revisiones realizadas por Skoglund y Mulliner (1996), sobre la taxonomía de *Spondylus*, provenientes de individuos del Noroeste de México, sugiere la existencia de tres especies. Sin embargo, los criterios morfológicos sobre los cuales se sustentan no son claros. Existen varios ejemplos en moluscos en donde las expresiones fenotípicas se han asociado en mucho mayor grado a presiones ambientales que al producto de divergencias evolutivas asociadas a sus relaciones filogenéticas.

Planteamiento de hipótesis

- En la región del Pacífico Mexicano y Golfo de California existen solamente dos especies (*S. calcifer* y *S. princeps*)
- La especie reconocida por Skoglund y Mulliner (1996) como *Spondylus leucacanthus* es una variante morfológica dentro de la especie *Spondylus princeps*.

V. OBJETIVOS

General

Aportar información sobre la integridad taxonómica de las especies del género *Spondylus* distribuidas en localidades del Pacífico mexicano y Golfo de California estimando el grado de diferenciación genética y morfométrica.

Particulares

- Determinar el grado de divergencia genética de las especies del género *Spondylus* distribuidas en el noroeste de México, y comparar dichos porcentajes con los de especies taxonómicamente establecidas en *Spondylus* del indopacífico.
- Determinar el grado de divergencia morfométrica de las especies del género *Spondylus*, distribuidas en el noroeste de México, a partir de la configuración del contorno de la concha.
- Evaluar el grado de diferenciación genética y morfométrica a nivel intra-específico entre los sitios de recolecta.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

Recolecta de muestras e identificación morfológica

Se obtuvieron muestras de individuos de 11 localidades mexicanas. Todos los individuos fueron identificados tomando en cuenta los trabajos de Keen (1971) y Skoglund y Mulliner (1996) y se analizaron los caracteres diagnósticos utilizados en la identificación taxonómica de la manera tradicional de las especies de *Spondylus* (Tabla I). Éstos fueron la coloración externa e interna de la valva, la coloración de dientes, la disposición y tipo de espinas y de la charnela, entre otros. A partir de esta revisión se obtuvieron tres grupos los cuales fueron tratados como especies putativas a partir de las cuales se realizaron las evaluaciones posteriores empleando los datos genéticos y morfométricos con caracteres diagnósticos distintos: *S. calcifer*, *S. princeps* y *S. leucacanthus*.

Las muestras de *S. calcifer* provinieron de nueve sitios, dos en el Pacífico mexicano (Guerrero y Oaxaca) y siete en el Golfo de California (Las Cruces, Agua Verde, Santa Rosalía, Bahía de los Ángeles, Isla Ángel de la Guarda (norte), La Cholla, Isla Tiburón). En La Cholla, Isla Ángel de la Guarda e Isla Tiburón, no fue posible obtener organismos completos, solo muestras de tejido; por tal motivo la información proveniente de estas localidades solo fue utilizada en los análisis genéticos. De la especie *S. princeps* se recolectaron muestras de cinco localidades, una ubicada en la costa Oeste de la Península de Baja California (Laguna Ojo de Liebre) y el resto dentro del Golfo de California (Agua Verde, Isla Danzante, Santa Rosalía y Bahía de los Ángeles). De Bahía de los Ángeles solo fue posible obtener muestras de tejido muscular; de las demás localidades, se obtuvieron los organismos completos. Para la especie *S. leucacanthus* se recolectaron 39 muestras en dos localidades del Golfo de California (Santa Rosalía e Isla Danzante). Se obtuvo un total de 286 valvas y 383 tejidos de las tres especies. Las muestras de tejido fueron debidamente etiquetadas, preservadas en alcohol al 96% y almacenadas a -20°C hasta su posterior análisis. La Tabla II y

Figura 3 muestran las localidades y el tamaño de muestra de cada especie utilizado en cada análisis.

Tabla 1. Comparación de la información requerida para la identificación de *Spondylus calcifer*, *Spondylus princeps* y *Spondylus leucacanthus* (tomado de Skoglund y Mulliner, 1996).

Caracter	<i>Spondylus leucacanthus</i>	<i>Spondylus princeps</i>	<i>Spondylus calcifer</i>
Características externas			
Color	De blanco a naranja, Rojo Coral	Rosa arena, púrpura con espinas naranjas	Púrpura/naranja, púrpura, naranja/amarillo, naranja.
Espinas	Largas, rectas, estrechas	Medianas y espatuladas	Cortas, espatuladas o ausentes en adultos
Costillas radiales	Apenas aparentes	Pronunciadas	Gruesas
Área de fijación de la valva derecha	Vida libre o sobre mantos de conchas muertas o rocas	Adheridas a rocas sobre una pequeña área	La mayor parte de la valva adherida a rocas
Características internas			
Dientes de la charnela en la valva Izquierda	Delicados, angostos, blancos, gruesos en especímenes adultos	Delicados, anchos, cafés	Gruesos, de color café
Dientes de la charnela en la valva derecha	Delicados, anchos y blancos	Delicados, angostos y blancos	grandes y blancos
Cicatriz del musculo aductor en la valva derecha	Profunda con callo	superficial	superficial a profundo
Banda interna	Estrecha, usualmente presente cerca de la charnela, ocasionalmente en todo margen	A lo largo de todo el ancho del margen	A lo largo de todo el ancho del margen
Crenulaciones del margen	Mas pronunciado, menos que en <i>S. princeps</i>	Mas fino, mas espaciado que en <i>S. leucacanthus</i>	Mas fuerte, extendido adicionalmente hacia la concha
Habitat	Arena, 18 a 90 m	Roca, 3 a 28 m	Roca, intermareal hasta los 18m

Tabla 2. Localidades de muestreo y número de organismos utilizados por especie para el análisis genético (tejidos) y morfométrico (valvas). *Sc*= *Spondylus calcifer*; *Sp*= *Spondylus princeps*; *Sl*= *Spondylus leucacanthus*.

Localidad	Abreviatura	Coordenadas geográficas	Genética			Morfometría		
			<i>Sc</i>	<i>Sp</i>	<i>Sl</i>	<i>Sc</i>	<i>Sp</i>	<i>Sl</i>
Laguna Ojo de Liebre	LOL	27° 14.8' N 114° 10.0' O		39			39	
Las Cruces	LC	24° 14.8' N 110° 8.9' O	18			18		
Agua Verde	AV	25° 31.2' N 111° 4.0' O	37	30		39	27	
Isla Danzante	ID	25° 48.6' N 111° 15.2' O		10	26		10	26
Santa Rosalía	SR	27° 21.4' N 112° 16.2' O	30	28		35	28	4
Bahía de los Ángeles	BA	28° 49.9' N 113° 16.1' O	49	12		46		
Isla Ángel de la Guarda	AN	29° 33.1' N 113° 34.0' O	32					
La Cholla	LCH	31° 20.6' N 113° 38.6' O	32					
Isla Tiburón	IT	28° 44.0' N 112° 17.5' O	29					
Guerrero (Pacífico)	GUE	16° 49.0' N 99° 54.2' O	5			8		
Oaxaca (Pacífico)	OAX	15° 39.5' N 96° 29.7' O	6			6		
TOTALES			238	119	26	152	104	30

El trabajo de laboratorio fue realizado en las instalaciones de la sección de genética y morfometría de la Colección Ictiológica (CI) del CICIMAR-IPN.

(<http://coleccion.cicimar.ipn.mx>).

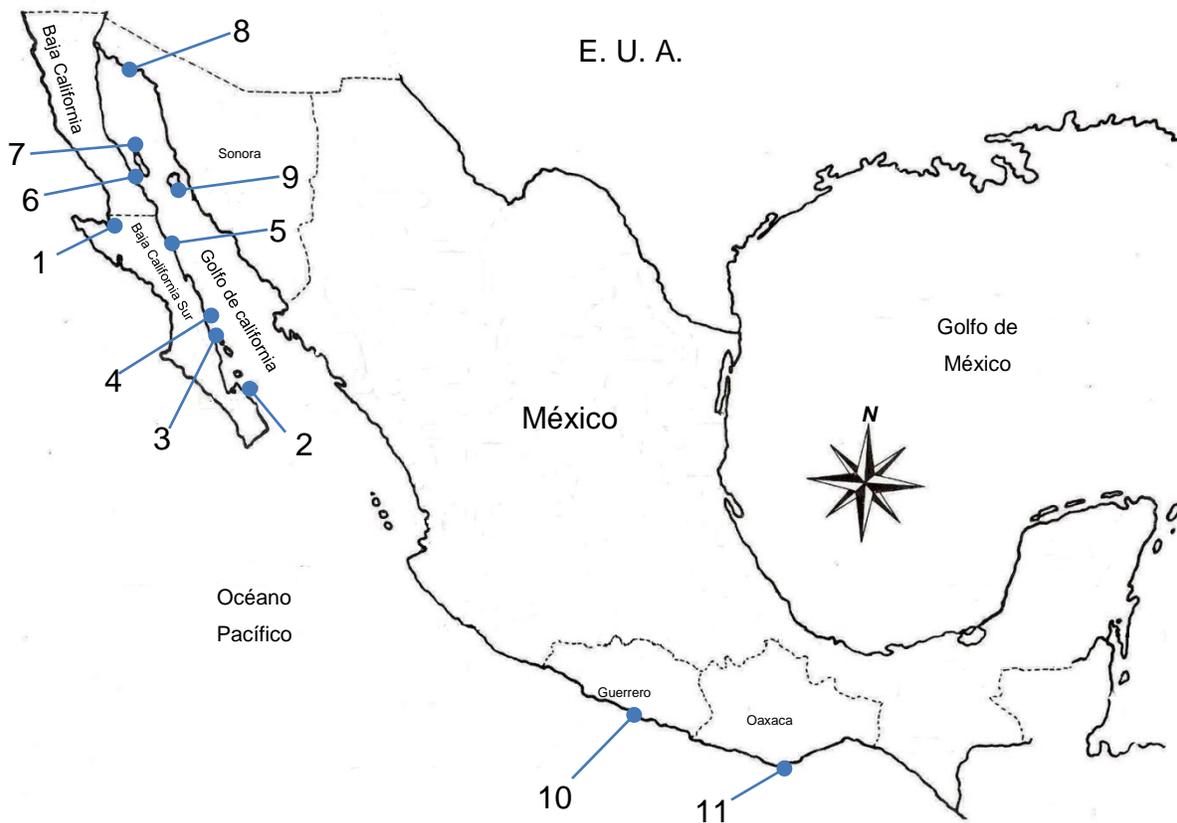


Figura 3. Sitios de muestreo de *Spondylus* en el noroeste de México: 1) Laguna Ojo de Liebre, B.C.S.; 2) Las Cruces, B.C.S.; 3) Agua Verde, B.C.S.; 4) Isla Danzante, B.C.S.; 5) Santa Rosalía, B.C.S.; 6) Bahía de los Ángeles, B.C.; 7) Isla Ángel de la Guarda, B.C.; 8) La Cholla, Son.; 9) Isla Tiburón, Son.; 10) Acapulco, Gro., y 11) Puerto Ángel, Oax.

Obtención de datos genéticos

i. Extracción de ADN

De cada individuo se emplearon aproximadamente 200 µg de tejido y se realizó la extracción del ADN total empleando dos paquetes comerciales: QIAGEN® “*Spin-Column Protocol*” (Animal Tissues) y DNAzol® Reagent (Invitrogen). Para el primero se siguió la metodología sugerida por el fabricante y para el segundo se realizaron modificaciones al protocolo original, tal como se describe en el Anexo I.

Se verificó la calidad de la extracción mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% corriendo a 100V durante aproximadamente una hora. Posteriormente los fragmentos amplificados se visualizaron por fluorescencia de ácidos nucleicos utilizando el reactivo *GelGreen*TM y un transiluminador *UV Labnet International, Inc.*

ii. Diseño de iniciadores

En el presente estudio se aislaron y caracterizaron secuencias parciales del gen de la Sub-unidad I del Citocromo Oxidasa (COI) debido a que es posible observar niveles óptimos de variabilidad para desarrollar trabajos poblacionales (conclusiones acerca de procesos de adaptación) y taxonómicos en organismos marinos (De Oliveira-Ribeiro, 2012).

Debido a que no se contaban con iniciadores específicos para la amplificación del COI en estas especies, se diseñaron iniciadores utilizando como base secuencias conocidas de este gen procedentes de otras especies del mismo género. Primero, se realizó una búsqueda en la plataforma del National Center for Biotechnology Information (NCBI) a través de su base de datos pública GenBank®: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). De todas las secuencias existentes correspondientes al gen COI de la familia Spondylidae, se creó una base de datos con cinco secuencias de las especies *Spondylus nicobaricus* (No. Acceso AB033685), *S. sinensis* (No. Acceso AB033683), *S. varius* (No. Acceso AB076909), *S. squamosus* (No. Acceso AB033684) y *S. gaederopus* (No. Acceso JF496776). Posteriormente, se realizó un acoplamiento empleando el algoritmo Clustal W implementado en el programa MEGA Ver. 5.05® (Tamura *et al.*, 2011) con la finalidad de detectar la especie con menor cantidad de sitios variables. Se seleccionó a *S. nicobaricus*, y con base en esta secuencia se diseñó un par de iniciadores (en sentido y anti-sentido) que fueron denominados SnicCOI-F (5'-GTTTGGCTTCTTCCAGCAG-3') y SnicCOI-R (5'-CCAGTTACTCCGCCAACTGT-3'). Para incrementar la posibilidad de éxito en las amplificaciones, se diseñó otro par de iniciadores utilizando todas las secuencias en conjunto. La idea fue

considerar la existencia de sitios variables para diseñar iniciadores degenerados (SponCOI-F, 5' TTYAGDTTYTGRCTWYTKCCRGCRG-3' y SponCOI-R 5' CCMGTDAYYCCBCCWAYYGTRAAYT-3'). Una vez obtenidos estos dos pares de iniciadores se procedió a la estandarización del protocolo a través de varios ensayos combinando los iniciadores diseñados. Los mejores productos amplificados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), fueron secuenciados y a partir de las secuencias obtenidas se diseñaron iniciadores específicos con la intención de tener una mayor probabilidad de éxito en las amplificaciones futuras. De esta manera se diseñaron los iniciadores nombrados como SpriCOI-F (5'-TCGGGGTTTATTGAAGATGG) y SpriCOI-R (5'-CCAAACAAAGTCGCAATTCA) para amplificar las secuencias de *S. princeps*, y los iniciadores ScalCOI-F (5'-GGTGGCTGTGTCAGGGTTTA) y ScalCOI-R (5'-CCACATCCAACCCAACAGTA) para *S. calcifer*. Las amplificaciones en *S. leucacanthus* se realizaron combinando los iniciadores SpriCOI-F y SponCOI-R.

Para el diseño y la selección de los iniciadores se tuvo en cuenta el número y porcentaje de bases (G+C~ 50%), longitud del iniciador (preferentemente de 20 pb), temperatura de alineamiento (entre los 50° y 65°C), diferencia en las temperatura de acoplamiento de ambos iniciadores (< 2°C) y no complementariedad entre ellos (Abd-Elsalam, 2003).

iii. Amplificación y edición de secuencias

A partir del ADN total extraído se amplificaron secuencias parciales del gen COI mediante la PCR y los iniciadores correspondientes de cada especie. El volumen de la reacción fue de 35µl y fue constituida de la siguiente manera: 1.5µl de ADN genómico (~40ng); 3.5µl PCR Buffer Taq (10x); 0.7µl dNTP's (10mM) (*Invitrogen*); 2.1µl MgCl (50mM) (*Invitrogen*), 0.7µl iniciador sentido (10mM); 0.7µl iniciador anti-sentido (10mM); 2.1µl BSA (1%); 23.85µl H₂O grado molecular y 1.25 U de *Taq* DNA polimerasa (*Invitrogen*). Se empleó un termociclador *Applied BioSystems*TM

utilizando el siguiente protocolo: una desnaturalización a 94°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos integrados por una desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, un alineamiento a 59°C durante 1 minuto, y una extensión a 72°C por 50 segundos. Se realizó una extensión final a 72°C durante 4 minutos. La calidad de los productos resultantes fue corroborada en un gel de agarosa al 1%. La electroforesis en gel fue corrida a 100V por un periodo de 1.5 horas aproximadamente y los geles fueron teñidos por fluorescencia mediante *GelGreen*TM y visualizados utilizando un transiluminador UV *Labnet*. Los productos obtenidos de manera exitosa de la PCR fueron purificados y secuenciados (*Macrogen INC*, Corea del Sur) en sentido y antisentido.

Las secuencias obtenidas fueron comparadas mediante el software *BLAST: Basic Local Alignment Search Tool* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), con las secuencias encontradas en la base de datos de genes del NCBI (*GenBank*[®]: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), para verificar si efectivamente las amplificaciones obtenidas correspondían al mismo fragmento del ADN mitocondrial. Una vez realizada dicha comprobación, las secuencias fueron arregladas y editadas empleando las secuencias obtenidas por los dos iniciadores para cada individuo. Se verificó la complementariedad de las hebras, y a ojo, se corrigieron las ambigüedades, obteniendo una secuencia única de cada individuo. Lo anterior fue realizado en el software *Sequencher 4.8* y *Chromas Pro 1.41*. Posteriormente, todas las secuencias fueron alineadas a partir del algoritmo *Clustal W* ($\geq 85\%$) y limitadas a un mismo tamaño (583 pb) en el software *MEGA 5.05*[®] (Tamura *et al.*, 2011).

Obtención de datos morfométricos

Los análisis morfométricos se basaron en la comparación de la forma de la valva izquierda de un total de 286 individuos de las tres especies identificadas morfológicamente como *S. calcifer* ($n=152$), *S. princeps* ($n=104$) y *S. leucacanthus* ($n=30$) (Tabla 1).

Se obtuvieron imágenes fotográficas empleando una cámara digital (OLYMPUS SP-320®, 7.1 megapíxeles, pantalla de 115,000 píxeles) con la intención de realizar un análisis de morfometría geométrica. Todas las imágenes fueron cargadas en formato .jpg sobre una computadora personal, se seleccionaron y digitalizaron cotas o marcas anatómicas naturales (“*Landmarks*” término con el que se le conoce en la literatura inglesa) utilizando el software *TpsDig* (Rohlf, 2004).

Debido a que la morfometría geométrica emplea coordenadas como variables de forma, es importante considerar un número adecuado de marcas con la intención de tener una representación adecuada de la forma (Zelditch *et al.*, 2004). Se encontraron pocas marcas naturales que cumplieran con el criterio de homología, por lo que a partir de éstas se generaron líneas angularmente equidistantes como referencia para ubicar marcas adicionales (semi-marcas o *semi-landmarks*) que pudieran ser comparables en todos los organismos. La estrategia fue la siguiente: se seleccionaron tres marcas naturales ubicadas en el Centro del Ligamento de la Charnela; (CLCh), Interior Izquierdo de la Charnela (IICCh) e Interior Derecho de la Charnela (IDCh) y a partir de estas marcas se generaron tres referencias con un origen diferente (CLCh, IICCh y IDCh) de las líneas angularmente equidistantes (Figura 4). Las semimarcas fueron ubicadas en la intersección de cada línea con el borde interno de la valva. De esta manera se seleccionaron 49 puntos de referencia (considerando marcas y semi-marcas; Figura 5), y todas ellas fueron digitalizadas empleando el software *TpsDig*® (Rohlf, 2004).

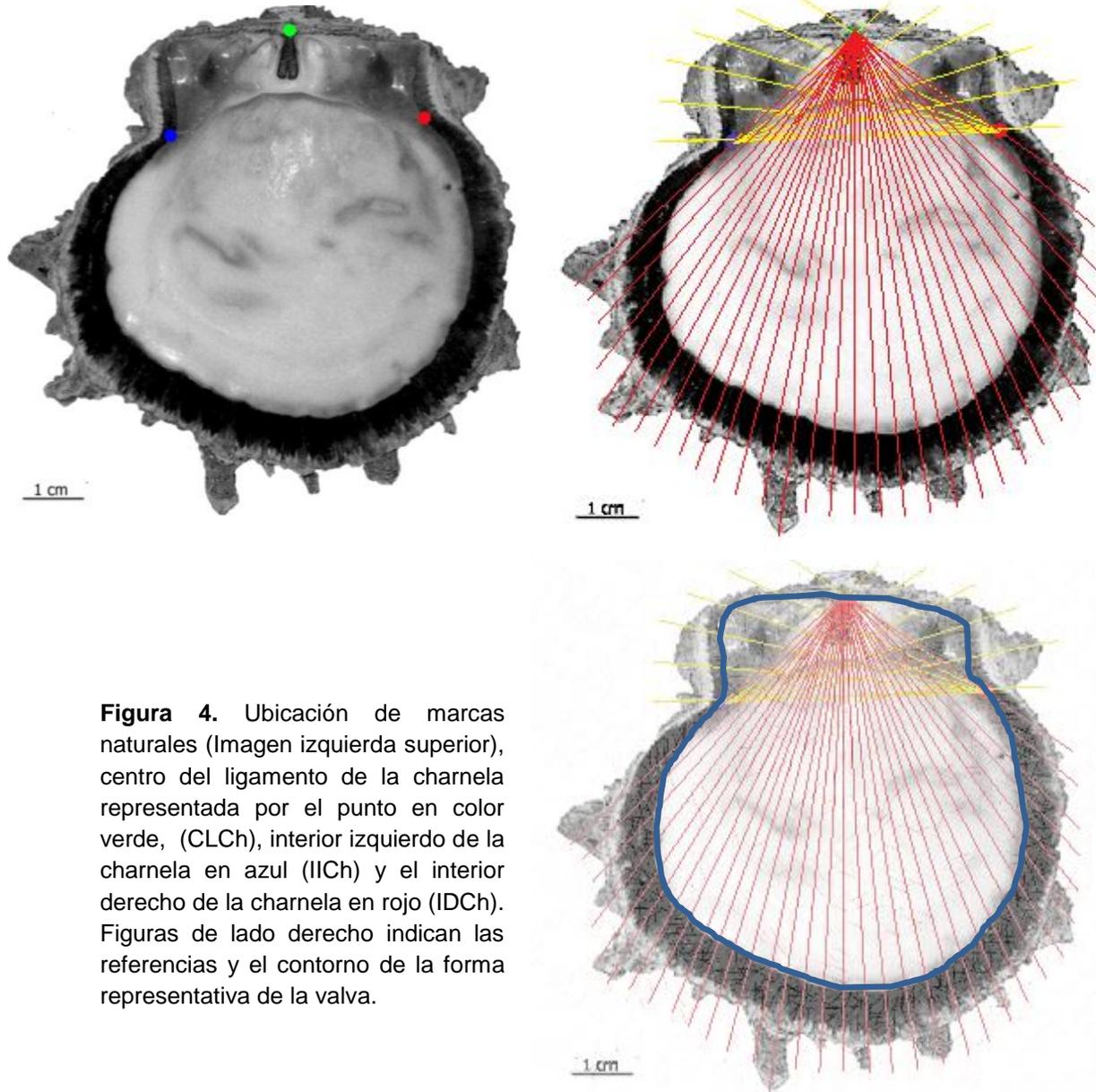


Figura 4. Ubicación de marcas naturales (Imagen izquierda superior), centro del ligamento de la charnela representada por el punto en color verde, (CLCh), interior izquierdo de la charnela en azul (IICh) y el interior derecho de la charnela en rojo (IDCh). Figuras de lado derecho indican las referencias y el contorno de la forma representativa de la valva.

Para eliminar los efectos ajenos a la propia variación de la forma las coordenadas fueron estandarizadas empleando el método de superposición de Procrustes, el cual consiste en rotar, escalar y posicionar una configuración sobre otra que es tomada como referencia. La forma promedio es calculada, optimizando el alineamiento sobre la forma promedio de las configuraciones. La referencia final

es la que minimiza las distancias medias de las configuraciones, dicho resultado depende de la distribución de las formas en la muestra y no de la configuración inicial tomada como referencia. Los análisis previamente descritos fueron realizados en el programa *CoordGen6f* (IMP) (Sheets, 2004). A partir de estas coordenadas fueron obtenidas nuevas coordenadas correspondientes a los valores de las deformaciones parciales, los cuales representan la interpolación entre los puntos de referencia, teniendo todos los desplazamientos de todas las marcas de referencia en relación con todas las demás utilizadas, siendo variables que se extienden por todo el espacio de nuestros datos pero en dos dimensiones. De esta manera, es posible utilizarlos en pruebas estadísticas convencionales sin necesidad de ajustar los grados de libertad. Estas nuevas coordenadas, fueron empleadas para los posteriores análisis multivariados.

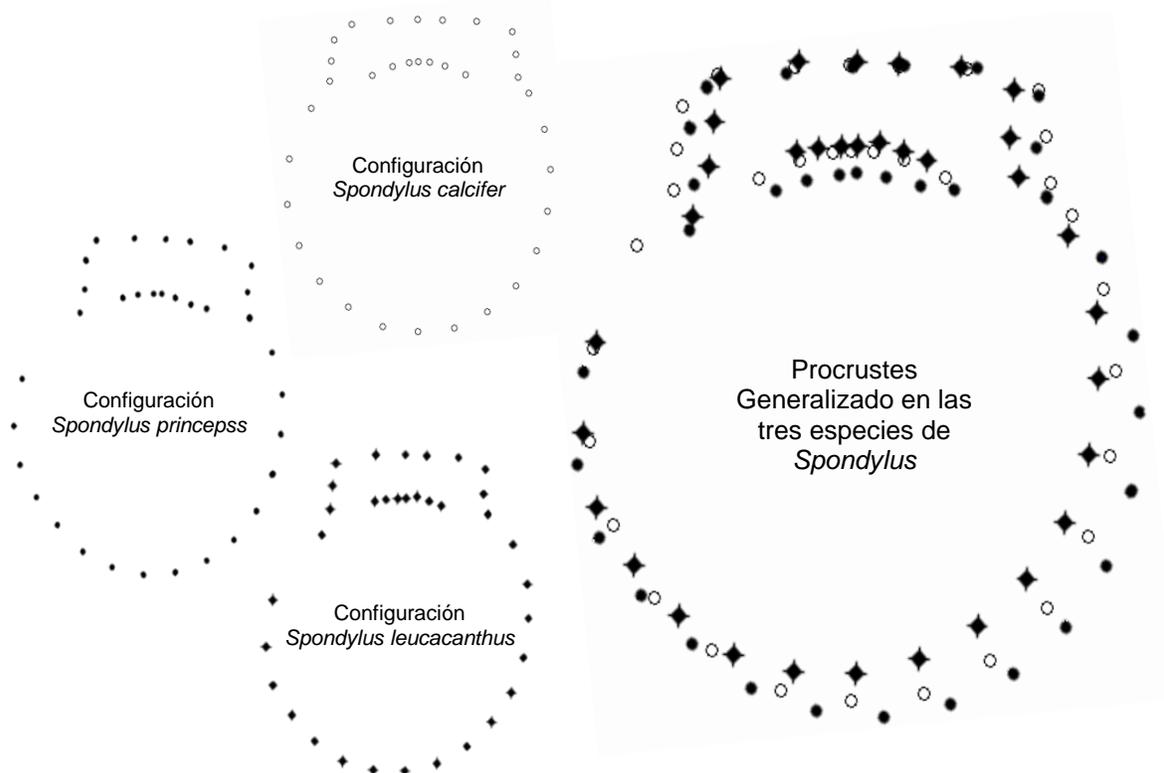


Figura 5. Configuración de las marcas empleadas para la comparación morfométrica de la valva izquierda de las especies de *Spondylus*.

