



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



Discriminación de las especies del género
Opisthonema Gill, 1861 en el Sur del Golfo de
California usando análisis morfométricos y
genéticos

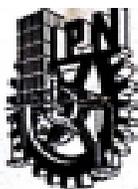
TESIS

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

PRESENTA

CARLOS IVÁN PÉREZ QUIÑONEZ

LA PAZ, B.C.S., DICIEMBRE DE 2014



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA 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 02 del mes de Octubre del 2014 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:

"DISCRIMINACIÓN DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO *Ophistonema* GILL, 1861 EN EL SUR DEL GOLFO DE CALIFORNIA USANDO ANÁLISIS MORFOMÉTRICO Y GENÉTICO"

Presentada por el alumno:

PÉREZ

Apellido paterno

QUIÑONEZ

Apellido materno

CARLOS IVÁN

Nombre(s)

Con registro:

A	1	3	0	4	2	2
---	---	---	---	---	---	---

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. CASIMIRO QUIÑONEZ VELÁZQUEZ
Director de Tesis



DR. FRANCISCO JAVIER GARCÍA RODRÍGUEZ
Director de Tesis



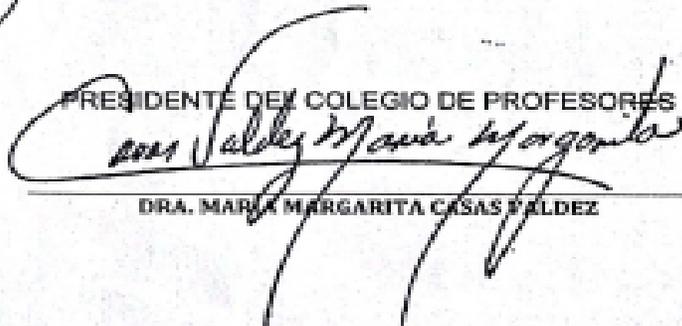
DR. ALBERTO SÁNCHEZ GONZÁLEZ



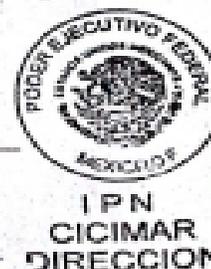
DR. JOSÉ DE LA CRUZ AGÜERO



M.C. FRANCISCO JAVIER VERGARA SOLANA



PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES
DRA. MARÍA MARGARITA CASAS VALDEZ





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 03 del mes noviembre del año 2014
el (la) que suscribe BIÓL. CARLOS IVÁN PÉREZ QUIÑONEZ alumno(a) del
Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS
con número de registro A130422 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS
manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:
DR. CASIMIRO QUIÑONEZ VELÁZQUEZ y DR. FRANCISCO JAVIER GARCÍA RODRÍGUEZ
y cede los derechos del trabajo titulado:

"DISCRIMINACIÓN DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO *Ophistonema* GILL, 1861 EN EL SUR
DEL GOLFO DE CALIFORNIA USANDO ANÁLISIS MORFOMÉTRICO Y GENÉTICO"

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: nash14ivan@hotmail.com - cquinone@ipn.mx - figarcia@ipn.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

BIÓL. CARLOS IVÁN PÉREZ QUIÑONEZ

nombre y firma

Dedicatoria

A mí MADRE por darme la vida y estar siempre conmigo y apoyarme todo el tiempo.

A la personita que se convirtió en mi motor en la vida para realizar todas y cada una de mis metas, para mi hija XIMENA PÉREZ GARCÍA quien es lo más importante en mi vida.

Al igual que a mi TÍO quien me ha ayudado a lo largo de mi vida académica.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), al programa institucional de formación de investigadores (PIFI) del Instituto Politécnico Nacional y a la comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas del Instituto Politécnico Nacional (COFFA-IPN) por el apoyo económico otorgado.

A mis directores de tesis, al doctor Casimiro Quiñonez Velázquez que más que solo director lo considero un amigo, y al doctor Francisco Javier García Rodríguez a los dos les agradezco el apoyo brindado a lo largo de mi estancia en la maestría, por sus valiosos y acertados comentarios respecto al ejercicio de tesis.

A los miembros del comité: MC. Francisco Javier Vergara Solana, quien le debo mucho de los conocimientos adquiridos de la morfometría geométrica ya que tuvo la paciencia y tiempo necesario para resolver todas y cada una de las dudas que me surgían con respecto a ésta técnica, igual lo considero un amigo, al Dr. José de la Cruz Agüero y Dr. Alberto Sánchez González por sus acertados comentarios en la revisión de la tesis.