Análisis de datos

i. Variabilidad inter-específica

Un total de 383 secuencias de gen Citocromo Oxidasa Subunidad I (COI) fueron editadas y alineadas utilizando el algoritmo de *Clustal W*® (Larkin *et al.*, 2007) implementado en el programa *MEGA 5.05*® (Tamura *et al.*, 2011) con la intención de encontrar la homología entre los sitios de las secuencias analizadas de COI.

El número total de haplotipos, sitios polimórficos y composición nucleotídica fueron estimados en el software *MEGA 5.05*® y *Dna SP*® (Tamura *et al.*, 2011; Librado y Rosas, 2009). También se estimó el porcentaje de divergencia intra e inter-específica con base en el modelo de Kimura-2 parámetros (modelo de sustitución nucleotídica que asigna distinto peso a una transversión de una transición) (Kimura, 1980). Se estimaron también los niveles de divergencia con respecto a otras especies de *Spondylus* empleando secuencias obtenidas del *Genbank*®: *S. nicobaricus* (No. Acceso AB033685), *S. sinensis* (No. de acceso AB033683), *S. squamosus* (No. Acceso AB033684), *S. varius* (No. Acceso AB076909), *S. gaederopus* (No. Acceso JF496776) y *Eltopera sanguinea* (Spondylidae) (No. Acceso AB033686).

También se realizó un árbol empleando el método de *Neighbor Joining* (vecino más cercano), el cual construye un arreglo basado en distancias a partir de la búsqueda de secuencias o grupos de secuencias similares cuyas distancias sean las mínimas. Las longitudes de las ramas del árbol se encuentran dadas por las distancias genéticas pareadas más cortas entre los taxa. Se utilizó el modelo de sustitución de Kimura-2 parámetros y la robustez de las ramas fué estimada a partir de 1000 iteraciones. El mejor árbol es aquel que minimiza las diferencias genéticas (Lemey *et al.*, 2009; Tamura *et al.*, 2011). Como grupo externo se utilizó a *S. sinensis*.

Para robustecer la aproximación de las relaciones filogenéticas de las tres especies, se construyeron árboles empleando el método de Máxima Parsimonia y método Bayesiano. El primero se basa en encontrar un árbol filogenético que

explica un conjunto dado de secuencias alineadas, utilizando el menor número de eventos evolutivos. Los eventos evolutivos que se pretenden minimizar son las mutaciones de nucleótidos. En este contexto, la diferencia entre dos secuencias alineadas está dada por el número de posiciones en el cual ellas difieren (Huson *et al.*, 2011). El árbol de Máxima Parsimonia fue generado en el programa *MEGA 5.05*® (Tamura *et al.*, 2011). El método Bayesiano se basa sobre la noción de probabilidades posteriores: probabilidades que son estimadas con base en un modelo de evolución molecular. El algoritmo busca el mejor árbol que sea consistente con el modelo de evolución y con los datos o secuencias alineadas (Hall, 2005). Previo a la búsqueda del árbol mediante el método Bayesiano, se probó el mejor modelo de sustitución nucleotídica empleando el programa *JModelTest* (Posada, 2008). El mejor modelo fue seleccionado con base en el criterio de información de Akaike (CIA) y criterio de información Bayesiano (CIB).

La obtención de los árboles óptimos obtenidos a partir del método Bayesiano se basó en la generación de distribución de probabilidades de los arboles filogenéticos utilizando el enfoque de Cadenas de Markov Monte Carlo (*Markov Chain Monte Carlo*), el cual emplea el muestreo de la distribución posterior de la probabilidad, utilizando una cadena de construcción adecuada de los resultados (árboles). Para la búsqueda del mejor árbol se utilizaron dos cadenas de 1,000,000 de generaciones, con una frecuencia de muestreo de 100, en el software *Mr. Bayes v. 3.1.2*® (Huelsenbeck y Ronquist, 2001). Se eliminó el primer cuarto de los árboles con la intención de conservar aquellos árboles con los valores estables de verosimilitud. Se empleó como grupo externo a *Crassostrea gigas* (Ostreidae) (No. Acceso AB033687). En las tres aproximaciones filogenéticas solo se incluyó el haplotipo más frecuente de cada especie.

Para la revisión de las variaciones morfológicas de la concha se realizaron Análisis de Variables Canónicas (AVC), el cual permitió estimar el grado de diferenciación morfométrica. El AVC es un método que permite encontrar el conjunto de ejes (o combinación lineal de variables) que maximicen la varianza entre dos o más grupos. En el programa *CVAGen6m* (Sheets, 2004), se calcularon las deformaciones parciales a una referencia común y luego se realizó un Análisis

Múltiple de Varianza (MANOVA) que probó la robustez estadística de la diferenciación entre las formas de las especies, determinándose el número de ejes (VC) distintos y estadísticamente significativos ($P=0.05$), se calcularon los pesos de las variables canónicas para todos los organismos analizados. Finalmente, se obtuvieron las distancias de Mahalanobis para asignar todos los especímenes agrupados al clado de menor distancia afín y a partir de dichas distancias se construyó una matriz de asignación correcta.

ii. Variabilidad intra-específica

Se realizó un estudio de la variabilidad genética para revisar la estructura poblacional de *Spondylus calcifer* y *Spondylus princeps* en recolectas provenientes dentro y fuera del Golfo de California. La intención del análisis, fue evaluar el grado de diferenciación (divergencia) dentro de cada especie y estimar los niveles de variabilidad genética por medio de las diversidades haplotípicas y nucleotídicas, calculadas en el programa *ARLEQUIN 3.5*® (Excoffier *et al.*, 1992; Excoffier y Lischer, 2011; Schneider *et al.*, 2000). Debido a que no fue posible obtener muestras de *S. leucacanthus* de distintos sitios, no se realizó una evaluación poblacional para esta especie.

Se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA), utilizando información sobre el contenido alélico de los haplotipos, así como sus frecuencias (Excoffier *et al.*, 1992). La información sobre las diferencias en el contenido alélico entre los haplotipos se introduce como una matriz de distancias cuadráticas euclidianas. La significancia de los componentes de covarianza asociados con los diferentes niveles posibles de estructura genética (dentro de los individuos, dentro de las poblaciones, dentro de los grupos de poblaciones, entre grupos) se prueba utilizando procedimientos de permutación no paramétricos (Excoffier *et al.*, 1992). A partir de este análisis se calculó el Índice de fijación Φ_{st} (análogo al F_{st}) que puede ser usado como distancia genética entre poblaciones. El índice de fijación de Φ_{st} compara el grado de variación genética entre dos o más subpoblaciones en relación con todas las combinaciones de subpoblaciones posibles. Si el

apareamiento en la población es al azar (panmixia), la población y subpoblaciones tendrán un valor de Φ_{st} igual o cercano a cero, por otra parte si el apareamiento no es al azar, las poblaciones tendrán una mayor variación genética que respecto a la población total, por lo que el valor de Φ_{st} se incrementara a un valor máximo de 1, encontrando poblaciones altamente diferenciadas (Hedrick, 2005; Meirmans y Hedrick, 2011; Wright, 1978).

El índice de Φ_{st} se obtiene a partir del coeficiente estimado de la varianza de las diferencias entre las poblaciones e incorpora información del grado de diferenciación molecular entre las secuencias, así como la frecuencia de los haplotipos en cada población (Excoffier *et al.*, 1992; Michalakis y Excoffier, 1996). Con la intención de evaluar el nivel de diferenciación genética entre poblaciones, se realizaron comparaciones pareadas a partir del Φ_{st} para evaluar las diferencias genéticas entre pares de localidades, dicho análisis se realizó permutando los haplotipos entre poblaciones 1000 veces utilizando procedimientos de permutación no paramétricos establecidos por el programa *ARLEQUIN* 3.5 (Excoffier y Lischer, 2011). El nivel de significancia fue corregido de acuerdo con el procedimiento de Bonferroni (Rice, 1989), debido a la realización de comparaciones múltiples.

Para explorar algún patrón filogeográfico se construyeron redes de mínima expansión, utilizando el programa de computo *Network* 4.2.0.1® (www.fluxusengineering.com/sharenet.htm), basadas en las diferencias y frecuencias de los haplotipos. Así mismo, los patrones demográficos a nivel histórico fueron explorados a partir de las distribuciones de las diferencias pareadas entre secuencias ("*mismatch distribution*"), a partir de las cuales puede inferirse si las muestras proceden de una población en equilibrio demográfico o si ha pasado por una expansión poblacional repentina (Rogers y Harpending, 1992). La validez del modelo de expansión puede ser probada a partir del análisis de la suma de las desviaciones cuadradas (*SSD*) entre la distribución de las frecuencias de las diferencias observadas y la distribución obtenida a partir del modelo. La probabilidad de encontrar una *SSD* observada es obtenida de la comparación con la distribución de *SDD* simuladas y dicha probabilidad se emplea como una

aproximación del nivel de significancia (Rogers y Harpending, 1992). Cuando los valores de las *SSD* son altos, las distribuciones tienden a ser multimodales y comúnmente representan una población estable, mientras que cuando los valores de las *SSD* son bajos, las distribuciones tenderán a ser unimodales, sugiriendo una población en expansión (Rogers y Harpending, 1992; Rogers, 1995; Schneider y Excoffier, 1999; Excoffier, 2004). Los resultados de este análisis fueron obtenidos para cada localidad empleando el 95% de confiabilidad y 1000 réplicas, como es implementado en el software *ARLEQUIN 3.5®* (Excoffier y Lischer, 2011).

Finalmente, se realizaron las pruebas de neutralidad de Tajima *D* y de Fu *F*, con la finalidad de evaluar las desviaciones de los datos a los modelos de evolución molecular neutral. La significancia del estadístico *D* se prueba mediante la generación de muestreos aleatorios bajo la hipótesis de selección neutral y población en equilibrio, utilizando un algoritmo de simulación coalescente (Hudson, 1990; Excoffier y Lischer, 2011). Los valores significativos de *D* pueden ser debido a factores distintos de efectos selectivos, como la expansión poblacional, cuello de botella o heterogeneidad de las tasas de mutación (Tajima, 1993; Aris-Brosou y Excoffier, 1996; Tajima, 1996). El estadístico *F* de Fu es muy sensible a la expansión demográfica, que por lo general conduce a grandes valores *F* negativos, al igual que *D* de Tajima. *F* de Fu se prueba mediante la generación de muestras aleatorias bajo la hipótesis de selección neutral y población en equilibrio (Fu, 1997). La significancia estadística de ambos modelos se basó en la comparación de los valores observados con los valores esperados obtenidos a partir de 1000 simulaciones en el programa *ARLEQUIN 3.5®* (Excoffier y Lischer, 2011).

El manejo de datos morfométricos fue similar al empleado para las comparaciones inter-específicas, solo que en este caso los grupos fueron asociados a cada localidad para cada entidad taxonómica.

VII. RESULTADOS

Variabilidad Inter-específica

Se obtuvo un total de 383 secuencias parciales del gen de la Subunidad I del Citocromo Oxidasa (583 pb) del ADNmt correspondientes a las tres especies: *S. calcifer* ($n= 235$); *S. princeps* ($n= 122$); *S. leucacanthus* ($n= 26$).

Se obtuvieron 33 haplotipos en *Spondylus calcifer*, 37 en *S. princeps* y ocho en *S. leucacanthus*. Estas diferencias no pueden ser directamente comparables debido a que el tamaño de muestra entre las especies fue distinto. Una mejor idea alternativa podría ser considerar el número de haplotipos por secuencia, en donde el valor máximo esperado es de 1.0, cuando cada secuencia representa un haplotipo distinto y 0.0, cuando todas las secuencias se encuentran representadas por el mismo haplotipo. De esta revisión se observa los siguientes valores: 0.14 (33/235) para *S. calcifer*, 0.30 (37/122) para *S. princeps* y 0.31 (8/26) para *S. leucacanthus*.

El árbol generado mediante el método de *Neighbor-Joining*, a partir de todas las secuencias, sustentó de manera robusta la existencia de tres clados genéticamente distintos, con un soporte del 100% para cada uno de ellos. Dentro de cada clado las distancias genéticas (0.001, 0.004, 0.001) fueron mucho menores que las distancias inter-clados (0.165, 0.137, 0.169) (Figura 6, Tabla 3 y 4).

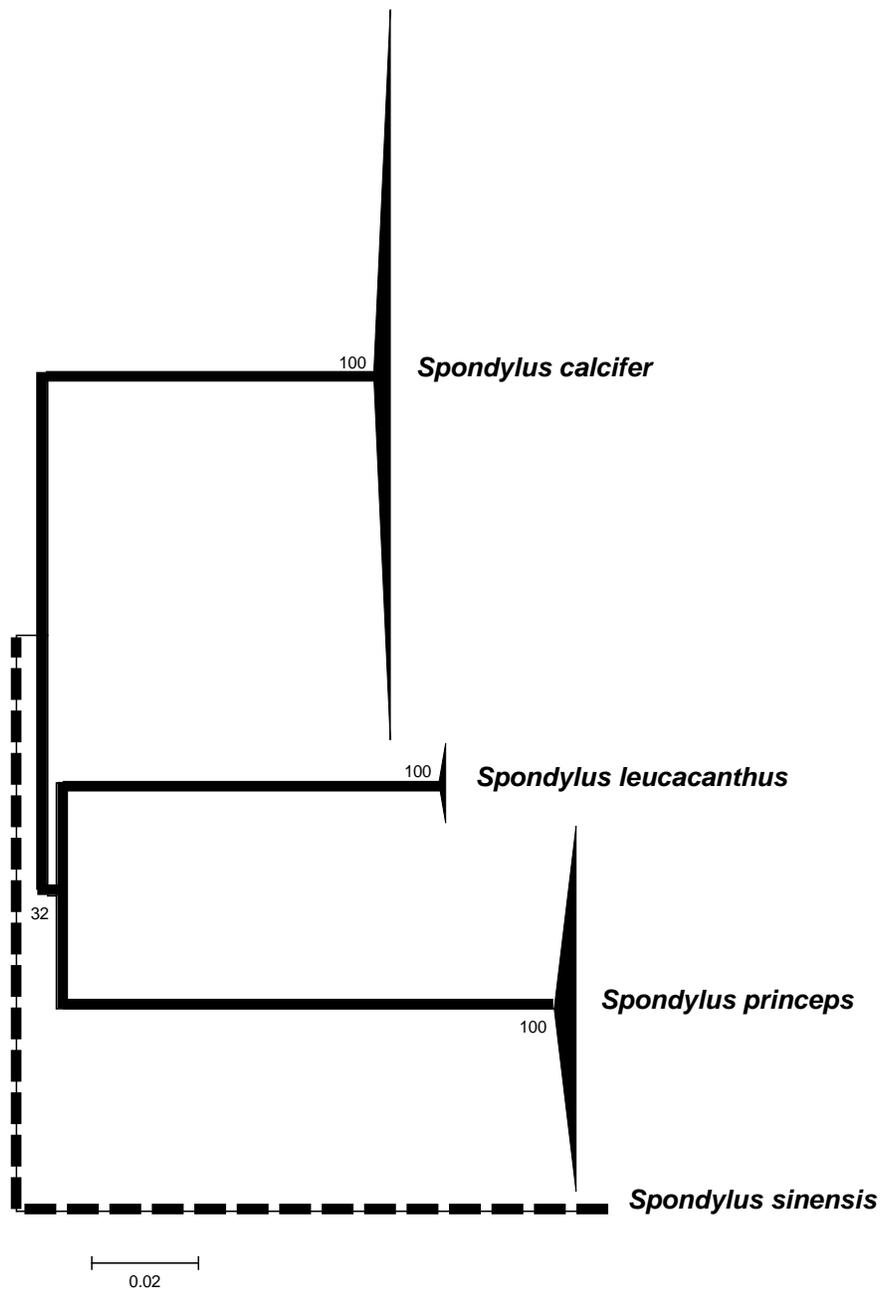


Figura 6. Árbol de agrupación construido por medio del método *Neighbor Joining*, (*Bootstrap* 1000) y utilizando distancias genéticas basadas en el modelo de Kimura 2-parámetros. La anchura de los triángulos terminales refleja la variabilidad de todas las secuencias de cada clado y la altura el tamaño de muestra. Se pueden observar tres grupos genéticamente diferentes. *Spondylus sinensis* fue empleado como grupo externo.

El porcentaje de divergencia intra-específico, fue en promedio de 0.2%; alrededor de 45 veces menor que la divergencia más baja encontrada entre cualquier par de especies (13.7%, encontrada entre *S. calcifer* y *S. leucacanthus*) (Tabla 3 y 4). Las divergencias inter-específicas fluctuaron entre 13.7% y 16.9% entre las tres especies de interés. Aunque menores, estos valores fueron relativamente similares a las divergencias encontradas entre otras especies del mismo género (Tabla 4).

Tabla 3. Porcentaje de divergencia genética dentro de cada especie.

Especies	(%) divergencia intra-específico
<i>S. calcifer</i>	0.1
<i>S. princeps</i>	0.4
<i>S. leucacanthus</i>	0.1
Promedio	0.2

La topología de los árboles construidos a partir de las diez especies presentes en la Tabla IV fueron relativamente similares (Figuras 7, 8 y 9). Todos sugieren la existencia de tres especies del género *Spondylus* como un grupo genéticamente separado para la provincia Panámica. La relación filogenética entre las tres especies obtenida a partir del árbol de *Neighbor-Joining* fue relativamente diferente a la obtenida a partir de los otros dos métodos. Debido a que el árbol Bayesiano fue basado en el mejor modelo encontrado y en la exploración de árboles con mayor probabilidad de soportar los datos, las relaciones obtenidas a partir de este método podrían tener un mayor sustento. El mejor modelo de sustitución nucleotídica encontrado fue el de Tamura Nei93, con una distribución Gama de 0.61, y un porcentaje de sitios invariables de 0.45.

Tabla 4. Valores de divergencia genética (distancias genéticas * 100) encontrados en este estudio y obtenido de otros trabajos (*i.e.* Matsumoto, 2003). Debajo de la diagonal se encuentran las distancias genéticas y por encima de ésta los valores de sus desviaciones estándar.

<i>Spp</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1- <i>S. calcifer</i>		1.9	1.7	2.2	1.9	2.3	2.1	2.2	2.2	3.7
2- <i>S. princeps</i>	16.5		1.9	2.3	2.2	2.4	2.5	2.1	2.4	3.6
3- <i>S. leucacanthus</i>	13.7	16.9		2.1	2.0	2.2	2.2	2.2	2.1	3.5
4- <i>S. nicobaricus</i>	22.3	21.0	20.8		2.0	2.2	2.3	2.1	2.3	3.4
5- <i>S. sinensis</i>	18.4	21.5	19.1	19.4		2.1	2.3	1.9	2.1	3.2
6- <i>S. squamosus</i>	23.9	25.3	23.1	22.4	20.2		2.4	2.3	2.6	3.8
7- <i>S. varius</i>	21.2	25.9	21.7	22.7	22.7	25.7		2.4	2.4	3.7
8- <i>S. gaederopus</i>	24.7	23.8	25.0	22.9	20.7	24.5	26.9		2.3	3.7
9- <i>E. sanguínea</i>	24.9	26.5	24.6	27.2	23.6	28.5	27.4	27.5		3.4
10- <i>C. gygas</i>	46.8	44.6	43.9	42.7	42.0	46.6	46.3	46.4	44.6	

El árbol de Máxima Parsimonia indicó una relación entre las tres especies similar al Bayesiano; ambos soportaron una mayor relación entre *S. calcifer* y *S. princeps*. Es importante resaltar que en ningún caso (empleando cualquier método de construcción) *S. princeps* y *S. leucacanthus* fueron encontradas como genéticamente más afines. Este resultado contradice la propuesta de Keen (1971) que sugiere un mayor parentesco filogenético entre *S. leucacanthus* y *S. princeps*.

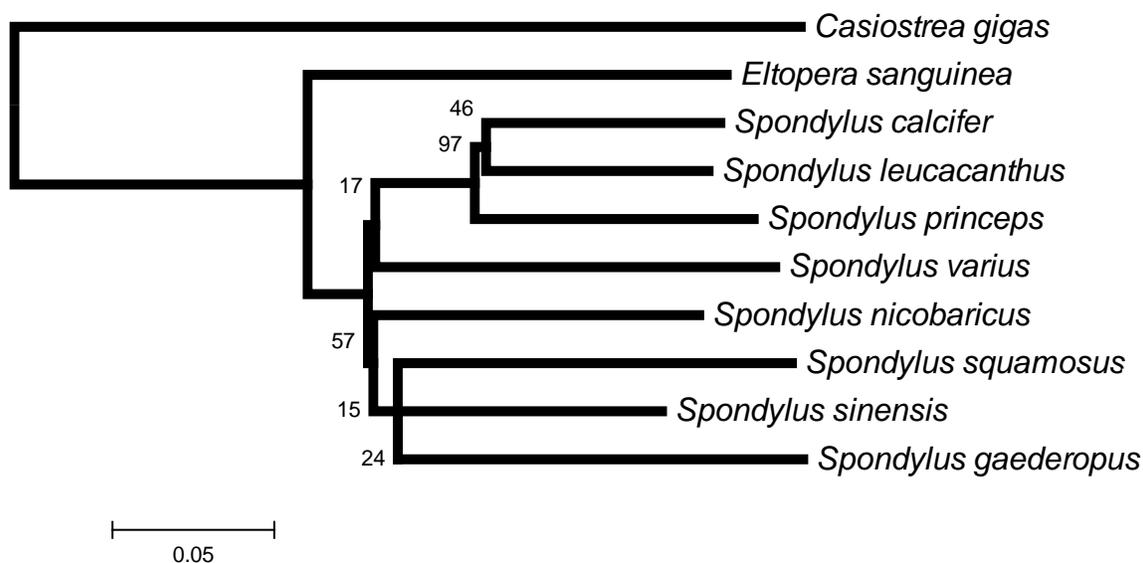


Figura 7. Topología del árbol de *Neighbor-Joining* (Kimura 2 – parámetros) utilizando secuencias (Haplotipos) de la región del COI del ADNmt en ocho especies del género *Spondylus*, e incluyendo adicionalmente la especie *Eltopera sanguinea* y la especie *Crassostrea gigas*, (grupos externos). Los valores de los nodos corresponden al soporte estadístico utilizado con 10,000 réplicas.

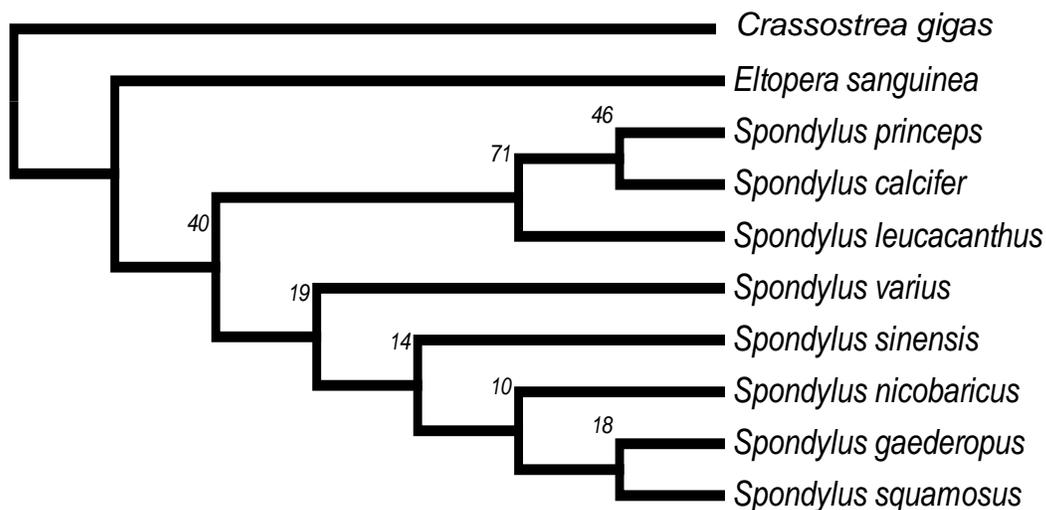


Figura 8. Topología del árbol de Máxima Parsimonia, utilizando secuencias (Haplotipos) de la región del COI del ADNmt en ocho especies del género *Spondylus*, e incluyendo la especie *Eltopera sanguinea* y la especie *Crassostrea gigas* (grupos externos). Los valores de los nodos corresponden al soporte estadístico utilizado con 10,000 réplicas.

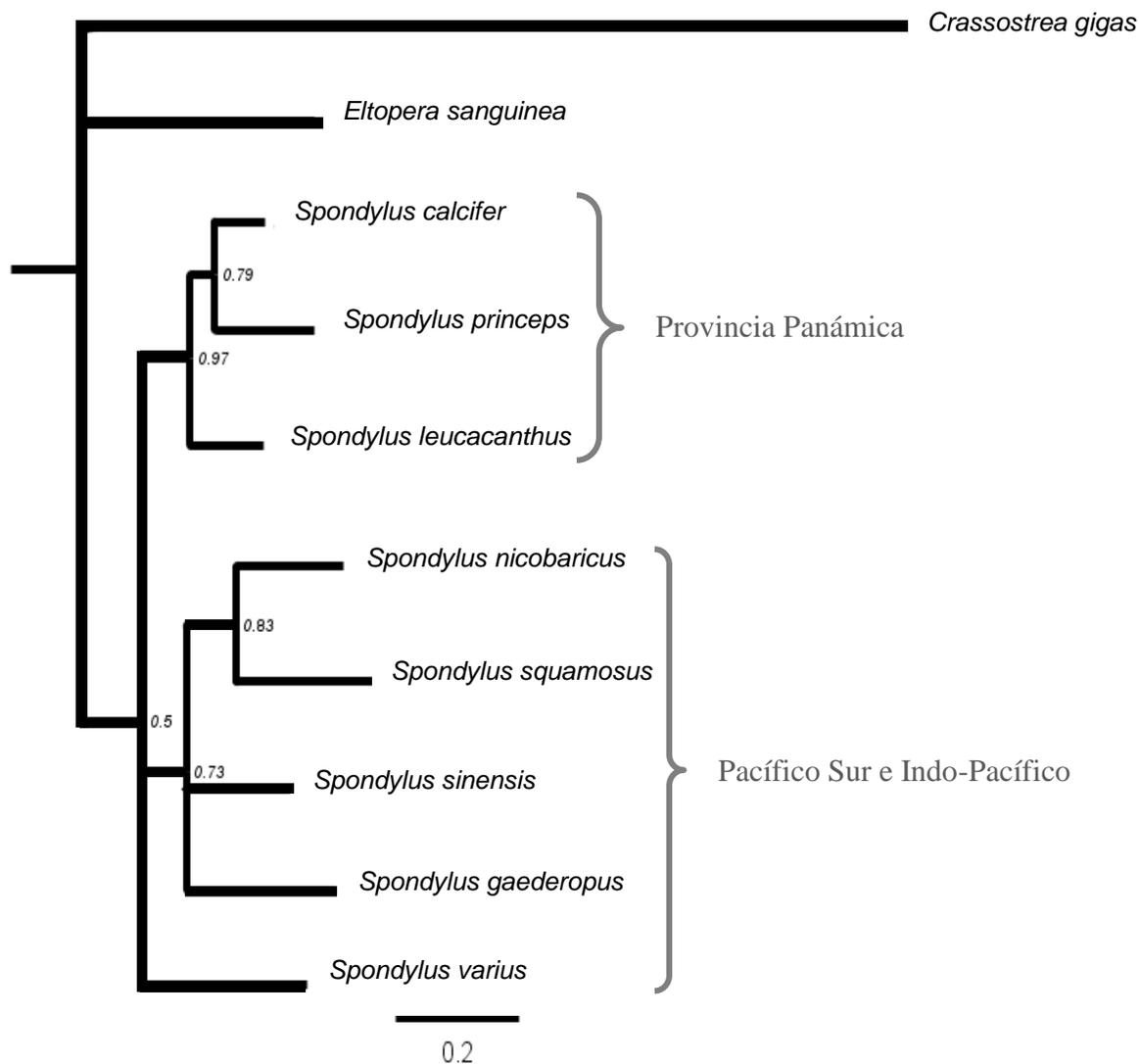


Figura 9. Topología del árbol Bayesiano utilizando secuencias (Haplotipos) de la región COI del ADNmt, en ocho especies del género *Spondylus*, e incluyendo la especie *Ektopera sanguinea* y la especie *Crassostrea gigas*, (grupos externos) utilizando el modelo y los parámetros arrojados por jModelTest (Tamura Nei93 + G + I, G= 0.61, I= 0.45). Los valores posteriores a los nodos corresponden al soporte probabilístico utilizado con 1,000,000 de generaciones, con una frecuencia de muestra de 100.

El análisis comparativo de los tres morfotipos del género *Spondylus*, se realizó aplicando un Análisis de Variables Canónicas (AVC). Dicho análisis generó dos variables canónicas estadísticamente significativas, que soportaron la existencia de morfotipos distintos (Lambda de Wilks (Λ)= 0.01, $P < 0.001$, VC1; Lambda de Wilks (Λ) = 0.1, $P < 0.001$; VC2). Cuando el valor de lambda de Wilks es pequeño

la variabilidad total se debe a las diferencias entre grupos. La VC1 representó el 79.8% de la varianza total, y estuvo relacionada con la diferenciación morfológica existente entre *S. calcifer* y las otras dos especies. El resto de la varianza (20.2%) explicado por VC2, refleja la diferencia entre *S. leucacanthus* y las otras dos especies. De esta manera, estos resultados muestran que los morfotipos *S. princeps* y *S. leucacanthus* mantienen mayor similitud morfológica respecto a la forma de la concha (Figura 10).

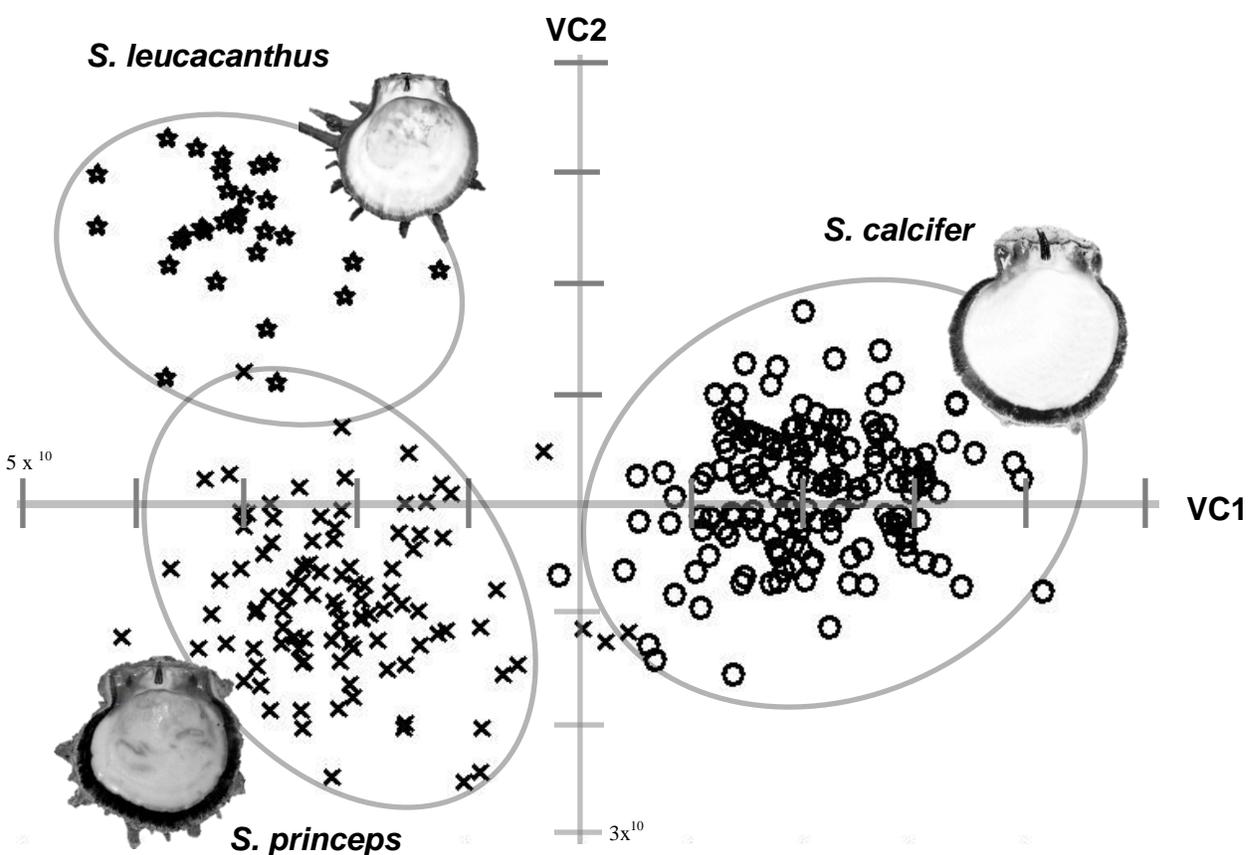


Figura 10. Gráfica del Análisis de Variables Canónicas correspondiente al contorno de la forma de la concha en las tres especies de *Spondylus*: *S. calcifer* (círculo), *S. princeps* (cruz) y *S. leucacanthus* (estrella).

Las diferencias previamente descritas fueron también visualizadas a partir de las distancias cuadráticas de Mahalanobis, las cuales soportan tres diferentes morfotipos (correspondientes a las tres especies genéticamente sustentadas) e indican que el morfotipo de *S. leucacanthus* es más cercano al morfotipo de *S. princeps*, y más distante al morfotipo de *S. calcifer*.(Figura 11).

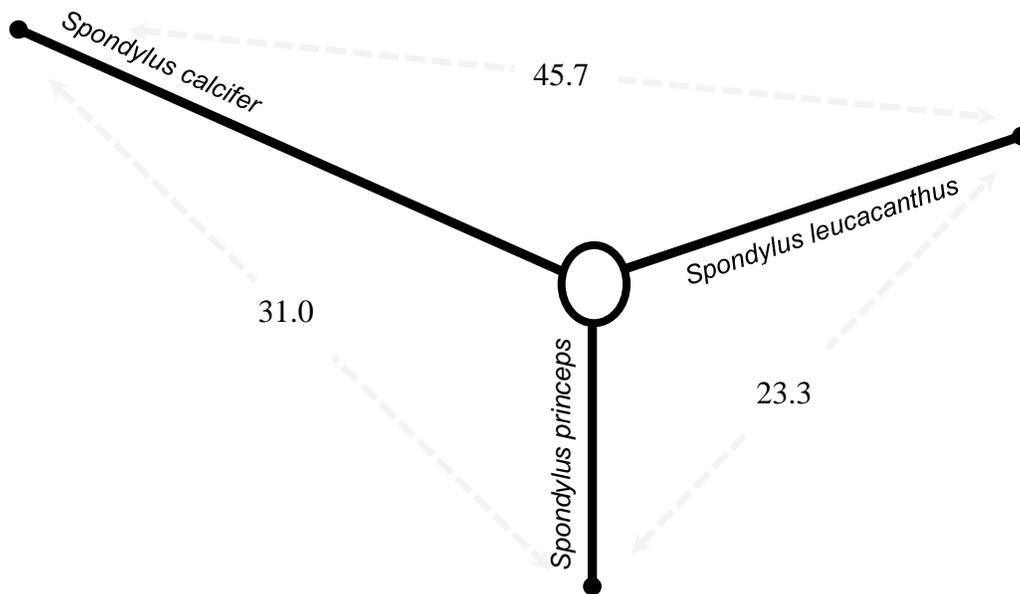


Figura 11. Árbol sin enraizar que muestra la distancia morfométrica de los tres morfotipos estadísticamente separados. Lo anterior utilizando distancias cuadráticas de Mahalanobis ($P < 0.001$).

El porcentaje de asignación correcta fue en promedio del 99.2% para los tres morfotipos. Basado en los resultados anteriores se soporta la idea de que existen tres morfologías estadísticamente distintas que sustentan la distinción de tres especies distintas (Tabla 5).

Tabla 5. Matriz de asignación correcta del género *Spondylus*, basada en las distancias cuadráticas de Mahalanobis de la forma de la concha.

Especies	<i>Spondylus calcifer</i>	<i>Spondylus princeps</i>	<i>Spondylus leucacanthus</i>	Total	(%) asignación correcta
<i>Spondylus calcifer</i>	150	2	0	152	98.7
<i>Spondylus princeps</i>	0	103	1	104	99.0
<i>Spondylus leucacanthus</i>	0	0	30	30	100.0
Total/Promedio	150	105	31	286	99.2

Se realizaron análisis exclusivamente con aquellas marcas relacionadas al contorno de la charnela, con la finalidad de evaluar el poder discriminante de esta zona de la concha. Los resultados del AVC-MANOVA soportan diferencias estadísticamente significativas a partir de las dos variables canónicas (Λ wilk's=0.097, $p < 0.01$ para la VC1; Λ Wilk's=0.46, $p < 0.01$ para la VC2), en donde el 76.3% de la varianza total es explicada por el VC1 y el 23.75% por la VC2. De lo anterior, se puede observar que la separación de los grupos se sigue manteniendo aún después de considerar únicamente la forma de la charnela (Figura 12), sin embargo el poder discriminante disminuyó, como puede apreciarse de la reducción de las distancias cuadráticas de Mahalanobis entre los grupos (Figura 13) y en consecuencia en la ligera disminución de los porcentajes correctos de clasificación (Tabla 6).

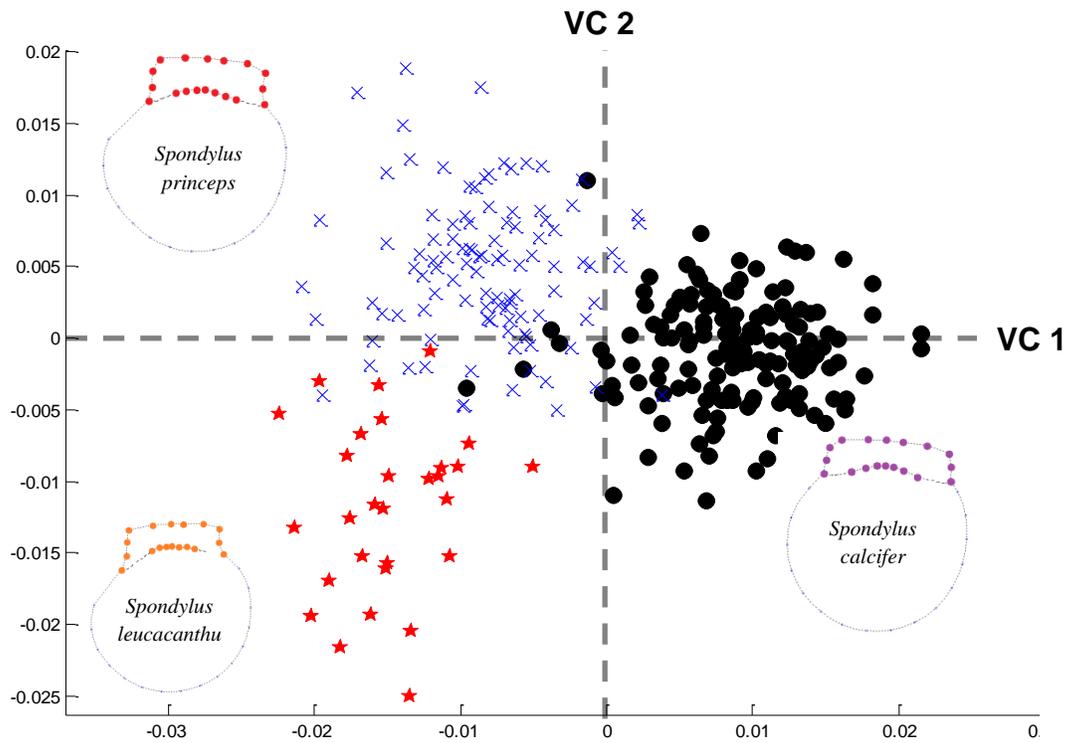


Figura 12. Gráfica del Análisis de Variables Canónicas correspondiente al contorno de la charnela de la concha en las tres especies de *Spondylus*: *S.calcifer* (círculos), *S. princeps* (cruz) y *S. leucacanthus* (estrella).

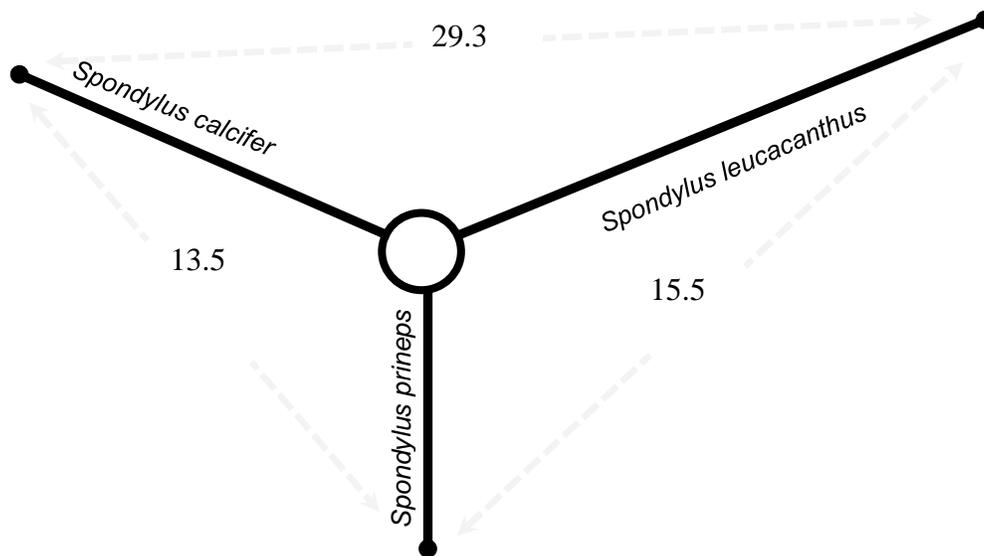


Figura 13. Árbol no enraizado de las distancias cuadráticas de Mahalanobis de las marcas que delimitan el contorno de la charnela, mostrando a su vez tres morfotipos estadísticamente separados, $P < 0.001$.

Tabla 6. Matriz de asignación correcta del género *Spondylus*, basada en las distancias cuadráticas de Mahalanobis de la forma de la concha.

Especies	<i>Spondylus calcifer</i>	<i>Spondylus princeps</i>	<i>Spondylus leucacanthus</i>	Total	(%) asignación correcta
<i>Spondylus calcifer</i>	147	5	0	152	96.71 %
<i>Spondylus princeps</i>	2	99	3	104	95.19 %
<i>Spondylus leucacanthus</i>	0	1	29	30	96.66 %
Total / Promedio	149	105	32	286	96.18

Variabilidad Intra-Específica de *Spondylus calcifer*

i. Datos moleculares

Los valores estimados de diversidad genética fueron relativamente similares en los ocho sitios de colecta. Los tamaños de muestra fueron distintos entre las localidades; sin embargo, éstos no mostraron una relación directa con el número de haplotipos ($r= 0.48$; $P=0.228$), con la diversidad Haplotípica ($r=0.46$, $P=0.248$) o diversidad nucleotídica ($r=0.51$, $P=0.194$). Estos dos últimos indicadores de diversidad también fueron relativamente similares entre las localidades. Los valores de diversidad más bajos se encontraron en Agua Verde y los más altos en Las Cruces (Tabla 7).

A partir del AMOVA se encontró que el mayor porcentaje de varianza estuvo asociado a las diferencias genéticas encontradas dentro de las poblaciones (99.39%), más que a las encontradas entre poblaciones (0.61%). Con base en estos datos las diferencias entre las poblaciones no fue estadísticamente significativa ($\Phi_{st} = 0.00621$, $P = 0.139$). Con respecto a las comparaciones pareadas se encontró que el único par de localidades que fueron diferentes entre sí, fue Santa Rosalía y Ángel de la Guarda ($\Phi_{st} = 0.0222$, $P= 0.0439$); aunque esta diferencia fue marginal. Después de ajustar el nivel de significancia (0.00625) mediante la corrección de Bonferroni por realizar comparaciones pareadas, las

diferencias entre ambas localidades no fue estadísticamente significativa (Tabla 8).

Tabla 7. Diversidad genética del gen COI en *S. calcifer* en los ocho sitios de recolecta. *nh* indica el número de haplotipos. Los valores de diversidad están acompañados de la desviación estándar.

Sitios de Colecta	<i>n</i>	<i>nh</i>	Diversidad Haplotípica	Diversidad Nucleotídica
Isla Tiburón	29	7	0.4286 +/- 0.1142	0.0011 +/- 0.00101
La Cholla	32	9	0.6391 +/- 0.0925	0.0015 +/- 0.00128
Ángel Norte	32	9	0.5645 +/- 0.1006	0.0016 +/- 0.00128
Bahía de los Ángeles	46	9	0.5662 +/- 0.0838	0.0016 +/- 0.00128
Santa Rosalía	30	10	0.6391 +/- 0.0987	0.0020 +/- 0.00153
Agua Verde	37	7	0.3453 +/- 0.1002	0.0009 +/- 0.00093
Las Cruces	18	9	0.7582 +/- 0.1056	0.0028 +/- 0.00199
Pacífico	11	5	0.6182 +/- 0.1643	0.0018 +/- 0.00152
Total	235			

*ver Anexo 2. Tabla de frecuencias haplotípicas para *Spondylus calcifer*.

Tabla 8. Comparaciones pareadas de los valores de Φ_{st} estimados a partir del COI, entre las localidades de *Spondylus calcifer*. Los valores sobre la diagonal representan el valor de Φ_{st} (Tamura-nei), mientras que los valores bajo la diagonal indican los niveles de significancia. En negritas (*) se indican las comparaciones estadísticamente significativas a un nivel de 0.05.

Localidades	Isla Tiburón	La Cholla	Ángel Norte	B. de los Ángeles	Santa Rosalía	Agua Verde	Las Cruces	Pacífico
Isla Tiburón		-0.005	0.002	0.001	-0.004	-0.013	0.022	0.002
La Cholla	0.563		0.021	0.013	-0.002	-0.001	0.024	0.008
Ángel Norte	0.309	0.075		0.001	0.022 *	0.008	0.019	-0.009
B. de los Ángeles	0.423	0.125	0.354		0.007	-0.001	0.023	-0.018
Santa Rosalía	0.637	0.516	0.043 *	0.207		0.000	0.013	-0.001
Agua verde	0.924	0.481	0.174	0.437	0.488		0.017	-0.008
Las Cruces	0.117	0.092	0.122	0.084	0.206	0.150		-0.015
Pacífico	0.460	0.303	0.551	0.692	0.510	0.527	0.655	

El haplotipo más frecuente (Haplotipo_1) en el total de sitios fue también el más importante a nivel local. No se aprecia una relación entre la similitud genética y la procedencia geográfica de los individuos (Anexo 2; Figura 3; Figura 14).

Los resultados de las pruebas de neutralidad (D de Tajima y F de Fu) indicaron valores negativos de los parámetros y en todos los casos fueron estadísticamente significativas, indicando una desviación a la neutralidad (Tabla 9). Cabe mencionar que en solo un caso (Las Cruces) la prueba de D de Tajima no fue significativa. Las sumas de las desviaciones cuadradas (SSD) no fueron significativamente diferentes de cero (Tabla 9) y en todos los casos se observó una tendencia unimodal (Fig. 5). De esta manera, ambos análisis soportaron eventos de expansión poblacional repentina.

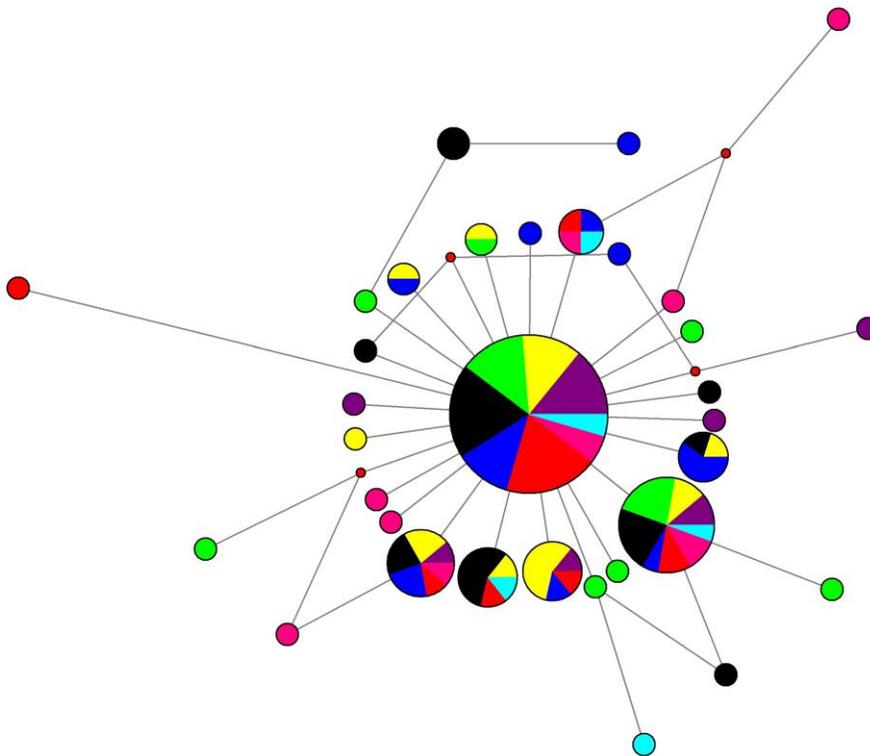
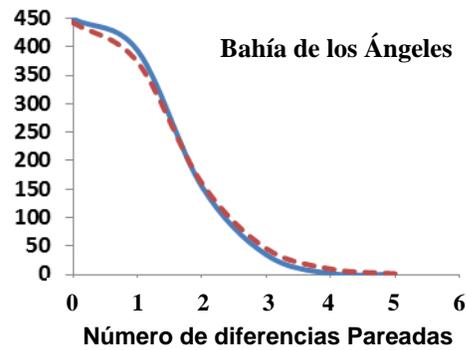
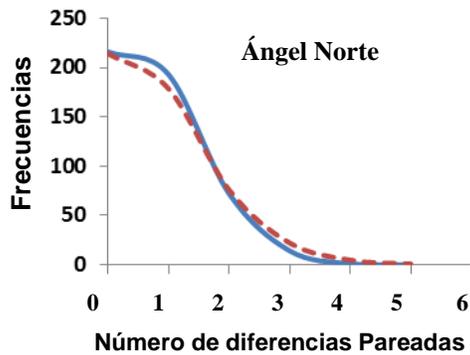
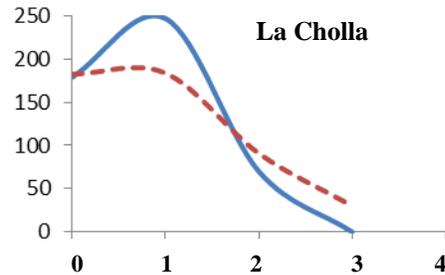
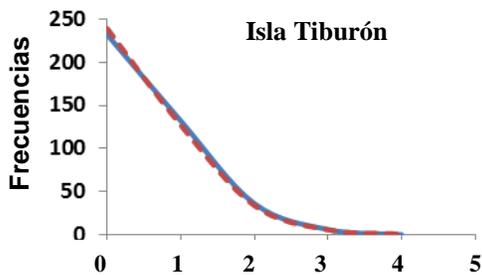


Figura 14. Red de mínima expansión (*median joining*) realizada a partir de las similitudes existentes entre las secuencias del gen Citocromo Oxidasa sub-unidad I, de *Spondylus calcifer* provenientes de 8 localidades estudiadas del Golfo de California y Pacífico mexicano. Las porciones de color morado corresponden a Isla Tiburón, en amarillo a La Cholla, en verde a Ángel Norte, en negro a Bahía de los Ángeles, en azul a Santa Rosalía, en rojo a Agua Verde, en rosa a Las Cruces y en agua a Pacífico (Guerrero y Oaxaca). El tamaño de los círculos es proporcional a su frecuencia.

Tabla 9. Resultados de las pruebas de neutralidad “D” de Tajima y “F” de Fu, y los valores de las sumas de las desviaciones cuadradas del análisis de la distribución de las diferencias pareadas bajo el modelo de expansión repentino. En paréntesis se muestran los valores estadísticos de (p) para el análisis de las poblaciones de *Spondylus calcifer*.