A mis compañeros del Laboratorio de dinámica de poblaciones del CICIMAR, por los momentos tan amenos compartidos, tanto en el ámbito académico como en el social.

A mi familia (madre, tío e hija) por su apoyo y comprensión, al igual que a mis amigos de maestría Sergio, Vanessa, Adalberto (Tamal) y Gisela por su convivencia diaria que hicieron más amenas esas mañanas y clases en CICIMAR.

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	i
Lista de Tablas	iii
GLOSARIO	iv
Resumen	vii
Abstract.....	viii
INTRODUCCIÓN	1
Generalidades	1
Biología y taxonomía de la sardina crinuda	4
<i>Diagnosis</i>	6
La aplicación de la morfometría geométrica	7
Aplicación de marcadores moleculares en sistemática	8
ANTECEDENTES	10
JUSTIFICACIÓN.....	13
HIPÓTESIS	14
OBJETIVO GENERAL.....	15
OBJETIVOS PARTICULARES.....	15
MATERIAL Y MÉTODOS	16
Muestreo	16
Identificación de especies a partir de caracteres merísticos.....	17
Diferencias morfométricas entre especies	19
<i>Análisis de los datos morfométricos</i>	21
Divergencia genética entre especies	23
<i>Extracción de ADN y selección de iniciadores</i>	23
<i>Amplificación y edición de secuencias</i>	24
<i>Análisis de datos genéticos</i>	25
RESULTADOS.....	27
Diferencias merísticas	27
Diferencias morfométricas	31
Análisis genético.....	35
DISCUSIÓN	37

CONCLUSIONES	44
BIBLIOGRAFIA	45
Anexo 1: Protocolo de Extracción de ADN total utilizando “DNAzol”	58

Lista de Figuras

- Figura 1.** Serie histórica de capturas de la pesquería de pelágicos menores en el sur del Golfo de California y desembarcada en el puerto de Mazatlán, Sinaloa. 2
- Figura 2** Área de distribución de las cinco especies pertenecientes al género *Opisthonema*..... 5
- Figura 3** Especies de sardina crinuda objeto de la pesquería de pelágicos menores en el sur del Golfo de California (tomadas de Fisher *et al.*, 1995)..... 7
- Figura 4.** Área de pesca de la flota de pelágicos menores en el sur del Golfo de California y zonas administrativas (I-V). 17
- Figura 5.** Características de las branquiespinas extremas del segmento ceratobranquial del primer arco branquial de un ejemplar de sardina crinuda. 18
- Figura 6.** Características de las branquiespinas extremas del segmento ceratobranquial del primer arco branquial de un ejemplar de sardina crinuda. **a)** primer arco branquial de cada ejemplar de *Opisthonema*, **b)** branquiespinas y hueso ceratobranquial, utilizado para la primera identificación específica de los ejemplares de *Opisthonema* mediante el conteo de cada una de las branquiespinas. 19
- Figura 7.** Marcas naturales utilizadas para generar las referencias **(a)**. Gradillas de referencias con distancias radiales angularmente equidistantes **(b)**, y configuración obtenida de cada pez integrada a partir de la selección de 13 marcas totales **(c)**. Los puntos rojos indican las marcas naturales ubicadas a partir de referencias anatómicas y los puntos azules las (semimarcas). 21
- Figura 8.** Diagrama de dispersión del número de branquiespinas ceratobranquiales del primer arco branquial respecto de la LE de la sardina crinuda capturada en las costas del sur del Golfo de California. Las líneas horizontales definen los límites del intervalo del número de branquiespinas de acuerdo con Berry & Barret (1963). *O. bulleri* 28-35, *O. medirastre* 50-68 y *O. libertate* 71-107. 29
- Figura 9.** Número de especímenes muestreados por mes por especie del complejo *Opisthonema* de las capturas en la parte sur del Golfo de California. ... 29

Figura 10. Base recta de las branquiespinas ceratobranquiales del primer arco branquial de *O. libertate* y *O. medirastre* **(a)** y **(b)**, base oblicua del primer arco branquial de *O. bulleri* **(c)**. 30

Figura 11. Branquiespinas ceratobranquiales de un ejemplar *O. libertate* no presentaron espículas **(a)**. Branquiespinas ceratobranquiales de un ejemplar de *O. medirastre* presentaron desde abundantes hasta pocas espículas **(b)**. Branquiespinas ceratobranquiales de un ejemplar de *O. bulleri* **(c)**. 31