Localidad	“D” de Tajima	“F” de Fu	SSD
Isla Tiburón	-2.0650 (0.0050)	-5.2350 (0.0000)	0.0013 (0.6500)
La Cholla	-1.8175 (0.0130)	-6.5397 (0.0000)	0.0186 (0.0770)
Ángel Norte	-2.0047 (0.0050)	-6.5992 (0.0000)	0.0010 (0.8290)
Bahía de los Ángeles	-1.7473 (0.0160)	-5.5556 (0.0010)	0.0004 (0.6900)
Santa Rosalía	-2.2055 (0.0030)	-7.0337 (0.0000)	0.0044 (0.4510)
Agua Verde	-2.1677 (0.0060)	-5.3264 (0.0000)	0.0055 (0.5250)
Las Cruces	-1.2791 (0.0990)	-5.8721 (0.0000)	0.0058 (0.5040)
Pacífico (Gue-Oax)	-1.7910 (0.0180)	-2.3099 (0.0090)	0.0002 (0.9950)



(siguiente página)

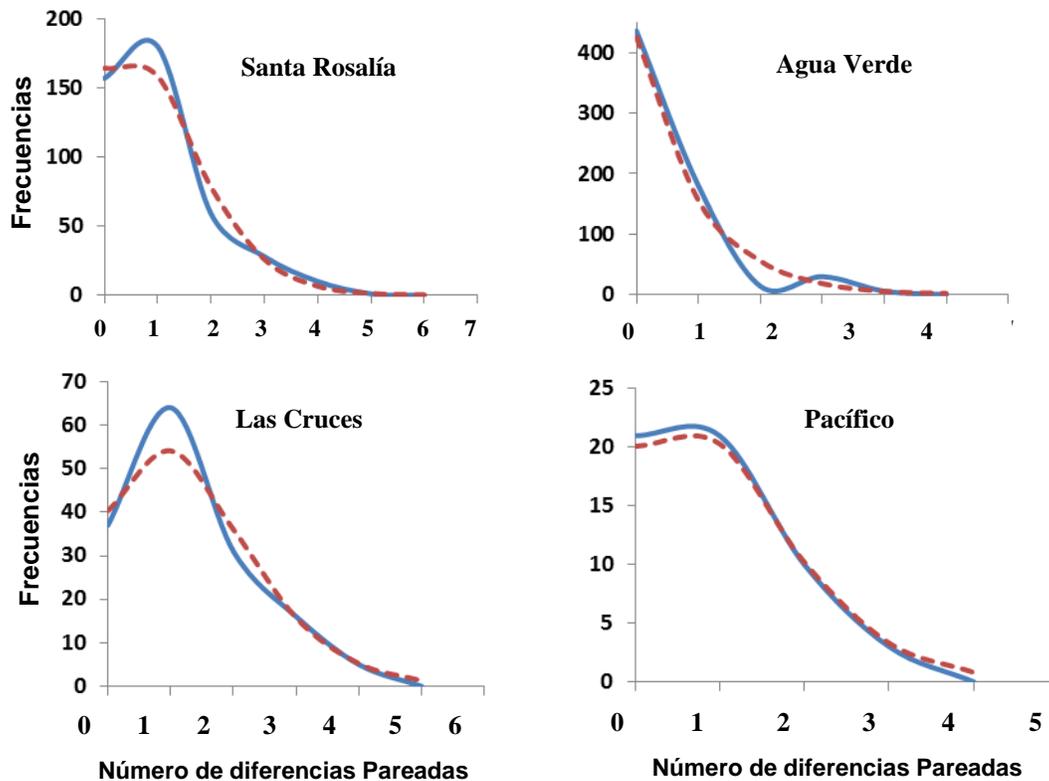


Figura 15. Distribuciones de las frecuencias las diferencias pareadas “Mismatch Distributions” del COI en *S. calcifer*: en donde la línea punteada representa las frecuencias esperadas calculadas basados en un modelos de expansión demográfica poblacional (Rogers, 1995), mientras que la línea continua representan las frecuencias de las distribuciones pareadas observadas. Las frecuencias hacen referencia al número de iteraciones pareadas que muestran un “x” numero de diferencias nucleotídicas

ii. Datos morfométricos

La forma del contorno de la concha indicó diferencias estadísticamente significativos a partir de las dos primeras VCs (Λ Wilk's $\Lambda = 0.0344$, $P < 0.01$, para la VC1 y Λ Wilk's $\Lambda = 0.1310$, $P < 0.01$, para la VC2). La VC1 represento el 49% de la varianza y discriminó con mayor grado a Santa Rosalía del resto de las localidades. Una mayor discriminación fue encontrada entre Santa Rosalía y Pacífico, cuando la VC2 (21 %) fue considerada (Figura 16). Los mejores porcentajes de asignación correcta basados en las distancias cuadráticas de Mahalanobis fueron para Santa Rosalía (97.22 %) y Pacífico (Guerrero-Oaxaca) (92.85 %) (Tabla 10). La figura (16), construida a partir de las dos primeras variables canónicas, no sugiere un patrón que relacione la similitud morfológica con la distancia geográfica.

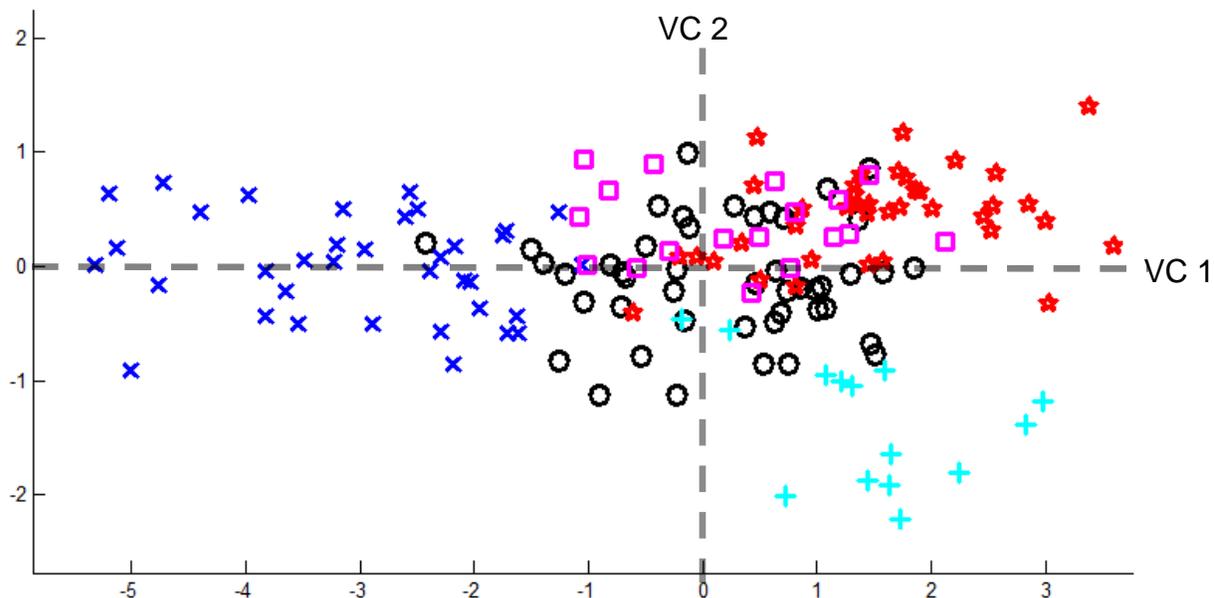


Figura 16. Gráfica del AVC intra-específico en *Spondylus calcifer* utilizando la configuración total de la concha, Bahía de los Ángeles (círculo), Santa Rosalía (X), Agua verde (estrella), Las Cruces (cuadro) y Guerrero-Oaxaca (cruz).

Tabla 10. Matriz de asignación correcta de la especie *Spondylus calcifer*, basada en las distancias cuadráticas de Mahalanobis del contorno de la concha.

Localidad	B. de los Ángeles	Santa Rosalía	Agua Verde	Las Cruces	Pacífico	Total	(%) asignación Correcta
B. de los Ángeles	39	0	1	3	3	46	84.78 %
Santa Rosalía	1	35	0	0	0	36	97.22 %
Agua Verde	2	1	35	1	0	39	89.74 %
Las Cruces	1	0	1	16	0	18	88.88 %
Pacífico	0	0	1	0	13	14	92.85 %
Total	43	36	38	20	16	153	90.7 %

iii. Variación Intra-específica basado en la configuración de la “Charnela”

Al analizar únicamente la morfología de la charnela y realizar el AVC, no se aprecia un patrón claro de separación de los grupos en las primeras dos variables canónicas siendo estas en conjunto las que expresan el 70 % de la varianza explicada para discriminar entre los grupos (VC1 Lambda Wilk's $\Lambda = 0.1563$, $P < 0.01$; VC2 Lambda Wilk's = 0.3350, $P < 0.01$; VC3 Lambda Wilk's $\Lambda = 0.5349$, $P < 0.05$), la tercera variable canónica explicó un 18% del total de la varianza (Figura 17).

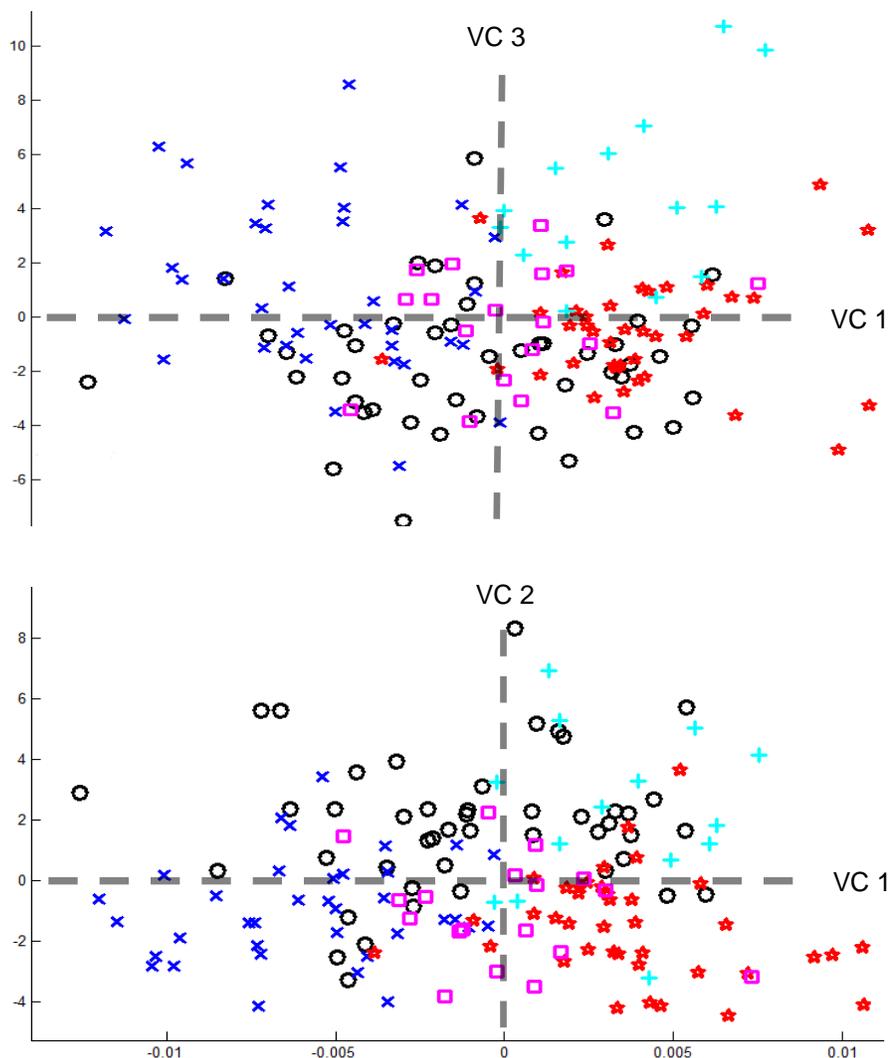


Figura 17. Gráfica del CVA-MANOVA intra-específico en *Spondylus calcifer* utilizando solo las marcas que conforman la configuración de la “Charnela”, Bahía de los Ángeles (circulo), Santa Rosalía (X), Agua verde (estrella), Las Cruces (cuadro) y Guerrero-Oaxaca (cruz).

Lo anterior sugiere una disminución en el poder discriminante al compararlo con la utilización total del contorno de la concha. Esto, se ve reflejado y soportado al comparar de igual manera la matriz de clasificación correcta utilizando solo la configuración de las marcas en la Charnela (Tabla 11).

Tabla I. Matriz de asignación correcta de la especie *Spondylus calcifer*, basada en las distancias cuadráticas de Mahalanobis, utilizando la configuración que delimita únicamente el contorno de la “Charnela”.

Localidad	Bahía de los Ángeles	Santa Rosalía	Agua Verde	Las Cruces	Pacífico	Total	(%) Asignación Correcta
B. de los Ángeles	26	7	5	6	2	46	56.52 %
Santa Rosalía	5	27	1	3	0	36	75.00 %
Agua Verde	3	1	29	6	0	39	74.35 %
Las Cruces	0	2	3	13	0	18	72.22 %
Pacífico	1	0	2	1	10	14	71.42 %
Total	35	37	40	29	12	153	69.90 %

Variabilidad Intra-Específica *Spondylus princeps*

i. Datos moleculares

El número de haplotipos fue distinto en las cuatro localidades (Tabla 12). Estas diferencias fueron principalmente afectadas por las diferencias en el tamaño de muestra, ya que ambas variables presentaron una correlación significativa ($r=0.97$; $P=0.034$). Por lo anterior, una mejor medida para comparar el número de haplotipos entre localidades puede ser la razón del número de haplotipos por secuencia. Con base en éste las cuatro localidades mostraron valores relativamente parecidos: 0.50 (6/12) para Bahía de Los Ángeles, 0.39 (11/28) para Santa Rosalía, 0.40 (16/40) para Agua Verde-Isla Danzante, y 0.33 (13/39) para la Laguna Ojo de Liebre. Los valores de diversidad haplotípica y nucleotídica fueron relativamente parecidos entre los cuatro sitios de muestreo (Tabla 12).

Estos índices no mostraron correlación con el tamaño de muestra ($r=0.09$, $P=0.91$ para la diversidad haplotípica; $r=0.70$, $P=0.30$ para la diversidad nucleotídica).

Tabla 12. Diversidad genética del COI en *Spondylus princeps* en cuatro sitios de colecta. *nh*, indica el número de haplotipos. Los valores de diversidad están acompañados de la desviación estándar.

Localidad	<i>n</i>	<i>nh</i>	Diversidad Haplotípica	Diversidad Nucleotídica
Bahía de los Ángeles	12	6	0.8485 +/- 0.0744	0.0033 +/- 0.00232
Santa Rosalía	28	11	0.8201 +/- 0.0605	0.0041 +/- 0.00262
Agua Verde-Isla Danzante	40	16	0.8564 +/- 0.0455	0.0041 +/- 0.00260
Laguna Ojo de Liebre	39	13	0.8404 +/- 0.0332	0.0037 +/- 0.00241
Total	119			

El Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) también sugirió para esta especie que la máxima varianza encontrada fue explicada por variaciones dentro de las poblaciones (97.30%), más que entre poblaciones (2.70%). El AMOVA indicó diferencias significativas ($\Phi_{st}=0.027$, $P=0.041$). En la comparación pareada de las localidades, se encontraron diferencias significativas entre Laguna Ojo de Liebre y Agua Verde-Isla Danzante ($\Phi_{st}=0.037$, $P=0.035$) (Tabla 13); aunque las diferencias no fueron significativas después de ajustar el nivel de significancia (0.0125) una vez realizada la corrección de Bonferroni. El haplotipo más frecuente (Haplotipo_3) en conjunto, también fue el más frecuente en cada localidad (Figura 18).

Tabla 13. Comparaciones pareadas de los valores de Φ_{st} estimados a partir del citocromo oxidasa sub-unidad I, entre localidades de *S. princeps*. Los valores sobre la diagonal representan el valor de Φ_{st} mientras que los mostrados debajo de la diagonal indican los niveles de significancia. En negritas se indican los valores de las comparaciones estadísticamente significativas a un nivel de significancia de 0.05.

Localidades	Bahía de los Ángeles	Santa Rosalía	Agua Verde-Isla Danzante	Laguna Ojo de Liebre
Bahía de los Ángeles		-0.009	-0.007	0.020
Santa Rosalía	0.453		0.031	0.034
Agua Verde-Isla Danzante	0.463	0.080		0.037*
Laguna Ojo de Liebre	0.190	0.052	0.035*	

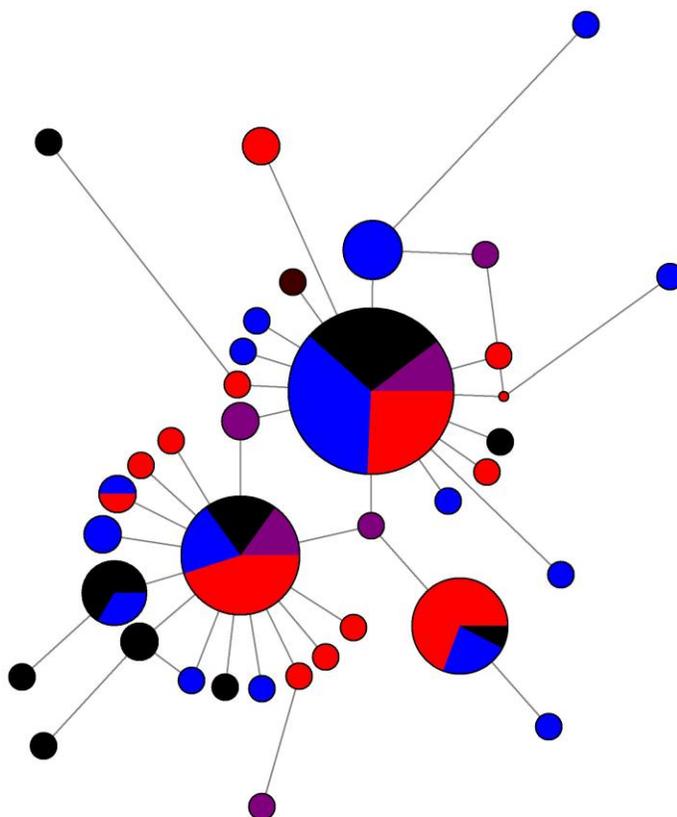


Figura 18. Red de mínima expansión (*median joining*) realizada a partir de las similitudes existentes entre las secuencias del gen COI, de *Spondylus princeps*, proveniente de cuatro sitios geográficos reconocidos, las porciones indican el número de haplotipos encontrados en Bahía de los Ángeles (morado), Santa Rosalía (negro), Agua Verde (azul) y Laguna Ojo de Liebre (rojo). El tamaño de los círculos es proporcional a su frecuencia.

Las pruebas de neutralidad F de F_u y D de Tajima, mostraron valores negativos (apoyando una expansión poblacional), sin embargo solo se encontraron valores significativos en las localidades de Agua Verde-Isla Danzante para “ D ” de Tajima y Santa Rosalía, Agua Verde-Isla Danzante y Laguna Ojo de Liebre para “ F ” de F_u . Los valores de SSD fueron muy bajos y solo en la Laguna Ojo de Liebre no se ajustaron al modelo de expansión ($P < 0.05$) (ver Tabla 14; Figura 19).

Tabla 14. Resultados de las pruebas de neutralidad “ D ” de Tajima y “ F ” de F_u , y los valores de las sumas de las desviaciones cuadradas durante el análisis de “Mismatch” bajo el modelo de expansión repentino, en los paréntesis se muestran los valores estadísticos de (p) para el análisis de las poblaciones de *Spondylus princeps*.

Localidad	“ D ” de Tajima		“ F ” de F_u		SSD	
Bahía de los Ángeles	-0.4691	(0.3520)	-1.6999	(0.0780)	0.0096	(0.5020)
Santa Rosalía	-0.9991	(0.1350)	-4.1204	(0.0160)	0.0198	(0.2020)
A. Verde-Isla Danzante	-1.6825	(0.0310)	-8.9625	(0.0000)	0.0102	(0.2030)
Laguna Ojo de Liebre	-1.1040	(0.1480)	-5.6910	(0.0040)	0.0410	(0.0110)

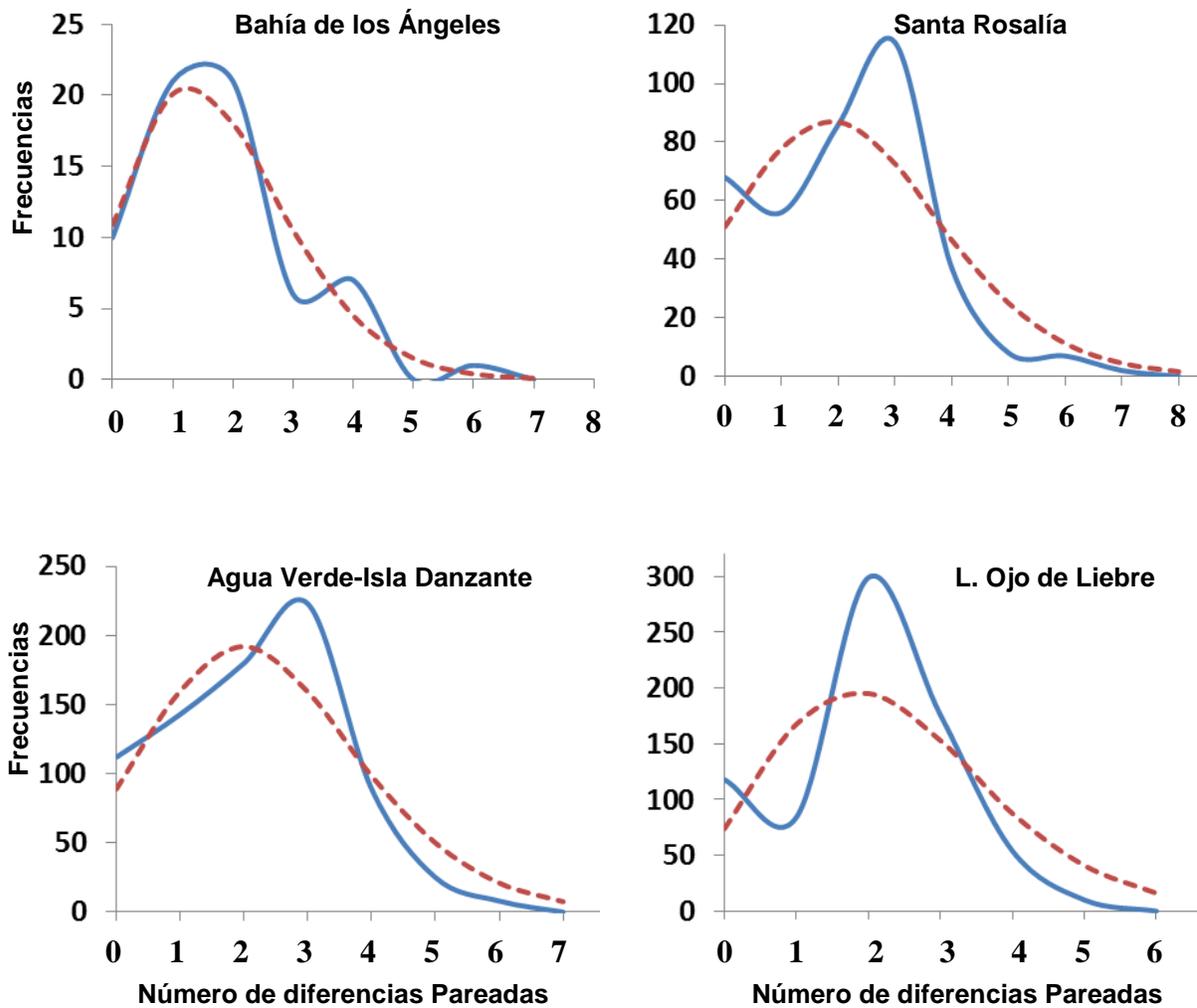


Figura 19. Las gráficas anteriores muestran las distribuciones pareadas “Mismatch Distributions” en las secuencias de COI, en *S. princeps* (localidades del Golfo de California y costa oeste de la Península de Baja California) en donde la línea punteada representa las frecuencias esperadas calculadas basados en un modelos de expansión demográfica poblacional (Rogers, 1995), mientras que la línea continua representan las frecuencias de las distribuciones pareadas observadas. De acuerdo con esto, las frecuencias hacen referencia al número de iteraciones pareadas que muestran un “x” número de diferencias nucleotídicas.

ii. Morfometría Geométrica

Para el caso de *Spondylus princeps* la primer Variable Canónica (VC1 Lambda Wilk's $\Lambda = 0.0133$, $P < 0.01$) (66% poder discriminante) separó las localidades Santa Rosalía y Agua Verde (Golfo de California) de la localidad Laguna Ojo de Liebre (Océano Pacífico). El poder discriminante de la segunda Variable Canónica (VC2 Lambda Wilk's $\Lambda = 0.0870$, $P < 0.01$) (34 % de poder discriminante) permitió separar las formas de las localidades dentro del Golfo de California (Santa Rosalía de la localidad de Agua Verde) (Figura 20).

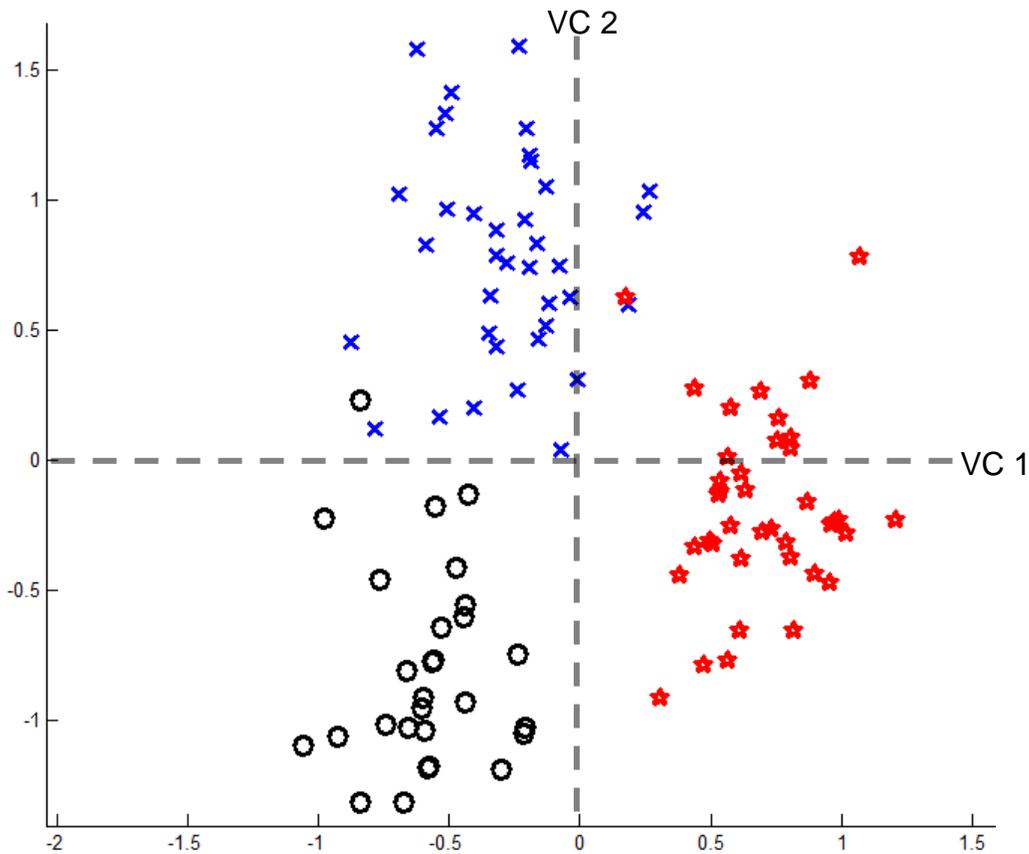


Figura 20. Gráfica del AVC intra-específico en *Spondylus princeps*, Santa Rosalía (círculo), Agua Verde (X) y Laguna Ojo de Liebre (estrella).

Mediante el uso de distancias cuadráticas de Mahalanobis, se realizó una matriz de clasificación correcta, misma que permitió identificar acertadamente en un 96% los especímenes de *Spondylus princeps* de la localidad de Santa Rosalía y un 97% de las localidades de Agua Verde y Laguna Ojo de Liebre, obteniendo un promedio de clasificación correcta del 97% entre las tres localidades (Tabla 15)

Tabla 15. Matriz de asignación correcta de la especie *Spondylus princeps*, basada en las distancias cuadráticas de Mahalanobis, utilizando la configuración que delimita todo el contorno de la concha.

Localidades	Santa Rosalía	Agua Verde	Laguna Ojo de Liebre	Total	(%) Asignación Correcta
Santa Rosalía	27	1	0	28	96.42 %
Agua Verde - Isla Danzante	1	36	0	37	97.29 %
Laguna Ojo de Liebre	0	1	38	39	97.43 %
Total	28	38	38	104	97.05 %

iii. Variación Intra-específica basado en la configuración de la “Charnela”

A diferencia de *S. calcifer*, en *S. princeps* no disminuyó el poder discriminante al solo incluir en el AVC la configuración de la región de la Charnela. La VC1, fue la única variable estadísticamente significativa (Lambda de Wilk’s $\Lambda = 0.2389$, $P < 0.01$), con un poder discriminante del 73% del total de la varianza explicada. Fue capaz de separar a los tres grupos (Localidades) (Figura 21), sin embargo en la matriz de asignación correcta basada en las distancias cuadráticas de Mahalanobis (Tabla 16), los porcentajes de clasificación se vieron disminuidos en un 83%, contra el 97% utilizado el contorno de la concha.

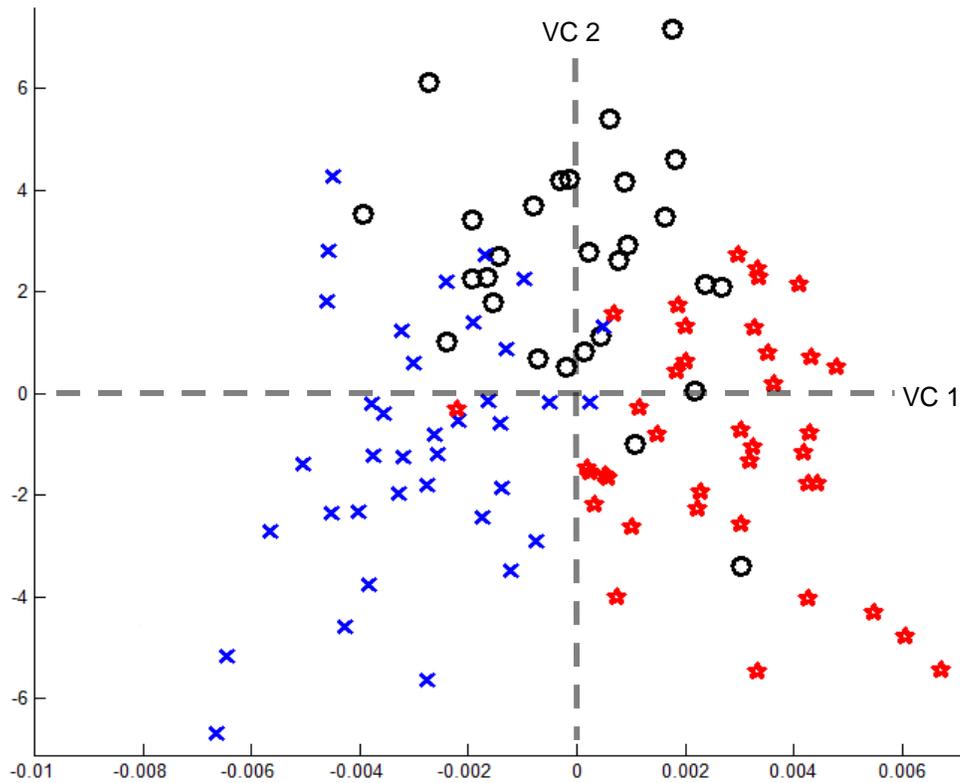


Figura 31. Gráfica del AVC intra-específico en *Spondylus princeps* utilizando solo las marcas que conforman la configuración de la “Charnela”, Santa Rosalía (círculo), Agua Verde (X) y Laguna Ojo de Liebre (Estrella).

Tabla 16. Matriz de asignación correcta de la especie *Spondylus princeps*, basada en las distancias cuadráticas de Mahalanobis, utilizando la configuración que delimita únicamente el contorno de la charnela”.

Localidad	Santa Rosalía	Agua Verde	Laguna Ojo de Liebre	Total	(%) Asignación Correcta
Santa Rosalía	22	2	4	28	78.57 %
Agua Verde	7	30	0	37	81.08 %
Laguna Ojo de Liebre	3	1	35	39	89.74 %
Total	32	33	39	104	83.13

VIII. DISCUSIÓN

Aspectos taxonómicos

A partir de los resultados encontrados en el análisis molecular se soporta que para la provincia Panámica existen tres entidades taxonómicas que integran el género *Spondylus*. Los porcentajes de divergencia con base en el COI sustentan fuertemente lo anterior. La longitud de las ramas del árbol de *Neighbor-Joining* (Fig. 5), relacionadas con los altos porcentajes de divergencia entre clados respecto a los bajos porcentajes de divergencia dentro de cada clado apoyan un resultado robusto que sugiere que los tres grupos deben ser reconocidos como entidades taxonómicas distintas. Lo anterior da soporte a la propuesta de Skoglund y Mulliner (1996) quienes sugieren la existencia de tres entidades taxonómicas distintas a nivel de especie.

Los métodos de morfometría geométrica basados en el contorno de la forma de la concha y de la forma de la charnela apoyaron también la existencia de tres morfotipos discretos, cada uno relacionado con cada una de las tres entidades reconocidas mediante las distancias genéticas. Los porcentajes de asignación correcta observados en este estudio, utilizando el contorno de las conchas, fueron altos (99.2 %) comparados con otros trabajos publicados para vertebrados e invertebrados (Pereira y Silva, 2011, 85.0% para moluscos; Marquéz *et al.*, 2010, >88.0% para moluscos; Yakubu y Okunsebor, 2011, 98.0% para peces).

Los análisis morfométricos de la concha son comúnmente usados como una herramienta taxonómica para corroborar variaciones morfológicas a nivel local o regional en moluscos (Lam y Calow, 1988; Caetano *et al.*, 2010). Algunos trabajos se han centrado en determinar patrones en conchas de bivalvos, relación de la forma de la concha con su hábitat o diferenciación poblacional (Estebenet y Martín, 2003; Oliveira y Morales, 2010). Particularmente, la importancia de la charnela en la discriminación de especies ha sido mostrada por Pereira y Silva (2011), quienes pudieron construir un modelo para discriminar correctamente el 85.0% de los casos estudiados; este porcentaje es superior a lo obtenido de variables utilizadas comúnmente (como altura total, altura dorsal y longitud total)

para distinguir especies de bivalvos. Los valores encontrados por estos autores son relativamente bajos comparados con los observados en la presente investigación cuando se considera al contorno de la concha, pero similares utilizando solo la información de la charnela.

En las especies de *Spondylus* consideradas en el presente trabajo la forma de la concha fue distinta. Se presentaron diferencias en la anchura y altura de la charnela lo cual podría ser consecuencia de las relaciones filogenéticas de las especies o de eventos de selección natural asociados al tipo de hábitat en el cual se desarrolla cada una de ellas. Como muchas expresiones morfológicas, ambas causas deben tener cierta influencia, y en consecuencia el aspecto morfológico debe ser en parte un producto filogenético y en parte una adaptación anatómica, al tipo de sustrato y ambiente sobre el cual se desarrollan los individuos. Con respecto al tipo de sustrato, una mayor área en la charnela permitiría una mayor área de cementación y un desarrollo menor de espinas, o viceversa en el caso de *Spondylus* (Logan 1973; Hautmann, 2001).

Considerando lo anterior, los resultados de este estudio permiten reconocer la importancia de los datos genéticos en la resolución taxonómica. Otros autores previamente han sustentado sus propuestas a partir de descripciones morfológicas; sin embargo, la falta de consistencia y acuerdos sobre la sistemática del género han dado lugar precisamente a interpretaciones erróneas debido al empleo solo de las expresiones fenotípicas para la definición de las especies. La plasticidad morfológica observada en este grupo es resultado de la capacidad del genotipo de producir variantes (expresadas en distintas características: colores de la concha, tipos de espinas, tipos de hojas, tipos de ornamentaciones, entre otros) y del efecto de las presiones ambientales que éstas experimentan. Así mismo, es en parte una consecuencia de la respuesta a la variabilidad ambiental que ocurre donde las especies habitan (Schmalhausen, 1949; Levins, 1963, 1968; Bradshaw, 1965). En el presente, las variaciones encontradas en la morfología de la concha pueden ser el resultado también de las diferencias en la distribución batimétrica de las especies de *Spondylus*. *Spondylus calcifer*, es reportada por los buzos desde la zona intermareal hasta los 18 m. de profundidad. *Spondylus princeps*, se

encuentra de los 3 a los 28 m y su límite más profundo puede coincidir con el de *S. leucacanthus*, encontrándose grandes bancos de ambas especies compartiendo los mantos de coral negro. Sin embargo, *S. princeps* nunca se le ha encontrado a más de 31 m de profundidad, excepto por una sola concha recolectada en Isla La Plata, Ecuador a 32 m (Shasky, 1980). Finalmente, *S. leucacanthus*, se encuentra a profundidades de entre 25 y 90 m y raras veces se registra por arriba de los 15 m. Los grandes bancos se encuentran entre los 32 y 43 m (Shasky, 1980; Skoglund y Mulliner, 1996).

Considerando el traslape en el rango de distribución y batimetría, así como la presencia de caracteres comunes, Keen (1971) designó a *Spondylus princeps unicolor* (= *S. leucacanthus*) como subespecie de *S. princeps*. Los resultados morfométricos encontrados en el presente estudio soportan efectivamente una mayor similitud entre estas entidades; sin embargo la significancia estadística morfométrica y los análisis genéticos (que sugieren las especies filogenéticamente más distantes) indican, por una parte que se trata de dos entidades distintas y por otra, que las similitudes morfológicas deben ser producto de presiones ambientales y de un probable parentesco genético estrecho, por lo que *S. leucacanthus* debe ser considerada diferente y al mismo nivel que *S. princeps*.

La elevada diversidad morfológica presentada en grupos de moluscos ha propiciado una gran cantidad de controversias en cuanto al número total de especies que deben ser reconocidas. Mayr (2000) señala: “*Defino las especies biológicas como grupos de poblaciones naturales que procrean entre ellas y están reproductivamente aisladas de otros grupos similares. Alternativamente, se puede decir que una especie biológica es una colección (assemblage) reproductivamente cohesiva de poblaciones*”. Debido a que en general los organismos de una misma especie tienden a ser muy parecidos entre sí, una estrategia metodológica, es emplear las similitudes morfológicas (para definir especies dentro de un concepto que algunos autores denominan tipológico) para aproximarse al concepto biológico de especie; sin embargo, se ha observado que una elevada diversidad morfológica no refleja necesariamente grupos con aislamiento reproductivo o especies genéticamente distintas, tal es el caso del género *Cerion* (Gastropoda) en donde

se ha encontrado una gran cantidad de variantes morfológicas sin la existencia de grupos o clados genéticamente diferenciados (Gould *et al.*, 1974).

Aspectos Nomenclaturales en *Spondylus spp* de la provincia Panámica.

El género *Spondylus* fue propuesto por Linneo en su obra monumental *Systema Naturae*, con la especie *Spondylus gaederopus* Linneo 1758, del Mar Mediterráneo y costa Nor-Atlántica de África, como la especie tipo (Linneo, 1758: 690). Considerando al más de medio centenar de especies actualmente reconocidas dentro del género (Coan y Valentich, 2012), solo cuatro de ellas se reconocen como válidas y distribuidas en la región del Pacífico Oriental Tropical (POT), incluyendo una de las islas oceánicas (*Spondylus gloriosus* Dall, Bartsch y Rehder, 1938). Para la costa continental occidental de nuestro país se han registrado tres especies; sin embargo, su estatus taxonómico y nomenclatural ha sido largamente debatido, sobre todo en los últimos 45 años.

Los primeros trabajos sobre la taxonomía del género *Spondylus* fueron revisados por Carol Skoglund y David Mulliner, en su artículo sobre las especies habitantes de la provincia Panámica (Skoglund y Mulliner, 1996). Estos autores concluyeron que de las 13 especies citadas históricamente en la porción continental de la provincia Panámica, solo tres deberían ser reconocidas como válidas: *Spondylus princeps* Broderip, 1833, *Spondylus leucacanthus* Broderip, 1833 y *Spondylus calcifer* Carpenter, 1857. En dicho trabajo, los autores señalan que las mejores características para diferenciar a las especies de la zona son: el color de la charnela y los dientes, la profundidad de la cicatriz del callo, longitud y forma de las espinas presentes, color de la concha y del margen interno y el hábitat que ocupan.

Previo al análisis filogenético, a continuación se hace una revisión de la nomenclatura de cada especie con la intención de adoptar una postura ante las modificaciones históricas que han sufrido las denominaciones de cada entidad.

i. Clasificación taxonómica.

Reino: Animalia. Phylum: Mollusca. Clase: Bivalvia. Subclase: Pteriomorpha. Orden: Pectinoidea. Superfamilia: Pectinoidea. Familia: Spondylidae. Género: *Spondylus*. Especie:

a). *Spondylus leucacanthus* Broderip, 1833. Sinónimos: *S. ursipes* Berry, 1959: 107; *S. pictorum* "Chemnitz" non *S. pictorum* de Schröter, 1787; *S. princeps* Broderip, *auctorum* non Broderip, 1833; *S. victoriae* G. B. Sowerby II, *auctorum* non G. B. Sowerby II, 1860. Conocida como concha-espina o almeja espinosa, se distribuye desde el alto Golfo de California, en Bahía de Los Ángeles, B.C. hasta Isla la Plata, Manabí en Ecuador. En la costa occidental de la península de Baja California, se tienen registros en la Isla de Cedros, B.C.

De las tres especies de *Spondylus* distribuidas en la costa oeste de nuestro país, la almeja espinosa (*S. leucacanthus*) es la que podría afirmarse como incontrovertida taxonómicamente. Por ejemplo, en el sitio de Internet del Registro Mundial de Especies Marinas (WoRMS, por sus siglas en inglés: <http://www.marinespecies.org/index.php>- Natural History Museum Rotterdam), se ilustra a *Spondylus crassisquama* Lamarck, 1819, con una fotografía de *S. leucacanthus*. El material tipo se encuentra depositado en el Museo de Historia Natural de Londres, Inglaterra bajo el número de catálogo: NHMUK 1950.8.28.5, correspondiente a un ejemplar de la Isla La Plata, Ecuador.

b). *Spondylus princeps* Broderip, 1833. Sinónimos: *Spondylus crassisquama* Lamarck, 1819: 191; *S. dubius* Broderip, 1833a; *S. basilicus* Reeve, 1856: pl. 11; *S. princeps unicolor* G. B. Sowerby II, *auctt.*, non *S. unicolor* G. B. Sowerby II, 1847; *S. pictorum* "Chemnitz", *auctt.*, non Schreibers, 1793, ex Chemnitz ms.

Huber (2009) en una revisión de la nomenclatura de los espondílicos de la provincia Panámica, propuso la sinonimización de *Spondylus princeps* Broderip, 1833 con *Spondylus crassisquama* Lamarck, 1819, argumentando que la revisión del material tipo de esta última, depositada en el Museo de Historia Natural de

Ginebra, Suiza (No. de catálogo: MHNG 1089/5), era virtualmente idéntico a un espécimen obtenido por el autor en las inmediaciones de la Bahía de San Carlos, Sonora. En este caso, como en el de *S. calcifer*, se argumenta que existe un error en la referencia de la localidad tipo del ejemplar de Lamarck, quien la ubica como “*les mers de l’Inde*” (mares de la India). Huber (2009: 104) argumenta, basado en una comunicación personal con G. Coan (suponemos Dr. Eugene V. Coan), que como Lamarck poseía especímenes de la provincia Panámica (y de todo el mundo, suponemos también) sería más plausible “...un origen ecuatoriano o peruano para el material tipo de Lamarck”. Acto seguido, designa como lectotipo al espécimen ya referido del MHNG, con Ecuador como la localidad tipo. Como refuerzo al acto nomenclatural propuesto, Huber (2009) menciona que de más de mil ejemplares revisados por él y procedentes del mar Caribe, del Mediterráneo, África occidental, Japón y Hawaii, ninguno se asemeja al material de Lamarck. Sin embargo, un año antes, Finet y Lamprell (2008: 5-6) basados en una revisión de las colecciones históricas de Spondylidae en el MHNG, descritas por Lamarck y Chenu y en el trabajo de Lamy (1938: 288; citado por aquellos autores), establecen que *Spondylus crassisquama* Lamarck, 1819 es un sinónimo de *Spondylus foliaceus* Schreibers, 1793, una especie del Indopacífico. Este punto de vista fue también establecido por Lamprell (2006). No obstante que el trabajo de Huber (2009) se podría considerar riguroso y con planteamientos taxonómicos concluyentes, en el caso de la especie *S. calcifer*, la consideración de no someter una “reversión de la precedencia” (Artículo 23.9) a la ICNZ (2009), en aras de la estabilidad en la clasificación de las especies Panámicas, pudiera no estar sustentada (en el caso de aceptar y demostrarse que el material tipo de Lamarck procede de América). Sobre el particular, el Artículo 23, sección 23.9.1.1, asienta que: “El sinónimo senior u homonimia no ha sido usado como un nombre válido después de 1899”, mientras que la sección 23.9.1.2 dice: “El sinónimo junior u homonimia ha sido usado para un taxón particular, como su nombre válido supuesto, en al menos 25 trabajos publicados por al menos 10 autores en los 50 años inmediatos precedentes y que abarca un período de no menos de 10 años.” Para la especie *S. crassisquama* existe la duda razonable sobre su utilización como un nombre válido, aplicado para organismo alguno de la provincia Panámica

(previo a Huber, 2009), por al menos el número y frecuencia de trabajos requeridos de acuerdo a lo estipulado por el Código de Nomenclatura Zoológica (citado arriba). Lo anterior compromete el acto nomenclatural de Huber (2009) y en todo caso si se aceptara la procedencia americana del material tipo, favorecería en aras de la estabilidad nomenclatural, la reversión de la precedencia a favor del binomio *Spondylus princeps*, un nombre que ya cuenta con protección de homonimia de *Spondylus princeps* Schreibers, 1793 (ICZN, caso 3014: 2000).

c). *Spondylus calcifer* Carpenter, 1857. Sinónimos: *Spondylus limbatus* G. B. Sowerby II, 1847: 427; *S. radula* Reeve, 1856: pl. 4, *non* Lamarck, 1806; *S. smithi* Fulton, 1915: 357, *nom. nov. pro S. radula* Reeve, *non* Lamarck; *S. lamarckii* Chenu [“Hanley ms”], *auctt.*, *non* Chenu, 1845.

De acuerdo con Lamprell *et al.* (2001), después de realizar una comparación (realizada por el coautor P. Clarkson) de los especímenes recolectados por Phillip Pearsall Carpenter en el año de 1857 en el Golfo de California, con muestras recolectadas por autores en la región del Golfo Pérsico y el material tipo de *Spondylus limbatus* de George Brettingham Sowerby II, obtenido en el Golfo Pérsico (No. de catálogo: NHMUK 1846.12.4.1), llegaron a la conclusión de sinonimizar a *S. calcifer* con *S. limbatus*, invocando el principio de prioridad en el nombre y a un error (sic) en la referencia a la localidad tipo de *S. limbatus*, evento ciertamente a la fecha no cabalmente demostrado. Esta postura y acto nomenclatural de Lamprell *et al.* (2001) ha sido seguida por autores recientes (e.g. Coan y Valentich, 2008; 2012).

Sin embargo, se debe de hacer notar que los materiales tipo de ambas entidades taxonómicas, no existen para uno de los casos y para el otro, están extraviados o no han sido localizados. Así, para *S. calcifer* se conoce que el holotipo fue prácticamente destruido por el propio P.P. Carpenter en la búsqueda de organismos simbioses de su concha (Keen, 1968: 393). En el caso de *S. limbatus*, Skoglund y Mulliner (1996) han demostrado que el material tipo no se encuentra disponible o localizable (“...Without type material, which we were unable

to locate...”: Skoglund y Mulliner, 1996: 102). Esto último fue comprobado mediante una búsqueda actual en la base de datos del Museo de Historia Natural de Londres (NHMUK): <http://www.nhm.ac.uk/research-curation/scientific-resources/collections/zoological-collections/zoology-specimen-database>, utilizando los siguientes parámetros de búsqueda: “*Curation group contains Mollusca, Registration no. contains 1846.12.4.1., Kind of object contains Shell, Type status contains Holotype, Taxonomic details contains sowerby. Spondylus, Ocean contains Gulf Persian*”. Sin embargo, en comunicación personal¹ con la curadora de la sección de Moluscos del NHMUK, ella refiere al sintipo de *S. limbatus* en el acervo del museo, apoyada en una publicación de Lamprell (1998), sobre los *Spondylus* del Medio Oriente y regiones adyacentes: También comenta la razón de la ausencia de registro en la base de datos computarizada del NHMUK: “Me temo que sólo una parte de nuestra colección se encuentra en la base de datos en línea - tenemos alrededor de 8 millones de ejemplares ...” (*I’m afraid only a fraction of our collection is in the online database – we have around 8 million specimens...*). De acuerdo a la información proporcionada, el ejemplar de *S. limbatus* estaría etiquetado como sintipo (*i.e.* el autor no designó holotipo), porque G.B. Sowerby II menciona materiales adicionales de su propiedad y de la colección de Grüner en la descripción original de *S. limbatus*. Sin embargo, la ilustración de Lamprell (1998: Lámina 2, Figura 10), única evidencia física actualizada de este material tipo, demuestra con toda claridad las diferencias entre *S. calcifer* y *S. limbatus* y la semejanza morfológica de esta última, de acuerdo con el propio autor (Lamprell, 1998) con *S. coccineus* Lamarck, 1819, del Golfo Pérsico. Las diferencias observables entre *S. calcifer* y *S. limbatus* (Lamina 2, Fig. 10 de Lamprell, 1998) se denotan en: La disposición de las espinas primarias, secundarias y terciarias (estas últimas ausentes en *S. calcifer*), espinas cortas y espatuladas presentes en *S. calcifer*, largas y conspicuas en *S. limbatus*, color de las espinas naranjas en *S. limbatus*, púrpura o marrón en *S. calcifer*, mayor número y disposición de costillas radiales y espinas en *S. limbatus* que en *S. calcifer*. Finalmente el holotipo de *S. limbatus* tal como se observa en la figura

¹ Ms. Kathie Way, Senior Curator of Mollusca. Department of Life Sciences. Natural History Museum, Cromwell Road, London SW7 5BD +44 (0)2079 425186. Mayo 2013.

citada, con ambas valvas expuestas, sugiere una débil cementación con respecto a *S. calcifer*, ya que esta última presenta una cementación fuerte al sustrato. Esto hace prácticamente imposible la remoción de los organismos de la superficie de adhesión, por lo que típicamente solo se recolecta una de sus valvas (*i.e.* valva izquierda), caso contrario a *S. limbatus* quien presenta ambas valvas (*i.e.* Lámina 2, Figuras 8, 9 y 10 de Lamprell (1998)).

De esta forma, la aseveración de Lamprell *et al.* (2001) sobre la comparación de los materiales tipo de estas especies y por ende la sinonimización de *S. calcifer*, no tiene sustento alguno.

Adicionalmente, Skoglund y Mulliner (1996) designaron como lectotipo de la especie *S. calcifer*, al sintipo más completo de la serie de ejemplares recolectados por P.P. Carpenter en el Golfo de California; (No. de catálogo: USNM 715914). Este último acto nomenclatural fue omitido por Lamprell *et al.* (2001), al referir la supuesta comparación de materiales tipo de las especies citadas. Finalmente, la propuesta de Lamprell *et al.* (2001) en relación a lo aquí discutido, llevó a Coan y Valentich (2008) a afirmar que el nombre *S. limbatus* presenta una década de precedencia sobre *S. calcifer*, basando además tal afirmación en las siguientes premisas:

1. El nombre *S. limbatus* ha sido usado repetidamente en la literatura, aunque reconociendo que el uso es sobre ejemplares de otra región ["...in the wrong province" Coan y Valentich (2008: 49)].
2. Se juzga por lo tanto que *S. limbatus* no es un *nomen oblitum*, de acuerdo con el Código de Nomenclatura Zoológica (IZN, 1999).
3. Que debido a que el nombre *S. calcifer* "no es tan universalmente conocido", no se considera pertinente solicitar una petición a la Comisión Internacional de Nomenclatura Zoológica para establecer una Reversión de la Precedencia (Art. 23.9. 1-3).