Figura 12. Scores de las variables canónicas. Dispersión de los especímenes por especie de *Opisthonema* spp. 32

Figura 13. Dendograma generado con el algoritmo del método de grupos de pares por medio del método Neighbor Joining, utilizando las distancias cuadráticas de Mahalanobis por especie. 33

Figura 14. Gradillas de deformación creadas a partir de la comparación de la forma promedio de cada especie con respecto al promedio general, donde el tamaño y dirección de las flechas indican la magnitud de variación entre las especies. Las gradillas se presentan aumentadas a 2X. **(a)** y **(b)**, *O. bulleri* presenta una forma corporal diferente (menor altura del cuerpo) con respecto de *O. medirastre* y *O. libertate*. **(c)** mientras que *O. medirastre* y *O. libertate* diferenciándose por cambios en la región del pedúnculo caudal a la aleta anal, y del pedúnculo caudal a la aleta dorsal. 34

Figura 15. 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 barras 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 y una variabilidad muy baja dentro de cada clado. 35

Lista de Tablas

Tabla 1. Resumen del número de sardinas crinuda <i>Opisthonema</i> spp. muestreadas por mes en las descargas realizadas en Mazatlán. La zona de pesca es el sur del Golfo de California. Septiembre 2011–enero 2014.	27
Tabla 2. Resumen del número de sardinas crinuda <i>Opisthonema</i> spp. muestreadas por zona de pesca (I-V) en el sur del Golfo de California, durante septiembre 2011–enero 2014.....	27
Tabla 3. Parámetros de las dos variables canónicas generadas	32
Tabla 4. Matriz de clasificación correcta generada a partir de las distancias de Mahalanobis.	33
Tabla 5. Porcentaje de divergencia intra-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).....	36
Tabla 6. Valores de divergencia genética dados en porcentajes encontrados en este estudio para cada una de las tres especies de <i>Opisthonema</i> spp. con base en el modelo de Kimura-2 parámetros (modelo de sustitución nucleotídica que asigna distinto peso a una transversión de una transición).....	36

GLOSARIO

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.

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.

Análisis de Varianza Multivariado

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.

Caracteres

Cualquier rasgo o atributo de una especie que puede ser observado o cuantificado.

Centroide

Punto ubicado en la posición de la media geométrica de un objeto.

Clado

También conocido como grupo monofilético o natural, que incluye a los descendientes de un ancestro común.

Cleithrum

Es un hueso grande que se extiende hacia arriba desde la base de la aleta pectoral y anclajes en el cráneo por encima de las branquias, que forma el borde posterior de la cámara branquial. El hueso tiene uso científico como un medio para determinar la edad de los peces.

Coefficiente kappa de Cohen

Es una medida estadística que ajusta el efecto del azar en la proporción de la concordancia observada.

COI

Subunidad I del gen del Citocromo oxidasa.

Dendograma

Es una representación gráfica de las agrupaciones derivadas de la aplicación de un algoritmo de agrupación.

Distancias cuadráticas de Mahalanobis

Medida de distancia entre dos grupos en un espacio multidimensional.

Distancias genéticas

Es una medida de la diferencia del material genético entre distintas especies o individuos de la misma especie.

Electroforesis

Es una técnica para la separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico.

Gen

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

Gradillas de deformación

Es una aproximación para solucionar la interpolación de superficie, lo que es útil para la representación gráfica de las deformaciones entre dos configuraciones

Iniciador

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

Intra-específico

Es la interacción biológica en la que los organismos que intervienen pertenecen a la misma especie.

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.

Merísticos

Se refiere al recuento de las características cuantitativas de los peces, tales como el número de aletas, escamas o branquiespinas.

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.

Morfotipo

Categoría en la que un individuo es clasificado de acuerdo con sus formas.

Otolitos

Son materiales sólidos que se encuentran en el sistema vestibular en muchos organismos. Le permiten al organismo notar las aceleraciones y la dirección de la gravedad, a los peces les sirven para la audición. Son usados por los ictiólogos para determinar la edad de un pez.

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.

Procrustes Generalizado

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

Prueba F-Procrustes

Procedimiento estadístico empleado para calcular la

distancia Procrustes parcial o completa entre la media de dos grupos y un estimado de la varianza en esta distancia obteniendo a través de re-muestreos

Stocks

Sí bien existen diversas definiciones de stock, en pesquerías stock es un grupo de individuos que se encuentran en un área específica en un tiempo específico, sin importar su integridad genética. Por otra parte, desde el punto de vista genético, se considera al stock como una unidad aislada reproductivamente y genéticamente diferenciada de otras, en donde unos cuantos migrantes por generación son suficientes para evitar la diferenciación genética.