Además de lo argumentado por Skoglund y Mulliner (1996) y lo expuesto anteriormente, el acto nomenclatural invocado por Lamprell *et al.* (2001) y Coan y Valentich (2008) es cuestionable por:

1. El acto nomenclatural de Lamprell *et al.* (2001) no está consumado ya que no han sido revisados los materiales tipo de *S. limbatus* del Golfo Pérsico (catalogados como ilocalizables por Skoglund y Muliner (1996)), como tampoco demostrado el error en la referencia geográfica del origen del material tipo de *S. limbatus*. Adicionalmente estos autores no han demostrado que G.B. Sowerby II, manejó simultáneamente materiales de la costa Pacífico de Norteamérica y del Golfo Pérsico en su trabajo (*i.e.* Sowerby, 1847), que diera lugar a una confusión de materiales biológicos.
2. El material tipo de P.P. Carpenter (Golfo de California) fue destruido por él mismo y Peter Clarkson y sus coautores nunca detallaron que materiales de P.P. Carpenter revisaron y bajo que protocolo, para referir sus conclusiones (Lamprell *et al.* 2001: 617).
3. El nombre de *S. calcifer* si es conocido universalmente y se ha usado en al menos 25 obras, publicadas por lo menos por 10 autores distintos, en los 50 años inmediatamente anteriores a la fecha y los cuales abarcan un período de no menos de 10 años (ICNZ, 1999: 23.9.1.2). Por lo cual, los actos nomenclaturales aquí aludidos (*i.e.* Lamprell *et al.* 2001 y Coan y Valentich, 2008) amenazarían la estabilidad universal nomenclatural o causaría confusión al respecto (ICNZ, 199: 23.9.3).
4. Por tanto lo anterior se justificaría en mayor medida, en el supuesto caso de demostrarse de manera fehaciente el error de la referencia de la localidad tipo de *S. limbatus*, una solicitud de Reversión de la Precedencia a la Comisión de Nomenclatura Zoológica, por lo argumentado en el numeral 3 inmediato anterior y en aras de la estabilidad taxonómica y para evitar la introducción de incertidumbre y confusión (ICNZ, 1999: Art. 23.9. 1-3), en favor de *S. calcifer*.

Finalmente, cabe hacer notar que algunos autores, no obstante que conocen el acto nomenclatural propuesto por Lamprell *et al.* (2001), seguido por Lamprell (2006) y Coan y Valentich (2008; 2012), han decidido continuar usando el nombre *Spondylus calcifer*, argumentando la falta de pronunciamiento al respecto de la Comisión Internacional de Nomenclatura Zoológica (e.g. Mackensen *et al.*, 2011).

Aspectos filogenéticos

Una vez realizada la revisión nomenclatural del género *Spondylus* los apartados siguientes adoptan como válidos a las siguientes especies: *Spondylus calcifer* Carpenter, 1857, *Spondylus princeps* Broderip, 1833 y *Spondylus leucacanthus* Broderip, 1833.

Con base en las consideraciones de Keen (1971) y Skoglund y Mulliner (1996), basados en rasgos morfológicos, la relación filogenética al interior del género debería mostrar una mayor cercanía entre *Spondylus princeps* y *Spondylus leucacanthus*, debido a la similitud morfológica y traslape de características que estas dos especies presentan. Sin embargo, en el presente estudio ninguno de los árboles filogenéticos basados en métodos de Máxima Parsimonia, *Neighbor Joining* y Método Bayesiano soportan esta idea. Considerando estos resultados, la similitud morfológica entre *S. princeps* y *S. leucacanthus*, como previamente fue comentado, puede ser una consecuencia importante de procesos de convergencia evolutiva relacionada con eventos de adaptación asociados con la batimetría y el tipo de hábitat, como ha sido discutido en otros trabajos (Alejandrino *et al.*, 2011).

Los análisis del contorno de la concha, así como de la charnela, permitieron diferenciar claramente a las tres especies. En contraste con los resultados obtenidos a partir de los datos morfológicos provenientes de la valva completa, la configuración obtenida únicamente con marcas en la charnela, arrojó distancias cuadráticas de Mahalanobis que sustentan los resultados basados en datos moleculares. Las variaciones en la reducción de la charnela (biso) y el área donde la valva cementa, coinciden con la conclusión de que la pérdida o reducción de la misma puede tener un profundo efecto en la evolución y diversificación fenotípica en Pectínidos (Hautman, 2001; Alejandrino *et al.*, 2011). Todos los Pectinoideos incluidos *Spondylus* poseen una etapa de desarrollo con la presencia de “biso”, el cual les permite adherirse al sustrato para posteriormente desarrollar una metamorfosis a su estado adulto, sin embargo la reducción o desarrollo de éste, dependerá del ambiente donde *Spondylus* habite (Losos, 1992; Larson y Losos, 1996). Alejandrino *et al.* (2011) sugieren que dentro de los Pectínidos los

organismos que se adhieren temporalmente a un sustrato mediante el “biso” y que pueden liberarse y reorientarse, son los más comunes dentro del grupo y fueron los que en su momento dieron origen al resto de Pectínidos. Mientras que los géneros que cementan de linajes más recientes, tales como *Crassadoma gigantea*, *Talochlamys pusio* (Mioceno), (no *Spondylus*, Cretácico), surgieron como linajes derivados de un ancestro cementante (Jurásico) (Waller, 1991; Harper *et al.*, 1996).

El género *Spondylus*, integrado por aproximadamente 76 especies (Lamprell, 2006), ha radiado en especies que no necesariamente se reconocen por su capacidad cementante en adultos. En consecuencia, las relaciones ancestro-descendencia sugeridas a partir de la morfología como *Spondylus princeps*-*Spondylus leucacanthus* (Keen, 1971) no son soportadas como causa de una relación filogenética, sino de eventos de convergencia evolutiva. *Spondylus* ha radiado en repetidas ocasiones como resultado de hábitats similares, sugiriendo de igual manera que en otros bivalvos, el alto polimorfismo ha dado como resultado una alta plasticidad fenotípica representada por potenciales adaptaciones a hábitats específicos (Stanley, 1970; Waller, 1991; 2006; Minchin, 2003; Serb *et al.*, 2011).

Los árboles filogenéticos basados en secuencias de COI permitieron también detectar el grado de relación filogenética de las especies de *Spondylus* de la provincia Panámica respecto a las otras especies distribuidas en el Indopacífico. Estos árboles muestran la presencia de dos clados; uno integrado por *S. calcifer*, *S. princeps* y *S. leucacanthus* y el otro por las especies encontradas en el Indopacífico. Debido a que la asociación entre un clado y un área geográfica determinada aporta elementos para sugerir un origen común de las especies integrantes del clado, los datos genéticos encontrados en el presente estudio indican que las especies encontradas en el Noroeste de México tuvieron un origen común a partir de un ancestro que divergió en el Pacífico Occidental. Una propuesta alterna estaría relacionada con una especiación en el Indopacífico y una posterior incursión de las especies recién formadas hacia las costas de México. Sin embargo esta hipótesis resulta menos parsimoniosa.

Para obtener una topología enraizada en los árboles filogenéticos, en el presente estudio se incorporó a *Crassostrea gigas* (Ostreidae) y *Eltopera sanguinea* (Spondylidae). Los árboles generados sustentan que la especie *Eltopera sanguinea* no representa un clado fuertemente vinculado a las especies del género *Spondylus*. Sin embargo las distancias calculadas basadas en las distancias de Kimura-2 parámetros no fueron en todos los casos más altas que las encontradas entre las especies del mismo género *Spondylus*. (Tabla 4). Lamprell (2001) y Bouchet (2012) proponen que *Eltopera* debería ser considerada como *Spondylus*; sin embargo, este último autor solo empleó datos morfológicos para tal sugerencia. Los resultados en el presente estudio soportan su propuesta, pero es necesario un mayor número de análisis para soportar dicha hipótesis.

Existen investigaciones donde el uso del COI como único marcador ha permitido realizar interpretaciones sobre la filogenia en Bivalvos (Matsumoto, 2003: Subclase Pteriomorpha; Chen *et al.*, 2009: Veneridae; Loeza-Quintana, 2009: *Atrina spp*). Sin embargo, un soporte más robusto debe ser sustentado con un mayor número de genes mitocondriales y nucleares (16SrRNA, 12SrRNA, intrones, ITS) análisis filogenéticos y la incorporación de más especies integrantes del género.

Análisis intraespecífico

i. Spondylus calcifer

Estructura poblacional

Los resultados encontrados en el presente estudio basados en secuencias de ADN de la Subunidad I del Citocromo Oxidasa (COI) no permitieron soportar que la especie *Spondylus calcifer* se encuentre estructurada en poblaciones. Resultados similares han sido observados en otros trabajos tanto en invertebrados (*i.e.* moluscos) como vertebrados marinos (*i.e.* peces) en varias regiones del

mundo (Als *et al.*, 2011; Katsares *et al.*, 2008). Particularmente, en el Golfo de California y Pacífico mexicano también existen ejemplos de trabajos que reportan baja o ausente estructura poblacional en diversas especies de moluscos, peces y crustáceos (Arnaud *et al.*, 2000; Bernardi *et al.*, 2003; Loeza-Quintana, 2009; Medina-Espinoza, 2010), empleando a su vez secuencias de ADNmt con diferentes tasas de mutación (16SrRNA, COI y Región Control).

Al igual que en *Spondylus calcifer*, existen especies marinas con altos niveles de diversidad genética intra-poblacional, mismas que muestran débil estructura poblacional debido a los altos niveles de flujo genético (Palumbi, 1992; Ward *et al.*, 1994; Waples, 1998; Donrung *et al.*, 2011). La homogeneidad genética en especies marinas puede ser mantenida por factores tales como: grandes tamaños poblacionales, alta varianza intra-poblacional, alta fecundidad, presencia de larvas pelágicas, ausencia de fuertes barreras oceanográficas o la presencia de corrientes oceánicas que pueden facilitar el flujo de genes a través de grandes distancias geográficas. En invertebrados marinos en donde los adultos son sésiles el flujo de genes podría producirse a través de la alta capacidad de dispersión de larvas planctónicas, en donde se espera que una prolongada fase larval tienda a producir una distribución más homogénea (Donrung *et al.*, 2011).

La ausencia de diferencias genéticas y morfológicas en *S. calcifer* dentro y fuera del Golfo de California podría obedecer a dos condiciones principales: 1) la biología de la especie (presencia de estadio larval), y 2) las características de los procesos oceanográficos que imperan en la región del noroeste de México. El desarrollo larval de aproximadamente 15 días en *Spondylus* (Soria *et al.*, 2010), y el patrón de circulación de las corrientes oceanográficas presentes en la península de Baja California durante la mayor parte del año, podrían estar permitiendo un elevado flujo genético vía transporte de larvas entre las localidades estudiadas a través de un modelo de estructura de "Islas" (*Islands*) (Wright, 1931; Maruyama, 1970) o "salto en salto" (*Stepping-stone*) (Kimura y Weiss, 1964).

Existe poca información de dispersión larval en el medio marino, y en particular las distancias de dispersión han sido estimadas de manera indirecta y derivadas de inferencias de datos en oceanografía, biología de larvas o genética de poblaciones

en adultos (Levin *et al.*, 1993; Palumbi, 2001; Marinone *et al.*, 2011; Marinone, 2012; Marinone y Lavin, 2012; Sanchez-Velazco *et al.*, 2013). Algunas excepciones son aquellas realizadas para larvas de especies marinas con baja dispersión (Olson, 1985; Stoner, 1992; Eckert, 2003; Díaz-Ferguson *et al.*, 2010). La duración de las larvas es variable, pero se ha encontrado que periodos de un mes son comunes en larvas planctónicas (Grantham *et al.*, 2003). Durante este tiempo, una corriente que fluye a 0.1 m/s, teóricamente podría desplazar una larva cientos de kilómetros, de esta manera la rápida propagación de larvas, explica el potencial que tienen las especies marinas para dispersarse grandes distancias (Palumbi, 2003).

En *Spondylus calcifer* el periodo reproductivo para la zona de estudio se limita a los meses de verano. El desove se inicia a principios de julio cuando la temperatura alcanza valores de entre 28° y 29°C, y termina a mediados de septiembre e incluso puede prolongarse hasta octubre. Luego, viene un periodo inactivo de noviembre a febrero, el cual termina con el incremento en la temperatura del mar durante la primavera, cuando nuevamente inicia el proceso de maduración gonadal (Villalejo-Fuerte *et al.*, 2002; Cudney-Bueno y Rowell, 2008). El desarrollo larvario de *S. calcifer* es de 15 días (Soria *et al.*, 2010); sin embargo, el tipo de alimentación (larva planctotrófica), podría permitirle extenderse a tres semanas como ocurre en otros bivalvos cuando las condiciones para asentarse al sustrato no son las favorables (Rose *et al.*, 1988; Robles-Mungaray, 2004), (²com. pers. M. Villalejo-Fuerte). De acuerdo con Hellberg *et al.* (2002), algunas especies marinas planctotróficas muestran alta similitud genética a grandes escalas geográficas, la cual se debe aparentemente al flujo de genes. Winans (1980) estudió la variación geográfica en *Chanos chanos* y proporcionó uno de los ejemplos más tempranos de este patrón. Un análisis numeroso de loci con localidades desde Filipinas hasta Hawaii, reveló un bajo nivel de diferenciación genética ($F_{st} = 0.039$) sin variación significativa en las frecuencias alélicas por más de 12,000 km.²

² M.C. Marcial Trinidad Villalejo Fuerte. CICIMAR-IPN. Laboratorio de Invertebrados. La Paz, B.C.S. Enero 2013.

Las condiciones descritas anteriormente podrían permitir que las larvas permanecieran un tiempo considerable en el plancton, ser transportadas de forma pasiva por las corrientes marinas y en consecuencia presentar una dispersión a lo largo de grandes distancias. Esta alta capacidad para la colonización de hábitat a través del transporte larval, explica el amplio intervalo de distribución que tiene esta especie, que va desde Perú hasta el alto Golfo de California (Keen, 1971; Poutiers, 1995; Skoglund y Mulliner, 1996).

Por su parte, la dinámica marina de la región puede ser delineada de la siguiente manera. Durante el verano en la parte norte del Golfo de California se presenta un giro ciclónico, el cual fue reportado por primera vez por Lavin *et al.* (1997). Durante este período, el recorrido de las larvas podría ser mayor del lado del continente, transportando dichas larvas a la costa de la península (por el alto Golfo de California), en donde mediante la corriente costera, más tarde podrían ser capturadas por los giros o la circulación del Norte del Golfo, transportándolas desde Isla Tiburón hacia la parte norte de Ángel de la Guarda y probablemente con menor fuerza al sur de Bahía de los Ángeles. Durante octubre la última etapa del reclutamiento en *Spondylus calcifer* las larvas de esta área podrían ser transportadas hacia el sureste dentro de la corriente costera continental.

En la parte media y sur del Golfo de California se podría tener un flujo genético entre localidades debido a la aparición de giros ciclónicos y anticiclónicos durante el verano (julio-octubre). Estas áreas donde las larvas recorren grandes distancias (costa continental), podrían ser vías adecuadas de interconexión entre el norte y el sur del Golfo de California y Pacífico mexicano, con distancias de dispersión de alrededor de 400 km y velocidades medias mensuales de 0.15 ms^{-1} (Marinone *et al.*, 2011; Marinone, 2012; Marinone y Lavin, 2012; Sánchez-Velasco *et al.*, 2013; Lavin *et al.*, 2013). Estas grandes distancias indican que muchos sitios al parecer bastantes separados pueden tener fuerte conectividad, sugiriendo que las pocas larvas que se dispersan, se reclutan y se reproducen entre las localidades muestreadas (a lo largo de un poco más de 2,000 km). De acuerdo con Wright (1978), un migrante por generación (de La Cholla a Guerrero-Oaxaca) sería suficiente para asegurar que el haplotipo más frecuente dentro de todas las

poblaciones fuera el más frecuente en cada una de las poblaciones. En el Golfo de California, los cambios en la circulación oceánica son importantes para la conectividad biológica y transporte de nutrientes, haciendo particularmente las costas ricas en larvas (Sánchez-Velasco *et al.*, 2009; Sánchez-Velasco *et al.*, 2013; Peguero-Icaza *et al.*, 2011). Considerando lo anterior, esta conexión genética parece ser debida en su mayoría a una reproducción aleatoria a gran escala, resultado de una amplia tolerancia ambiental, alta fecundidad y desarrollo larval moderado en *S. calcifer*, permitiendo la aparente falta de diferenciación poblacional (Palumbi, 1992, 1994; Waples, 1998; Villalejo-Fuerte *et al.*, 2002).

Con base en lo anterior, las características reproductivas de *Spondylus calcifer* y la dinámica oceanográfica (patrón de corrientes, giros ciclónicos y anticiclónicos) presentes en el Golfo de California (Marinone *et al.*, 2011; Marinone, 2012; Marinone y Lavin, 2012; Sanchez-Velasco *et al.*, 2013; Lavin *et al.*, 2013) podría ayudar a explicar los resultados hallados en el presente estudio sobre la falta de estructura poblacional de *S. calcifer* en el Pacífico mexicano y Golfo de California.

La falta de estructura poblacional también ha sido reportada en especies de cangrejos *Callinectes bellicosus* (Pfeiler *et al.*, 2005), *Pachygrapsus crassipes* (Cassone y Boulding, 2006), caracol *Strombus gigas* (Perez-Enriquez *et al.*, 2011), y callo de hacha *Atrina maura* (Loeza-Quintana, 2009), empleando secuencias del COI. Utilizando otros marcadores moleculares tampoco se ha observado estructura poblacional en el Golfo de California, tal es el caso de o reportado por Aranceta-Garza (2010) sobre el coral *Pocillopora verrucosa* quien empleo marcadores tipo microsatélites en localidades desde Loreto a La Paz BCS., y Pérez-Enríquez *et al.* (2008) sobre *Crassostrea corteziensis* en Sonora, Sinaloa y Nayarit empleando alozimas.

Otros trabajos, sin embargo, han reportado diferencias poblacionales en el gasterópodo *Cittarium pica* (Díaz-Ferguson *et al.*, 2010), en el cangrejo *Carcinus maenas* (Roman y Palumbi, 2004) y en el bivalvo *Macoma balthica* (Luttikhuisen *et al.*, 2003) empleando también secuencias de COI.

Es necesario realizar análisis genéticos adicionales, empleando marcadores moleculares con mayor variabilidad (*i.e.* región control del ADNmt y

microsatélites), que permitan inferir con más detalle la estructura poblacional y el flujo genético en *Spondylus calcifer* (Karl y Avise, 1992). Algunos estudios han proporcionado resultados alternos como consecuencia del tipo de marcador molecular empleado. Por ejemplo, el análisis poblacional en moluscos realizado por Arnaud *et al.* (2003) a partir del empleo de distintos marcadores moleculares (ADNmt, ADN nuclear, Aloximas) detectó diferencias poblacionales en función del marcador empleado. Estos autores señalan que “la diversidad del ADN mitocondrial puede ser demasiado baja para proporcionar evidencia de diferenciación poblacional” debido a que el flujo génico fue reflejado de mejor manera por el ADN nuclear.

Los resultados de los análisis morfométricos soportaron la presencia de grupos morfológicamente distintos. El grado de diferenciación no estuvo relacionado con la distancia geográfica entre las localidades, de tal manera que hubo sitios de muestreo muy distantes (Guerreo-Oaxaca y Bahía de los Ángeles con aprox. 2,000 km de separación) que no fueron los que presentaron la morfología de la concha más diferente. Considerando, lo anterior, los cambios en la morfología deben estar fuertemente influenciados por el tipo de ambiente o sustrato sobre el cual los individuos son reclutados (*S. calcifer* “cementando sobre grande complejos de rocas”; *S. princeps* “en ocasiones cementando sobre roca o sobre cascajo sin cementar”; *S. leucacanthus* “adherida a otros invertebrados tales como coral negro o sobre arenas finas”), como ha sido propuesto previamente a nivel de especie. Sánchez *et al.* (2011) sugieren que la alta variabilidad en moluscos gasterópodos aparentemente se encuentra afectada por las condiciones ambientales, por lo que es de esperarse que en organismos sésiles, como *S. calcifer*, este efecto sea aún mayor.

Demografía histórica

Los resultados relacionados con la dinámica histórica de las poblaciones indican que *S. calcifer* pudo haber experimentado un evento de expansión demográfica repentina. Esta idea es soportada por la distribución unimodal de las diferencias pareadas entre las secuencias (Rogers y Harpending, 1992) y los valores no significativos de las SSD encontrados en todas las localidades del Golfo de California y Pacífico mexicano. Lo anterior, también es soportado por las pruebas de neutralidad de D de Tajima y F de Fu en donde ambas presentaron valores negativos estadísticamente significativos (a excepción de Las Cruces “D de Tajima” $P=0.09$) (Tajima, 1989; Fu, 1997).

Los bajos niveles de diversidad nucleotídica han sido atribuidos en algunas especies marinas a eventos de expansión poblacional (Avise *et al.*, 1984; Watterson, 1984; Stamatis *et al.*, 2004). También, la presencia de pocos haplotipos en altas frecuencias y la ocurrencia de una gran cantidad de haplotipos en bajas frecuencias puede estar relacionado con una población en expansión (Watterson, 1984), ya que aún no ha ocurrido el tiempo evolutivo suficiente como para generar un elevado número de haplotipos frecuentes. En consecuencia, una baja diversidad (haplotípica y nucleotídica) podría presentarse, tal como ocurre con *S. calcifer*. El marco teórico anterior tiene que ver también con el efecto de cuello de botella y el número efectivo de individuos fundadores ya que una disminución en la abundancia, traerá consigo una menor variabilidad genética, la cual aún podrá presentarse una vez recuperado el tamaño poblacional original (Wright, 1931; Nei *et al.*, 1975; Denniston, 1978). Esta predicción fue soportada por datos experimentales con *Gambusia holdbrooki* ($h=0.143$ a 0.327) (Leberg, 1992). Quizá uno de los ejemplos más claros sobre los cambios en la variabilidad genética en función de las fluctuaciones poblacionales es el del elefante marino del norte, *Mirounga angustirostris*, documentado por Hoelzel *et al.* (2002). Los resultados de estos autores empleando muestras previas y posteriores a la reducción poblacional propiciada por la intensa explotación durante el siglo XIX, indican una disminución considerable de la diversidad genética, aun cuando la poblacional actual ya haya alcanzado un tamaño poblacional considerable.

La distribución de las diferencias pareadas fue ligeramente diferente en Isla Tiburón y en Agua Verde respecto a las otras localidades. En estos dos sitios la moda de la distribución tendió al valor de cero, lo cual indica que un gran número de comparaciones entre pares de secuencias no presentaron diferencias. Una hipótesis de lo anterior podría ser que, estos resultados estuviesen relacionados con el mayor impacto asociado a la pesca en estos sitios, reflejándose también en los bajos valores de diversidad genética encontrados en dichas localidades.

Baqueiro *et al.* (1982) calcularon las densidades poblacionales muy bajas de *S. calcifer* en Baja California Sur, de aproximadamente 1 organismo por cada 100 m². Así mismo Villalejo-Fuerte *et al.* (2002) reportaron densidades similares para el área de Loreto, B. C. S., localidad cercana a “Agua Verde”. Sin embargo, su investigación no provee estimaciones de densidad poblacional ya que su estudio fue sobre el ciclo reproductivo de la especie. En el caso del sur de Isla Tiburón, la pesca de *S. calcifer*, al igual que la de otras pesquerías mediante buceo, se inició principalmente en la comunidad de Bahía Kino desde finales de los 70’s (Cudney-Bueno, 2000; SEMARNAT, 2005). La baja diversidad genética en ambos sitios también puede deberse a un histórico bajo tamaño poblacional histórico dentro de estas localidades o al efecto combinado de ambos factores, bajo tamaño poblacional histórico y una falta de regulación pesquera.

ii. *Spondylus princeps*

Estructura poblacional

Los resultados obtenidos de la comparación de las secuencias de la COI no soportaron la existencia de poblaciones distintas en *Spondylus princeps*. La red de mínima expansión no sugirió tampoco una clara asociación entre la similitud genética y la procedencia geográfica de los haplotipos. Considerando las observaciones de Soria *et al.* (2010) para el desarrollo larval de *S. calcifer* (15

días), *S. princeps* también podría tener un período larval similar (³Com. Pers. M. Villalejo-Fuerte). De esta manera dichas larvas se deben encontrar sujetas a la ³ influencia de la dirección e intensidad de las corrientes oceanográficas que contribuyen a la homogeneización de las poblaciones. Una de las corrientes marinas más importantes que ocurre en el área de distribución de *S. princeps* es la Corriente de California, la cual es considerada la más importante sobre la costa Oeste de la Península de Baja California (Lynn y Simpson, 1987; Kessler, 2006). La fuerza y dirección de la Corriente de California podría estar originando el transporte larval a lo largo de toda la costa. El efecto ascendente de la Corriente del Oeste de México a lo largo del Pacífico mexicano, podría estar dirigiendo larvas hacia dentro del Golfo de California. Considerando la morfología de la Península y las corrientes marinas que ocurren en general en esta zona, uno podría esperar un flujo genético actual acorde con el modelo de migración en saltos entre islas (*“Island-Stepping-Stone”*, Wright, 1931; Maruyama, 1970; Kimura y Weiss, 1964) ya que la disposición de las localidades estudiadas siguen una disposición aproximadamente lineal y adyacentes a la costa. Sin embargo, las localidades más cercanas no fueron precisamente las que presentaron las diferencias genéticas menores (*i.e.* Santa Rosalía y Agua Verde). Esto podría deberse a que dentro del Golfo los giros ciclónicos y anticiclónicos locales, podrían estar dando como resultado un flujo y mezcla del material genético entre las localidades (Kessler, 2006; Marinone, 2012) alterando los resultados esperados de acuerdo con el modelo.

Una explicación parcialmente distinta a lo mencionado previamente es que exista un flujo genético limitado (sobre todo entre individuos de la costa Oeste y Este de la Península de Baja California) el cual no detectamos en este estudio. Un aspecto que llama la atención y que podría soportar lo anterior es la falta de registros y pequeñas poblaciones (bancos) o demes de *Spondylus princeps* entre Punta Eugenia y la parte sur de la Península (Keen, 1971; Poutiers, 1995; Skoglund y Mulliner, 1996). La ausencia de registros en esta área geográfica que conecta las poblaciones de los extremos de su área de distribución genera dudas sobre la

³ Ibídem

existencia de un flujo genético considerable. Adicionalmente, los valores encontrados de las comparaciones pareadas de los valores de Φ_{st} , sin bien no fueron estadísticamente significativos, en general sugieren una tendencia a presentar valores que indican una mayor diferenciación entre los organismos del Golfo de California y Pacífico que entre los organismos dentro del Golfo de California. Los datos morfométricos también coinciden con esta idea. Los resultados basados en la comparación de la forma de concha indican diferencias significativas entre las localidades y llama la atención que la principal discriminación fue entre Laguna Ojo de Liebre y Santa Rosalía y una menor diferenciación entre Santa Rosalía y Agua Verde. Esto puede ser notado a partir de la VC1 de los individuos de la Laguna Ojo de Liebre respecto a los provenientes de las otras localidades. La VC2 (con un menor poder discriminante que la VC1) discriminó las localidades de Agua Verde y Santa Rosalía. Estas diferencias podrían ser el resultado de las condiciones ambientales sobre la forma de la concha. Se ha reportado que cuando dos especies o poblaciones ocupan un nicho trófico comparable, fenotipos similares pueden ser generados, vía análoga a respuestas evolutivas (Rüber *et al.*, 1999; Rüber y Adams, 2001). La mayor diferencia de los individuos de Laguna Ojo de Liebre, podría también ser consecuencia de una menor relación filogenética. La configuración de la charnela aportó información similar a la de la forma total de la concha; solo que las distancias de Mahalanobis entre los individuos fueron menores.

La ausencia de individuos de esta especie al sur de la costa Oeste de la Península podría ser debido a una pérdida de conectividad por cambios ambientales tal como ha sido sugerido para explicar la ocurrencia de especies con poblaciones disjuntas (Bernardi *et al.*, 2003). Alternativamente, procesos de vicarianza podrían ser una explicación alterna. De esta manera, una gran cantidad de especies regionales han sido fuertemente afectadas por la complicada historia geológica de la Península; sin embargo, análisis moleculares han permitido esclarecer la biogeografía histórica, investigando las relaciones genealógicas entre los linajes de ADNmt (Riddle *et al.*, 2000; Murphy y Aguirre-León, 2002). Basados en la genealogía de varias especies, algunos autores (Upton y Murphy, 1997; Riddle *et al.*, 2000) han sugerido que la región media peninsular estaba sumergida hace 1-

1.6 millones de años, resultando en una conexión temporal entre el Golfo de California y el Océano Pacífico. Es importante señalar que una gran cantidad de divergencias geográficamente concordantes han sido encontradas en la región central peninsular, para genealogías adicionales con ADNmt en lagartijas, serpientes, mamíferos, aves y arañas (Riddle *et al.*, 2000). De acuerdo con lo anterior la estructura actual de las especies distribuidas en ambas costas de la Península podría también tener alguna influencia de su distribución histórica influida por procesos geológicos.

Deberán ser realizados esfuerzos adicionales empleando marcadores moleculares más polimórficos como secuencias de la Región Control del ADNmt o el uso de microsatélites como ha sido abordado en algunas zonas del área de distribución de *S. calcifer* (Munguía-Vega, 2010; Soria *et al.*, 2012) con la intención de tener una mejor comprensión de la estructura poblacional de *S. príncipes*.

Demografía histórica

Los valores de la SSD, relacionados con la distribución de las frecuencias de las diferencias pareadas entre las secuencias, soportan que en las poblaciones de *S. princeps* han ocurrido eventos de expansión poblacional repentina en Bahía de Los Ángeles, Santa Rosalía y Agua Verde. El patrón encontrado en Laguna Ojo de Liebre no fue estadísticamente similar al predicho por el modelo de expansión poblacional. Los valores negativos en D de Tajima soportaron un evento de expansión poblacional sólo en Agua Verde y la prueba F de Fu, soportó este evento histórico en todos los sitios, excepto en Bahía de los Ángeles (Fu, 1997). Considerando lo anterior, las localidades de Laguna Ojo de Liebre y Bahía de Los Ángeles, podrían albergar poblaciones que han sido aparentemente más estables. Las curvas obtenidas de las diferencias pareadas indican de manera relativamente más notoria para ambos sitios la presencia incipiente de más de una moda, lo cual puede ser un reflejo de poblaciones estables (Rogers y Harpending, 1992). Sin embargo, los valores de diversidad genética no fueron sustancialmente diferentes entre los cuatro sitios.

La región del COI ha sido recurrentemente utilizada para estimar la estructura poblacional y deducir relaciones filogenéticas en una gran cantidad de especies de vertebrados e invertebrados debido a su moderada variabilidad genética, que provee información valiosa para la identificación de especies, para su taxonomía, y para la validación de la posición sistemática (Moritz *et al.*, 1987; Matsumoto, 2003; Roman y Palumbi, 2004; Samadi *et al.*, 2006; Katsares *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009; De Oliveira *et al.*, 2012). Sin embargo, igual a lo sugerido para la revisión de la estructura poblacional, un análisis de la historia poblacional en *S. princeps* podría verse enriquecido de secuencias de ADN con un mayor polimorfismo que la región COI, de tal manera que se puedan detectar diferencias genéticas más sutiles a nivel poblacional.

Finalmente, llama la atención que la diversidad genética de *S. princeps* fue considerablemente mayor que la encontrada en *S. calcifer*. Estas diferencias podrían estar asociadas a un tamaño poblacional, a eventos históricos diferentes o a impactos distintos entre ambas especies como la pesca o el paso por cuellos de botella; como fue discutido previamente para *S. calcifer*.

Hipotéticamente podríamos creer que los niveles de diversidad genética asociados a éste o a efectos de explotación pesquera parecen haber tenido un mayor impacto sobre *S. calcifer* que en *S. princeps*. Lo anterior como resultado de un esfuerzo pesquero diferencial entre ellas.

IX. CONCLUSIONES

- La existencia de tres entidades taxonómicas asociadas a las tres especies reconocidas del género *Spondylus* presentes en el Pacífico mexicano y Golfo de California, se soportan con pruebas moleculares y de morfometría geométrica.
- Se reconoce la validez nomenclatural de *Spondylus calcifer* Carpenter, 1857, *Spondylus princeps* Broderip, 1833 y *Spondylus leucacanthus* Broderip, 1833.
- No se soporta que *Spondylus princeps* y *Spondylus leucacanthus* sean las especies genéticamente más cercanas, para las reconocidas dentro de la provincia Panámica, de tal manera que las similitudes morfológicas empleadas previamente para entablar su relación filogenética no sustentan dicha propuesta.
- Las especies distribuidas en el Noroeste de México comparten una mayor relación filogenética entre ellas que con las especies distribuidas en el Indopacífico.
- No se detectó una estructura genética poblacional en *Spondylus calcifer* ni en *Spondylus princeps*., por lo que las variaciones morfológicas podrían ser consideradas como variantes fenotípicas dentro de cada especie asociadas a efectos ambientales. Una explicación de estos hallazgos puede ser los procesos de deriva larval asociadas a corrientes oceánicas que incrementan el flujo genético y la homogeneización las poblaciones. Alternativamente, los resultados podrían ser debido a la inhabilidad de la COI para detectar diferencias poblacionales en estas especies.

X. RECOMENDACIONES

- Se recomienda solicitar a la Comisión Internacional de Nomenclatura Zoológica la reversión de precedencia para las especies *Spondylus calcifer*, *Spondylus princeps* y *Spondylus leucacanthus* en aras de la estabilidad taxonómica y evitar así la introducción de incertidumbre y confusión, de acuerdo con el artículo 23.9.1-3 del código de nomenclatura zoológica. La falta de pronunciamiento ha traído como consecuencia la utilización de nombres sinónimos para ambas especies (*i.e.* Mackensen *et al.*, 2011; Coan y Valentich, 2012). Dichos trabajos argumentando la falta de pronunciamiento por parte de la Comisión Internacional de Nomenclatura Zoológica.
- Es importante desarrollar un método que pueda discriminar entre especies sin la necesidad de evaluar la forma (configuración) total del espécimen, lo anterior debido a que durante la práctica en campo y en asentamientos arqueológicos de importancia ceremonial de culturas pre-cerámicas, se han encontrado piezas de *Spondylus* en mal estado (no completos, en muchas ocasiones únicamente la parte correspondiente a la Charnela) (Paulsen, 1974; Bauer y Lunniss, 2010), Dicha técnica proporcionaría información acerca de la distribución del género. Además, en estudios de arqueológicos la identificación de piezas a nivel de especie podría ayudar a conocer las posibles relaciones y conexiones entre culturas de América latina en ambos lados del continente. Lo anterior podría ser una buena opción, ya que la técnica de extracción de ADN en la concha expuestas al ambiente durante largos periodos de tiempo aún no es una opción alternativa (Geist *et al.*, 2008).
- Se recomienda realizar una mayor cantidad de análisis genéticos en las especies *S. calcifer* y *S. princeps*, con la finalidad de probar otros genes más variables del ADNmt (*i. e.* región control) u otros marcadores

moleculares tipo microsatélites, que permitan clarificar la falta de estructura poblacional en esta especie.

- Es importante realizar estudios de genética poblacional basados en marcadores tipo microsatélites o de ADNmt (región control) en la especie *S. leucacanthus*, y observar si obedecen o no a una misma estructura poblacional, como resultado de un mismo rango de distribución.
- Es necesario realizar más estudios acerca de la relación filogenética entre el género *Etopera* y *Spondylus*, que permitan dar mayor soporte a la inclusión de *Etopera* dentro del grupo de los espondilidos.

XI. LITERATURA CITADA

- Abd-Elsalam, K. A. 2003. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *African Journal Biotechnology*. **2**(5):91-95.
- Adams, D., F. Rohlf & D. Slice. 2004. Geometric morphometrics: Ten years of progress following the “revolution”. *Italian Journal of Zoology*. **71** (1): 127-133.
- Alejandrino, A., L. Puslednik & J. M. Serb. 2011. Convergent and parallel evolution in life habit of the scallops (Bivalvia: Pectinidae). *BMC evolutionary Biology*. **11**: (164): 1-9.
- Als, T. D., M. M. Hansen, G. E. Maes, M. Castonguay, L. Riemann, K. Aarestrup, P. Munk, H. Sparholt, R. Hanel & L. Bernatchez. 2011. All roads lead to home: panmixia of European eel in the Sargasso Sea. *Molecular Ecology*. **20** (7): 1333-1346.
- Anderson, L. C & P. D. Roopnarine. 2005. Role of constraint and selection in the morphologic evolution of *Caryocorbula* (Mollusca: Corbulidae) from the Caribbean Neogene. *Paleontología Electronica*. **8** (2): 32A:18p.
- Aranceta-Garza, F. 2010. *Determinación de la estructura genética del coral hermatípico Pocillopora verrucosa en el Golfo de California mediante el uso de microsatelites*. Tesis Maestría, CIBNOR. 127 pp.
- Aris-Brosou, S. & L. Excoffier. 1996. The impact of population expansion and mutation rate heterogeneity on DNA sequence polymorphism. *Molecular Biology and Evolution*. **13**: 494-504.

- Arnaud, S., M. Monteforte, N. Galtier, F. Bonhomme & F. Blanc. 2000. Population structure and genetic variability of pearl oyster *Pinctada mazatlanica* along Pacific coasts from México to Panama. *Conservation Genetics*. **1**: 299-307.
- Arnaud, S., B. Bonhomme & F. Blanc. 2003. Large discrepancies in differentiation of allozymes, nuclear and mitochondrial DNA loci in recently founded Pacific populations of the pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Journal of Evolutionary Biology*. **16** (3): 388-398.
- Atkins, D. 1936–1938. On the ciliary mechanisms and interrelationships of lamelli branches. *Quarterly Journal Microscopical Science*. 79, 181–308 (1936), 339–370 (1937), 80, 346–436 (1938).
- Avise, J. C., J. E. Neigel & J. Arnold. 1984. Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. *Journal of Molecular Evolution*. **20**: 99-105.
- Avise, J., J. Arnold, R. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J. Neigel, E. Reeb & N. Saunders. 1987. Phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between populations genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **18**: 489-522.
- Avise, J. C. 2000. Phylogeography: The history and formation of species. Harvard University Press. E. U. A. 447 pp.
- Baqueiro, C. E., J. A. Masso & H. B. Guajardo. 1982. Distribución y abundancia de moluscos de importancia comercial en Baja California Sur, México. *Instituto Nacional de la Pesca México, Serie de Divulgación*. **11**:1-32.

- Bauer, D. E. & R. Lunniss. 2010. The past in the present: *Spondylus*, place and identity. *The Latin Americanist*. 75-94 pp.
- Bernardi, G., J. Findley & A. Rocha-Olivares. 2003. Vicariance and dispersal across Baja California in disjunct marine fish populations. *Evolution*. **57** (7): 1599-1609.
- Bookstein, F. L. 1989. Principal Warps: Thin-Plate Splines and the Decomposition of Deformations. *IEEE transactions on pattern analysis and machine intelligence*. **2**(6): 567-585.
- Bouchet, P. 2012. Eltopera. Accessed through: *World Register of Marine Species* at <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=593348> on 2013-03-08
- Bradshaw, A. D. 1965. The evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Advances in Genetics Journal*. **13**: 115-155.
- Brown, W.M. 1985. The mitochondrial genome of animals. In: MacIntyre, R.J. *Molecular Evolutionary Genetics*. Ed. Plenum. New York, EUA. 95–130.
- Caetano, C. H. S., V. Scarabino & R. S. Absalão. 2010. Brazilian species of *Gadila* (Mollusca: Scaphopoda: Gadilidae): rediscovery of *Gadila elongata* comb. nov. and shell morphometrics. *Zoología*. **27**: 305–308.
- Campbell, D. C., J. M. Serb, J. E. Buhay, K. J. Roe, R. L. Minton & C. Lydeard, 2005. Phylogeny of North American amblomines (Bivalvia, Unionoida): prodigious polyphyly proves persuasive across genera. *Invertebrate Biology*. **124** (2): 131-164.

- Cassone, B. J. & E. G. Boulding. 2006. Genetic structure and phylogeography of the lined shore crab, *Pachygrapsus crassipes*, along the northeastern and western Pacific coasts. *Marine Biology*. **149**: 213-226.
- Chen, A., Z. Li & G. Feng. 2009. Phylogenetic relationship of the genus *Meretrix* (Mollusca: Veneridae) Based on Mitochondrial COI gene sequences. *Zological Research*. **30** (3): 233:239.
- Coan, E. V. & P. Valentich-Scott. 2008. Three nomenclatural notes on panamic bivalves. *The Festivus*. **XL** (4): 49-54.
- Coan, E. V. & P. Valentich-Scott. 2012. *Bivalve seashells of tropical west America: Marine Bivalve Mollusks from Baja California to Northern Perú*. Publisher: Santa Barbara Museum of Natural History: 1st edition. 1258pp.
- Cox, L.R. et al., 1969–1971. Bivalvia. In: Cox, L.R. et al. (Eds.), *Treatise on Invertebrate Paleontology*, Part N. Geol. Soc. Am. and the Univ. Press of Kansas, pp. N1–N1224.
- Cudney-Bueno, R. 2000. *Management and Conservation of Benthic Resources Harvested by Small-Scale Hookah Divers in the Northern Gulf of California, Mexico: The Black Murex Snail Fishery*. Ms. Thesis. University of Arizona. Tucson, Arizona, U.S.A. 177 pp.
- Cudney-Bueno, R. 2007. *Plan de manejo regional para el aprovechamiento y la recuperación del callo de escarlopa, Spondylus calcifer*. Documento preparado para la Dirección General de Aprovechamiento de Vida Silvestre. Centro Intercultural de Estudios de Desierto y Océanos. Puerto Peñasco, Sonora, México.

- Cudney-Bueno, R. & K. Rowell. 2008. Establishing a baseline for management of the rock scallop, *Spondylus calcifer* (Carpenter 1857): growth and reproduction in the upper Gulf of California, México. *Journal of Shellfish Research*. **27** (4): 625-632.
- Dakin, W.J. 1928a. The anatomy and phylogeny of *Spondylus*, with a particular reference to the lamelli-branch nervous system. *Proceedings of the Royal Society of London*. **103**: 337-354.
- Dakin, W. J. 1928b. The eyes of Pecten, *Spondylus*, Amusium and allied lamellibranchs, with a short discussion on their evolution. *Proceedings of the Royal Society of London*. **103**: 355-369.
- De Carvalho, M. R., F. A. Bockmann, D. S. Amorim, C. R. F. Brandão, M. De Vivo, J. L. De Figueiredo, H. A. Britski, M. C. C. De Pinna, N. A. Menezes, F. P. L. Marques, N. Papavero, E. M. Canello, J. V. Crisci, J. D. McEachran, R. C. Schelly, J. G. Lundberg, A. C. Gill, R. Britz, Q. D. Wheeler, M. L. J. Stiassny, L. R. Parenti, L. M. Page, W. C. Wheeler, J. Faivovich, R. P. Vari, L. Grande, C. J. Humphries, R. DeSalle, M. C. Ebach & G. J. Nelson. 2007. Taxonomic impediment or impediment to taxonomy? A commentary on systematics and the cybertaxonomic-automation paradigm. *Evolutionary Biology*. **34**: 140-143.
- Denniston, C. 1978. Small population size and genetic diversity. Implications for endangered species. 281-290 pp. In: S.A. Temple (ed.), *Endangered Birds: Management techniques for preserving endangered species*. University of Wisconsin Press. Madison, WI. USA.

- De Oliveira-Ribeiro, A., R. Antunes-Caires, T. Casagrande-Mariguela, L. E. Garcia-Pereira, R. Hanner & C. Oliveira. 2012. DNA barcodes identify marine fishes of Sao Paulo state, Brazil. *Molecular Ecology Resources*. **12** (6): 1012-1020.
- Díaz-Ferguson, E., R. Haney, J. Wares & B. Silliman. 2010. Population genetics of a trochid gastropod broadens picture of Caribbean Sea connectivity. *PLoS ONE*. **5** (9): e12675, 1-8.
- Donrung, P., S. Tunkijjanukij, P. Jarayabhand & S. Poompuang. 2011. Spatial genetic structure of the surf clam *Paphia undulata* in Thailand waters. *Zoological Studies*. **50** (2): 211-219.
- Eckert, G. L. 2003. Effects of the planktonic period on marine population fluctuations. *Ecology*. **84**: 372-383.
- Estebenet, A. L. & P. R. Martín. 2003. Shell interpopulation variation and its origin in *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) from Southern Pampas, Argentina. *Journal of Molluscan Studies*. **69**: 301-310.
- Excoffier, L., P. E. Smouse & J. M. Quattro. 1992. Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics Society of America*. **131**: 479-491.
- Excoffier, L. 2004. Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Mol. Ecol.* **13**(4): 853-864.

- Excoffier, L. & H. Lischer. 2011. *Arlequin Ver. 3.5. An Integrated Software Package for Populations Genetics Data Analysis*. Swiss Institute of Bioinformatics. 171 pp.
- Finet, Y. & K. Lamprell. 2008. The Spondylidae in the historical collections of the Muséum d'Histoire Naturelle, Geneva, with revision of the species described by Lamarck and by Chenu, and notes on nomenclature. *Archiv für Molluskenkund.* **137** (1): 1-73.
- Fu, Y. X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth and background selection. *Genetics.* **147**: 915-925.
- García-Rodríguez, F.J. & R. Pérez-Enríquez. 2006. Genetic differentiation of the California spiny lobster *Panulirus interruptus* (Randall, 1840) along the west coast of the Baja California Peninsula, México. *Marine Biology.* **148**: 621-629.
- Geist, J., H. Wunderlich & R. Kuehn. 2008. Use of mollusk shells for DNA-based molecular analyses. *Journal of Molluscan Studies.* **74**: 337-343.
- Giribet, G. & W. C. Wheeler. 2002. On bivalve phylogeny: a high-level analysis of the Bivalvia (Mollusca) based on combined morphology and AND sequence data. *American Microscopical Society, Inc.* **121** (4): 271-324.
- Gould, S. J., D. S. Woodruff & J. P. Martin. 1974. Genetics and Morphometrics of *Cerion* at Pongo Carpet: a new systematic approach to this enigmatic land snail. *Systematic Zoology.* **23** (4): 518-533.
- Grantham, B. A., G. L. Eckert & A. L. Shanks. 2003. Dispersal potential of marine invertebrates in diverse habitats. *Ecological Applications.* **13**: 108-116.

- Hall, B. G. 2005. *Phylogenetic trees made easy-a how to manual (second edition)*. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland. Massachusetts U.S.A. 221 pp.
- Harper, E. M., J. D. Radley & T. J. Palmer. 1996. Early Cretaceous cementing pectinid bivalves. *Cretaceous Research*. **17**: 135-150.
- Hautmann, M. 2001. Taxonomy and phylogeny of cementing triassic bivalves (Families Prospondylidae, Plicatulidae, Dimyidae and Ostreidae). *Paleontology*. **44** (2): 339-373.
- Hebert, P., M. Stoeckle, T. Sendlak & C. Francis. 2004. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology*. **2**: 1657-1663.
- Hedrick, P. W. 2005. A standardized genetic differentiation measure. *Evolution*. **59**, 1633–1638.
- Hellberg, M. E., R. S. Burton, J. E. Neigel & S. R. Palumbi. 2002. Genetic assessment of connectivity among marine populations. *Bulletin of Marine Science*. **70** (1): 273-290.
- Hoelzel, A. R., R. C. Fleischer, C. Campagna, B. J. Le Boeuf & G. Alvord. 2002. Impact of a population bottleneck on symmetry and genetic diversity in the northern elephant seal. *Journal of Evolutionary Biology*. **15**: 567-575.
- Holguín-Quiñonez, O & A. C. González-Pedraza. 1994. *Moluscos de la franja costera de Michoacán, Colima y Jalisco, México*. Dirección de publicaciones I. P. N. 133 pp.
- Huber, M. 2009. Name changes for two well-know Panamic Spondylids. *The Festivus*. **41** (7): 103-109.

- Huelsenbeck, J. & F. Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*. **17**: 754-755.
- Hudson, R. R. 1990. Gene genealogies and the coalescent process. In: *Surveys in Evolutionary Biology*. Edited by Futuyama, and J. D. Antonovics. Oxford University Press, New York. 1-44 pp.
- Huson, D. H., R. Rupp & C. Scornavacca. 2011. *Phylogenetic Networks- Concepts, Algorithms and Applications*. Cambridge University Press. United Kingdom. 362 pp.
- ICZN, 1999. International Code of Zoological Nomenclature. Editorial Committee: W.D.L. Ride, Chairman, H.G. Cogger, C. Dupuis, O. Kraus, A. Minelli, F. C. Thompson and P.K. Tubbs. Published by The International Trust for Zoological Nomenclature, c/o The Natural History Museum - Cromwell Road - London SW7 5BD – UK
- ICZN, 2000. *Spondylus princeps* Broderip, 1833 to have precedence over *S. princeps* Schreibers, 1793 (Case 3014). *Bulletin of Zoological Nomenclature*. **57** (1): 7.
- Johnson, M. P., A. L. Allcock, S. E. Pye, S. J. Chambers & D. M. Fitton. 2001. The effects of dispersal mode on the spatial distribution patterns of intertidal molluscs. *Journal of Animal Ecology*. **70**: 641-649.
- Karl, S. & J. C. Avise. 1992. Balancing selection at allozyme loci in oyster: implications from nuclear RFLP's. *Science*. **256**: 100-102.

- Katsares, V., A. Tsiora, S. Galinou-Mitsoudi & A. Imsiridou. 2008. Genetic structure of the endangered species *Pinna nobilis* (Mollusca: Bivalvia) inferred from *mtDNA* sequences. *Biología*. **63** (3): 412-417.
- Keen, A. M. 1968. West American Mollusk Types at the British Museum (Natural History) IV. Carpenter's Mazatlan Collection. *The Veliger*. **10** (4): 389-440.
- Keen, M. 1971. *Sea Shell of tropical best America. Marine mollusks from Baja California to Perú*. Standford University Press 2nd Ed. USA. 1064 pp.
- Kessler, W. S. 2006. The circulation of the eastern tropical Pacific: A review. *Progress Oceanography*. **69**: 181-217.
- Kimura, M. & G. H. Weiss. 1964. The Stepping Stone model of population structure and decrease of genetic correlation with distance. *Genetics*. **49**: 561-576.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. **16**: 111-120.
- Lam, P. K. S. & P. Calow. 1988. Differences in the shell shape of *Lymnaea peregra* (Muller) (Gastropoda: Pulmonata) from lotic and lentic habitats: environmental or genetic variance?. *Journal of Molluscan Studies*. **54**: 197–207.
- Lamprell, K.L. 1998. Recent *Spondylus* species from the Middle East and adjacent regions, with the description of two new species. *Vita Marina*. **45**(1-2): 41-60.

- Lamprell, K. L., J. Staniscic & P. Clarkson. 2001. *Spondylus* from the Mediterranean Sea and Atlantic Ocean (Mollusca: Bivalvia: Spondylidae). *Queensland. Museum, Memoirs*. **46** (2): 611-622.
- Lamprell K. L. & J. M. Healy. 2001. Spondylidae (Bivalvia) from New Caledonian and adjacent waters. *In*: P. Bouchet & B.A. Marshall (eds), *Tropical Deep-Sea Benthos*, volume 22. Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle. **185**: 111-163.
- Lamprell, K. 2006. *Spiny oyster: a revision of the living Spondylus species of the world*. Brisbane: Jean Lamprell. 119 pp.
- Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace & A. Wilm. 2007 ClustalW and ClustalX version 2.0. *Bioinformatics*. **23**, 2947–2948.
- Larson, A. & J. B. Losos. 1996. Phylogenetic systematics of adaptation. *In* *Adaptation*. Academic Press. San Diego, USA. 187-220.
- Lavin, M. F., R. Durazo, E. Palacios, M. L. Argote & L. Carrillo. 1997. Lagrangian observations of the circulation in the northern Gulf of California. *Journal of Physical Oceanography*. **27**: 2298-2305.
- Lavín, M. F., R. Castro, E. Beier & V. M. Godínez. 2013. Mesoscale eddies in the southern Gulf of California during summer: Characteristics and interaction with the wind stress. *Journal of Geophysical Research: Oceans*. **118**: 1-15.
- Leberg, P. L. 1992. Effects of population bottlenecks on genetic diversity as measured by allozyme electrophoresis. *Evolution*. **46** (2): 477-494.

- Lee, M. 2004. The molecularization of taxonomy. *Invertebrate Systematics*. **18**: 1-6.
- Lemey P., M. Salemi & A. M. Vandamme. 2009. *The Phylogenetic Handbook: A practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing*. Cambridge University Press. United Kingdom. 723 pp.
- Levin, L. A., D. Hugget, P. Myers, T. Bridges & J. Weaver. 1993. Rare-earth tagging methods for the study of larval dispersal by marine-invertebrates. *Limnology and Oceanography*. **38**: 246-360.
- Levins, R. 1963. Theory of fitness in a heterogeneous environment. II. Developmental flexibility and niche selection. *The American Naturalist*. **47**: 75-90.
- Levins, R. 1968. *Evolution in Changing Environments*. Princeton University Press, Princeton. EUA. 123 pp.
- Librado P. & J. Rosas. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. **25**: 1451-1452.
- Linnaeus, C. 1758. *Systema Naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Editio decima, reformata. Laurentius Salvius: Holmiae. ii, 824 pp.
- Loeza-Quintana, T. D. R. 2009. *Evaluación de la estructura genético-poblacional del callo de hacha *Atrina maura* en aguas de Baja California Sur mediante la caracterización de secuencias Citocromo Oxidasa I*. Tesis de

Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz B. C. S. 77 pp.

- Logan, A. 1973. Morphology and life habitats of the recent cementing bivalve *Spondylus americanus* Hermann from the Bermuda platform. *Bulletin of Marine Science*. **24** (3): 568-594.
- Losos, J. B. 1992. The evolution of convergent structure in Caribbean *Anolis* communities. *Systematic Biology*. **41**: 403-420.
- Luttikhuisen, P. C., J. Drent & A. J. Baker. 2003. Disjunct distribution of highly diverged mitochondrial lineage clade and population subdivision in a marine bivalve with pelagic larvae. *Molecular Ecology*. **12**: 2215-2229.
- Lynn, R. J. & J. Simpson. 1987. The California current system: the seasonal variability of its physical characteristics. *Journal Geophysical Resources*. **92**: 12947-12966.
- Mackensen, A. K., T. Brey & S. Sonnenholzner. 2011. The fate of *Spondylus* stocks (Bivalvia: Spondylidae) in Ecuador: is recovery likely?. *Journal of shellfish research*. **30** (1): 115-121.
- Marinone, S. G., M. F. Lavin & A. Parés-Sierra. 2011. A quantitative characterization of the seasonal Lagrangian circulation of the Gulf of California from a three-dimensional numerical model. *Continental Shelf Research*. **31**: 1420-1426.
- Marinone, S. G. 2012. Seasonal surface connectivity in the Gulf of California. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. **100**: 133-141.

- Marinone, S. G. & M. F. Lavin. 2012. *Supplementary graphics for “Seasonal Surface Connectivity in the Gulf of California”*. Informe Técnico 103575. Departamento de Oceanografía Física, CICESE. 58 pp.
- Márquez, F., J. Robledo, G. E. Peñaloza & S. Van der Molen. 2010. Use of different geometric morphometrics tools for the discrimination of phenotypic stocks of the striped clam *Ameghinomya antiqua* (Veneridae) in north Patagonia, Argentina. *Fisheries Research*. **101**: 127-131.
- Maruyama, T. 1970. Effective number of alleles in a subdivided population. *Theoretical Population Biology*. **1**: 273-306.
- Matsumoto M. 2003. Phylogenetic analysis of the subclass Pteriomorpha (Bivalvia) from mtDNA COI sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **27**: 429–440.
- Mayr, E. 2000. The biological species concept. En Q.D. Wheeler y R. Meier, eds., *Species Concepts and Phylogenetic Theory: A Debate*, Columbia University Press, New York. EUA. 17-29 pp.
- Medina-Espinoza, J. A. 2010. *Divergencia genética de la langosta roja *Panulirus interruptus* (Randall, 1840) de la costa oeste de la Península de Baja California y del Golfo de California*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz B. C. S. 51 pp.
- Meirmans, P. G. & P. W. Hedrick. 2011. Assessing population structure: F_{ST} and related measures. *Molecular Ecology Resources*, **11**(1) 5–18.

- Michalakis, Y. & L. Excoffier. 1996. A Generic Estimation of Population Subdivision Using Distances Between Alleles With Special References for Microsatellite Loci. *Genetics Society of America*. **142**: 1061-1064.
- Minchin, D. 2003. Introductions: some biological and ecological characteristics of scallops. *Aquatic Living Resources*. **16**: 521-532.
- Moritz, C., T. E. Dowling & W. M. Brown. 1987. Evolution of Animal Mitochondrial DNA: Relevance for Population Biology and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*. **18**: 269-92
- Mungía-Vega, A., G. Soría, T. Pfister & R. Cudney-Bueno. 2010. Isolation and Characterization of microsatellite loci in the rock scallop (*Spondylus calcifer*) (Bivalvia: Spondylidae) from the Northern Gulf California, Mexico. *Conservation Genetic Resources*. **2** (1): 51-54.
- Muñetón-Gómez, M. S., M. T. Villalejo-Fuerte & I. Gárate-Lizárraga. 2001. Contenido estomacal de *Spondylus leucacanthus* Broderip, 1833 (Bivalvia: Spondylidae) y su relación con la temporada de reproducción y la abundancia de fitoplancton en Isla Danzante, Golfo de California. *Revista Biología Tropical*. **49**: 581-590.
- Murphy, R. W. & G. Aguirre-León. 2002. The nonavian reptiles: origins and evolution. *A new Island biogeography of the Sea Cortés* (Ed. By T. J. Case., M. L. Cody y E. Ezcurra). Oxford University Press. New York, USA. 181-220 pp.
- Nei, M., T. Maruyama & R. Chakraborty. 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*. **29**: 1-10.

- Oliveira, C. D. C. & T. Morales. 2010. How the number of hinge teeth may induce errors in the taxonomy of Nuculidae and Nuculanidae (Mollusca: Bivalvia). *Nautilus*. **124**: 34–40.
- Olson, R. R. 1985. The consequences of short-distance larval dispersal in a sessile marine invertebrate. *Ecology*. **66**: 30-39.
- Palumbi, S. R. 1992. Marine speciation on a small planet. *Trends in Ecology and Evolution*. **7**: 114-118.
- Palumbi, S. R. 1994. Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics*. **25**: 547-572.
- Palumbi, S. R. 2001. The ecology of marine protected areas. In Bertness, M., Gaines, S. D. y M. E. Hay. *The new synthesis*. Marine Ecology. Sinauer. Massachusetts. USA. Pages 509-530.
- Palumbi, S. R. 2003. Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecological Applications*. **13** (1): 146-158.
- Paulsen, A. C. 1974. The thorny oyster and the voice of God: *Spondylus* and *Strombus* in Andean prehistory. *American Antiquity*. **39**: 597-607.
- Peguero-Icaza, M., L. Sanchez-Velasco, M. F. Lavin, S. G. Marinone & E. Beier. 2011. Seasonal changes in connectivity routes among larval fish assemblages in a semi-enclosed sea (Gulf of California). *Journal of Plankton Research*. **33**: 517-533.

- Pereira, B. N. & A. R. Silva. 2011. Discriminating among similar deep-sea *Yoldiella* (Pelecypoda: Protobranchia) species with a morphometric approach. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 1-8
- Pérez-Enríquez, R., S. Avila & A. M. Ibarra. 2008. Population genetics of the oyster *Crassostrea corteziensis* in the Gulf of California. *Ciencias Marinas*. **34** (4): 479-490.
- Pérez-Enríquez, R., F. J. García-Rodríguez, G. Mendoza-Carrion & C. Padilla. 2011. Geographical variation in the genetic diversity and composition of the endangered Queen Conch *Strombus gigas* (Mesogastropoda: Strombidae) from Yucatán, México. *Revista Biología Tropical*. **59** (3): 1115-1126.
- Pfeiler, P., L. A. Hurtado, L. L. Knowles, J. Torre-Cosío, L. Bourillón-Moreno, J. F. Márquez-Farías & G. Montemayor-López. 2005. Population genetics of the swimming crab *Callinectes bellicosus* (Brachyura: Portunidae) from the Eastern Pacific Ocean. *Marine Biology*. **146**: 559-569.
- Posada, D. & K. A. Crandall. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. **14** (9): 817-818.
- Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*. **25** (7): 1253-1256.
- Poutiers, J. M. 1995. Moluscos. In: W. Fischer, F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K. E. Carpenter, and V. H. Niem, editors. *Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca: Pacífico Centro-Oriental*. Vol. 1: Invertebrados. Rome: Food and Agriculture Organization. 646 pp.

- Rice, W. R. 1989. Analyzing Table of Statistical Tests. *Evolution*. **43** (1): 223-225.
- Riddle, B. R., D. J. Hafner, L. F. Alexander & J. R. Jaeger. 2000. Cryptic vicariance in the historical assembly of a Baja California Peninsular Desert biota. *PNAS*. **97** (26): 14438-14443.
- Robles-Mungaray, M. 2004. *Desarrollo de la biotecnología para la producción de semilla en el laboratorio, diploide y triploide de callo de hacha Atrina maura (Sowerby, 1835)*. Tesis de maestría en ciencias en acuacultura. UABCS. 66pp.
- Rogers, A. R. 1995. Genetic evidence for Pleistocene population explosion. *Evolution*. **49**:608-615.
- Rogers, A. R. & H. Harpending. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology Evolution*. **9**: 552-569.
- Rohlf, F. J. & L. F. Marcus. 1993. A revolution in morphometrics. *Trends in Ecology and Evolution*. **8**: 129-132.
- Rohlf, F. J. 1998. On Applications of Geometric Morphometrics to Studies of Ontogeny and Phylogeny. *Systematic Biology*. **47** (1):147-158.
- Rohlf, F. J. 2004. *TpsDIG. Version 1.40*. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Suny at Story Brook.
<http://life.bio.sunnysb.edu/morph/>.

- Roman, J. & S. R. Palumbi. 2004. A global invader at home: population structure of the green crab, *Carcinus maenas*, in Europe. *Molecular Ecology*. **13**: 2891-2898.
- Rose, R. A., G. R. Campbell & S. G. Sanders. 1988. Larval development of the saucer scallop *Amusium balloti* (Bernardi) (Mollusca : Pectinidae). *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*. **39**: 153–160.
- Ross, H. H. 1974. *Biological systematics*. Addison –Wesley Inc. 345 pp.
- Rüber, L., E. Verheyen & A. Meyer. 1999. Replicated evolution of trophic specializations in an endemic cichlid fish lineage from Lake Tanganyika. *Proc. Natl. Academy of Sciences USA*. **96**: 10230-10235
- Rüber, L. & D. C. Adams. 2001. Evolutionary convergence of body shape and trophic morphology in cichlids from lake Tanganyika. *Journal of Evolutionary Biology*. **14** (2): 325-332.
- Saccone C., C. De Giorgi, C. Gissi, G. Pesole & A. Reyes. 1999. Evolutionary genomics in Metazoa: The mitochondrial DNA as a model system. *Genetics*. **238**: 195–209.
- Samadi, S., L. Bottan, E. Macpherson, B. R. De Forges & M. C. Boisselier. 2006. Seamount endemism questioned by the geographic distribution and population genetic structure of marine invertebrates. *Marine Biology*. **149** (6): 1463-1475.

- Sánchez, R., R. D. Sepúlveda, A. Brante & L. Cárdenas. 2011. Spatial pattern of genetic and morphological diversity in the direct developer *Acanthina monodon* (Gastropoda: Mollusca). *Marine Ecology Progress Series*. **434**: 121-131.
- Sánchez-Velasco, L., M. F. Lavin, M. Peguero-Icaza, C. A. León-Chávez, F. Contreras-Catala, S. G. Marinone, I. V. Gutiérrez-Palacios & V. M. Godínez. 2009. Seasonal changes in larval fish assemblages in a semi-closed sea (Gulf of California). *Continental Shelf Research*. **29**: 1697-1710.
- Sánchez-Velasco, L., M. F. Lavin, S. P. A. Jiménez-Rosenberg, V. M. Godínez, E. Santamaría-del-Angel & D. U. Hernández-Becerril. 2013. Three-dimensional distribution of fish larvae in a cyclonic Eddy in the Gulf of California during the summer. *Deep-Sea Research I*. **75**: 39-51.
- Sandweiss, D. H. 1992. *The archeology of Chincha fisherman: specialization and status in Inka Peru*. Pittsburgh: Bulletin of Carnegie Museum of Natural History. 29 pp.
- Schmalhausen, I. I. 1949. *Factors of Evolution: The Theory of Stabilizing Selection*. Blakiston, Philadelphia. 327pp.
- Schneider, S. & L. Excoffier. 1999. Estimation of demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: Application to human mitochondrial DNA. *Genetics*. **152**: 1079-1089.
- Schneider, S., D. Roessli & L. Excoffier. 2000. *ARLEQUIN v 2.0. A software for population genetic analysis*. Genetic and biometry laboratory. University of Genove, Switzerland. <http://anthro.unige.ch/software/arlequin/>.

- SEMARNAT. 2005. *Plan de manejo regional del callo de escarlopa (Spondylus calcifer) en el Golfo de California*. Dirección general de vida silvestre. México. 26pp.
- Serb, J. M., A. Alejandrino, E. Otárola-Castillo & D. C. Adams. 2011. Morphological convergence of shell shape in distantly related scallop species (Pectinidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*. **163** (2): 571-584.
- Shaklee, J. & P. Bentzen. 1998. Genetic Identification of Stocks of Marine Fishland Shell. *Bulletin Of Marine Science*. **62**: 589-621.
- Shasky, D. R. 1980. *Spondylus princeps* in Ecuadorian antiquity. *The Festivus*. **12** (1): 9-11.
- Shearer, T. L., M. J. H. Van-Oppen, S. L. Romanos & G. Wörheide. 2002. Slow mitochondrial DNA sequence evolution in the Anthozoa (Cnidaria). *Molecular Ecology*. **11**: 2475-2487.
- Sheets, H. D. 2004. IMP: Integrated Morphometrics Package. Canisius College. N.Y. <http://www3.canisius.edu/~sheets/morphsoft.html>.
- Simpson, G.G. 1953. *The major features in evolution*. Columbia University Press, New York, USA. 434 pp.
- Skoglund, C. & D. K. Mulliner. 1996. The Genus *Spondylus* (Bivalvia: Spondylidae) of the Panamic Province. *Festivus*. **38**: 93-107.
- Soria, G., J. Tordecillas-Guillen, R. Cudney-Bueno & W. Shaw. 2010. Spawning induction, fecundity estimation, and larval culture of *Spondylus calcifer*

(Carpenter, 1857) (Bivalvia: Spondylidae). *Journal of Shellfish Research*. **29** (1): 143-149.

- Soria, G., A. Munguía-Vega, S. G. Marinone, M. Moreno-Báez, I. Martínez-Tovar & R. Cudney-Bueno. 2012. Linking bio-oceanography and population genetics to assess larval connectivity. *Marine Ecology Progress Series*. **463**: 159-175.
- Stamatis, C., A. Triantafyllidis, K. A. Moutou & Z. Mamuris. 2004. Mitochondrial DNA variation northeast Atlantic and Mediterranean populations of Norway lobster, *Nephrops norvegicus*. *Molecular Ecology*. **13**: 1377-1390.
- Stanley, S. M. 1970. Relation of shell form to life habits of the Bivalvia (Mollusca). *Geological Society of America Memoirs*. **125**:1-296.
- Stasek, C.R., 1963. Synopsis and discussion of the association of ctenidia and labial palps in the bivalved Mollusca. *The Veliger*. **6**: 91–97.
- Stoner, D. S. 1992. Vertical distribution of a colonial ascidian on a coral reef: the roles larval dispersal and life-history variation. *American Naturalist*. **139**: 802-824.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. **123**: 585-595.
- Tajima, F. 1993. Measurement of DNA polymorphism. In: *Mechanisms of Molecular Evolution. Introduction to Molecular Paleopopulation Biology*. Edited by Takahata, N. and Clark, A.G., Tokyo, Sunderland, MA: Japan Scientific Societies Press, Sinauer Associates, Inc. 37-59.

- Tajima, F. 1996. The amount of DNA polymorphism maintained in a finite population when the neutral mutation rate varies among sites. *Genetics*. **143**: 1457-1465.
- Tamura K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei & S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. **28**(10): 2731-2739.
- Taylor, J. D., W. J. Kennedy & A. Hall. 1969. The shell structure and mineralogy of the Bivalvia. 1. Introduction. Nuculacea-Trigonacea. *Bulletin British Museum Natural History Zoology*. **3**: 1–125.
- Therriault, T. W., M. F. Docker, M. I. Orlova, D. D. Heath & H. J. MacIsaac. 2004. Molecular resolution of the family Dreissenidae (Mollusca: Bivalvia) with emphasis on Ponto-Caspian species, including first report of *Mytilopsis leucophaeata* in the Black Sea basin. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **30**: 479-489.
- Turgeon, D. D; J. F. Quinn Jr, A. E. Bogan, E. V. Coan, F. G. Hochberg Jr, W. G. Lyons, P. M. Mikkelsen, R. J. Neves, C. F. E. Roper, G. Rosenberg, B. Roth, A. Scheltema, F. G. Thompson, M. Vecchione & J. D. William. 1998. *Common and scientific names of aquatic invertebrates from the United States and Canada: Mollusks*. 2nd Edition. American Fisheries Society. Special Publication 26, Bethesda. Maryland- 526 pp.
- Upton, D. E. y R. W. Murphy. 1997. Phylogeny of the sideblotched lizards (Phrynosomatidae: *Uta*) based on mtDNA sequences: support for a

- midpeninsular seaway in Baja California. *Mol. Phylogenetic Evolution*. **8**: 104-113.
- Vergara-Solana, F. J. 2012. *Sistemática del género Diapterus Ranzani, 1842 (Perciformes: Gerreidae): Análisis morfométricos y moleculares*. Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, B. C. S. 124pp.
 - Villalejo-Fuerte, M. y F. García-Domínguez. 1998. Reproductive cycle of *Spondylus leucacanthus* Broderip, 1833, (Bivalvia: Spondylidae) at Isla Danzante, Gulf of California. *Journal Shellfish Research*. **17**: 1037-1042.
 - Villalejo-Fuerte M. y M. S. Muñetón-Gómez. 2002. Tópicos sobre la biología de la almeja burra *Spondylus calcifer* (Carpenter, 1857). *Hidrobiológica*. **12** (1): 79-87.
 - Villalejo-Fuerte, M., M. Arellano-Martínez, B. P. Ceballos-Vázquez & F. García-Domínguez. 2002. Reproductive cycle of *Spondylus calcifer* Carpenter, 1857 (Bivalvia: Spondylidae) in the “Bahía de Loreto” National Park, Gulf of California, México. *Journal Shellfish Research*. **21** (1): 103-108.
 - Villalejo-Fuerte, M., A. Tripp-Quezada & F. García-Domínguez. 2005. Variación de los índices gonádicos, de rendimiento muscular y de la glandula digestiva de *Spondylus princeps* (Gray, 1825) (Mollusca: Bivalvia) en Isla Cedros y Punta Eugenia, Mexico. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. **40** (1): 87-90.
 - Vogler, A. & M. Monaghan. 2006. Recent advances in DNA taxonomy. *Journal of Zoological Systematic and Evolutionary Research*. **45**: 1-10.

- Waller, T. R. 1991. Evolutionary relationships among commercial scallops (Mollusca: Bivalvia: Pectinidae). In *Scallops: Biology, ecology and aquaculture*. Elsevier Academic Press. New York, USA. 1-73.
- Waller, T. R. 2006. Phylogeny of families in the Pectinoidea (Mollusca: Bivalvia): importance of the fossil record. *Zoological Journal of the Linnean Society*. **148**: 313-342.
- Waples, R. 1998. Separating the wheat from the chaff: Patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *Journal of Heredity*. **89**: 439-450.
- Ward, R. D., M. Woodward & D. O. F. Skibinski. 1994. A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. *Journal of Fish Biology*. **44**. 213-232.
- Watterson, G. A. 1984. Allele frequencies after a bottleneck. *Theoretical Population Biology*. **26**: 387-4067.
- Winans, G. A. 1980. Geographic variation in the milkfish *Chanos chanos*. I. Biochemical evidence. *Evolution*. **34**: 558-574.
- Woodruff, D. S. & S. J. Gould. 1980. Geographic differentiation and speciation in *Cerion* a preliminary discussion of patterns and processes. *Biological Journal of the Linnean Society*. **14**: 389:416.
- Wright, S. 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics*. **16**: 97-159.
- Wright, S. 1978. *Evolution and genetic of population. Variability within and among natural population*. University of Chicago Press. Chicago, EUA. 590 pp.

- Yakubu, A. & S. A. Okunsebor. 2011. Morphometric differentiation of two Nigerian fish species (*Oreochromis niloticus* and *Lates niloticus*) using principal components and discriminant analysis. *International Journal of Morphology*. **29** (4): 1429-1434.
- Yonge, C.M. 1973. Functional morphology with particular reference to hinge and ligament in *Spondylus* and *Plicatula* and discussion on relations within the superfamily pectinacea (Mollusca: Bivalvia). *Proceedings of the Royal Society of London*. B 267: 173-208.
- Yonge, C.M., 1978. Significance of the ligament in the classification of the Bivalvia. *Proceedings of the Royal Society of London*. B 202, 231–248.
- Zelditch, M., D. Swiderski, H. Sheets & W. Fink. 2004. *Geometric morphometrics for Biologists. A Primer*. Elsevier Academic Press. Kirkwood, New York, USA. 437 pp.

Anexo 1: Protocolo de Extracción de ADN total utilizando “DNAzol”

1. Agregar 250 μ l de DNA zol (Invitrogen) y 20 μ l de proteinasa "K"* (para una digestión mas rápida) en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, que contiene una pequeña porción de tejido.
2. Dejar reposando durante 6 horas (en el caso de moluscos) o toda la noche de ser necesario (12 aprox.) a una temperatura de entre 38 y 46°C (para mejor resultado) ó a temperatura ambiente.
3. Mezclar con la ayuda de un "vortex" durante 15 segundos aproximadamente.
4. Centrifugar a 14,000 rpm durante 10 minutos.
5. Con la ayuda de una micropipeta recuperar el sobrenadante, mismo que deberá ser depositado en tubos nuevos y estériles (1.5 ml) debidamente etiquetados, ya que en esta solución se encuentra contenido el ADN total y demás residuos.
6. Agregar 250 μ l de etanol al 100% (de preferencia a una temperatura aproximada de entre -20 y 0 °C), mezclar perfectamente y dejarlo reposar a -20°C (lo anterior servirá para precipitar el ADN total que se encuentre en la solución)
7. Centrifugar nuevamente a 14,000 rpm. Durante dos minutos.
8. Descartar de nuevo el sobrenadante, sin perder de vista el pelet de color entre blanco y transparente que debe quedar dentro del tubo (este pelet es el ADN total).
9. Agregar 250 μ l de etanol al 70% al tubo que contiene el pelet y homogenizar la muestra (este lavado del pelet, ayuda a eliminar material que no es precisamente ADN, impurezas del reactivo, proteínas de tu tejido etc.)
10. Centrifugar a 14,000 rpm. Durante 10 minutos.
11. Descartar el sobrenadante con mucho cuidado de no eliminar el pelet, dejar secar a temperatura ambiente.
12. Una vez seco el pelet, resuspender al ADN en 100 μ l de Agua grado molecular (MQ).

Anexo 2: Frecuencias haplotípicas de COI en *Spondylus calcifer*.

Frecuencias haplotípicas de secuencias parciales del gen Citocromo Oxidasa sub-unidad I en la especie *Spondylus calcifer*, para cada una de las localidades de recolecta: Isla Tiburón (IT); La Cholla (LCH); Isla Ángel de la Guarda posición norte (AN); Bahía de los Ángeles (BA); Santa Rosalía (SR); Agua Verde (AV); Las Cruces (LC); Guerrero-Oaxaca (Pac). El número entre paréntesis indica el total de secuencias por localidad.

Haplotipo	IT (29)	LCH (32)	AN (32)	BA (46)	SR (30)	AV (37)	LC (18)	Pac (11)
Hap_1	0.759	0.594	0.656	0.652	0.6	0.811	0.5	0.636
Hap_2	0.034	0	0	0	0	0	0	0
Hap_3	0.069	0.062	0.125	0.087	0.033	0.054	0.111	0.090
Hap_4	0.034	0.062	0	0.043	0.066	0.027	0.055	0
Hap_5	0.034	0	0	0	0	0	0	0
Hap_6	0.034	0.125	0	0	0.033	0.027	0	0
Hap_7	0.034	0	0	0	0	0	0	0
Hap_8	0	0.031	0	0.087	0	0.027	0	0.090
Hap_9	0	0.031	0	0	0.033	0	0	0
Hap_10	0	0.031	0.031	0	0	0	0	0
Hap_11	0	0.031	0	0	0	0	0	0
Hap_12	0	0.031	0	0.021	0.1	0	0	0
Hap_13	0	0	0.031	0	0	0	0	0
Hap_14	0	0	0.031	0	0	0	0	0
Hap_15	0	0	0.031	0	0	0	0	0
Hap_16	0	0	0.031	0	0	0	0	0
Hap_17	0	0	0.031	0	0	0	0	0
Hap_18	0	0	0.031	0	0	0	0	0
Hap_19	0	0	0	0.043	0	0	0	0
Hap_20	0	0	0	0.021	0	0	0	0
Hap_21	0	0	0	0.021	0	0	0	0
Hap_22	0	0	0	0.021	0	0	0	0
Hap_23	0	0	0	0	0.033	0	0	0
Hap_24	0	0	0	0	0.033	0	0	0
Hap_25	0	0	0	0	0.033	0	0	0
Hap_26	0	0	0	0	0.033	0.027	0.055	0.090
Hap_27	0	0	0	0	0	0.027	0	0
Hap_28	0	0	0	0	0	0	0.055	0
Hap_29	0	0	0	0	0	0	0.055	0
Hap_30	0	0	0	0	0	0	0.055	0
Hap_31	0	0	0	0	0	0	0.055	0
Hap_32	0	0	0	0	0	0	0.055	0
Hap_33	0	0	0	0	0	0	0	0.090

Anexo 3: Frecuencias haplotípicas de COI en *Spondylus princeps*.

Frecuencias haplotípicas de secuencias parciales del gen Citocromo Oxidasa sub-unidad I en la especie *Spondylus princeps*, para cada una de las localidades de recolecta: Bahía de los Ángeles (BA); Santa Rosalía (SR); Agua Verde-Isla Danzante (AV-ID); Laguna Ojo de Liebre (LOL). El número entre paréntesis indica el total de secuencias por localidad.

Haplotipo	BA (15)	SR (28)	AV-ID (40)	LOL (39)
Hap_1	0.2	0	0	0
Hap_2	0.066	0	0	0
Hap_3	0.133	0	0	0
Hap_4	0.267	0.393	0.35	0.256
Hap_5	0.2	0.143	0.1	0.231
Hap_6	0.066	0	0	0
Hap_7	0.066	0	0	0
Hap_8	0	0.071	0	0
Hap_9	0	0.143	0.05	0
Hap_10	0	0.035	0	0
Hap_11	0	0.035	0	0
Hap_12	0	0.035	0	0
Hap_13	0	0.035	0	0
Hap_14	0	0.035	0	0
Hap_15	0	0.035	0.075	0.231
Hap_16	0	0.035	0	0
Hap_17	0	0	0.125	0
Hap_18	0	0	0.025	0
Hap_19	0	0	0.05	0
Hap_20	0	0	0.025	0
Hap_21	0	0	0.025	0
Hap_22	0	0	0.025	0
Hap_23	0	0	0.025	0
Hap_24	0	0	0.025	0.025
Hap_25	0	0	0.025	0
Hap_26	0	0	0.025	0
Hap_27	0	0	0.025	0
Hap_28	0	0	0.025	0
Hap_29	0	0	0	0.025
Hap_30	0	0	0	0.025
Hap_31	0	0	0	0.025
Hap_32	0	0	0	0.025
Hap_33	0	0	0	0.025
Hap_34	0	0	0	0.025
Hap_35	0	0	0	0.025
Hap_36	0	0	0	0.025
Hap_37	0	0	0	0.025