Taxa

Es un grupo de una o más poblaciones de un organismo u organismos visto por los taxonomistas para formar una unidad.

Variabilidad genética

Variabilidad genética es una medida de la tendencia de los genotipos de una población a diferenciarse.

Resumen

En la región sur del Golfo de California, la flota pesquera captura sardina crinuda (*Opisthonema libertate* (Günther, 1867); *O. bulleri* (Regan, 1904); *O. medirastre* Berry & Barrett, 1963) y anchoveta bocona (*Cetengraulis mysticetus* (Günther, 1867)). Las sardinas son relativamente similares en forma, son simpátricas y su captura se reporta sin distinguir las especies. El género *Opisthonema* ha tenido un papel económico importante en las costas del sur del Golfo de California, por los volúmenes de su captura y por la significativa generación de empleos directos e indirectos. En el presente trabajo se analizan las características morfométricas y genéticas de las especies del género *Opisthonema* distribuidas en la parte sur del Golfo de California. Los organismos (n=1,598) se muestrearon, de septiembre del 2011 hasta enero del 2014, de la captura descargada en Mazatlán, Sinaloa. De los cuales, 1,254 fueron identificados taxonómicamente hasta especie, con base en: número y características de las branquiespinas del hueso ceratobranquial del primer arco branquial. La clasificación específica fue: 13.3% correspondió a *O. bulleri*; 33.8% a *O. medirastre*; y 52.9% a *O. libertate*. Para la evaluación morfológica se seleccionaron al azar 71 individuos por especie, y se comparó la forma del cuerpo empleando análisis de morfometría geométrica. Un Análisis Canónico generó dos variables canónicas (VC) significativas, las cuales sugieren la presencia de tres grupos. Un Análisis Múltiple de Varianza identificó diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.01$) y la comparación pareada usando las distancias Procrustes indicaron diferencias significativas en todos los casos ($p < 0.01$). El porcentaje de asignación correcta usando las distancias cuadráticas de Mahalanobis fue 79% para *O. libertate*, 83% para *O. bulleri* y 73% para *O. medirastre*. Los análisis moleculares, basados en secuencias del COI del ADNmt, soportan la existencia de las tres especies reconocidas, ya que los niveles de divergencia intra-específica variaron entre 0% y 0.5%, y los inter-específicos entre 2.9% al 5.1%. Los resultados morfológicos y genéticos soportan la existencia de tres entidades taxonómicas para la región sur del Golfo de California.

Palabras clave: *Opisthonema*, ADNmt, COI, morfometría geométrica, taxonomía, discriminación de especies, código de barras, divergencia intra e inter-específica.

Abstract

In the southern Gulf of California, the fishing fleet catches thread herring (*Opisthonema libertate* (Günther, 1867); *O. bulleri* (Regan, 1904); *O. medirastre* (Berry & Barrett, 1963) and Pacific anchovy (*Cetengraulis mysticetus* (Günther, 1867). Sardines are sympatric and morphologically similar so the captures are reported without discriminating species. The thread herring fishery resource has played an important economic role in the coasts of the southern Gulf of California, not only by the volume of capture but also for the significant amount of direct and indirect jobs. The aim of this thesis is to analyze the morphometric and genetic characteristics of the genus *Opisthonema* distributed in the southern part of the Gulf of California. A total of 1,598 organisms were sampled from sardine landings in Mazatlán, Sinaloa, during September 2011 to January 2014. Of which 1,254 were classified to taxonomically to species, based on: number and characteristics of ceratobranchial bone rakers of the first gill arch. The specified classification was: 13.3% of individuals as *O. bulleri*; 33.8% of *O. medirastre*; and 52.9% of *O. libertate*. For the geometric morphometric analysis 71 samples *per* species were randomly selected. A Canonical Analysis generated two significant variables, which suggest the presence of three groups. A Multiple Analysis of variance identified significant differences between groups ($p < 0.01$) and paired comparison using Procrustes distances showed significant differences in all cases ($p < 0.01$). The percentage of correct assignment using the squared Mahalanobis distances was: 79% for *O. libertate*, 83% for *O. bulleri* and 73% for *O. medirastre*. Molecular analyzes based on COI sequences from the mtDNA, supporting the existence of the three recognized species, since the levels of intra-specific divergence ranged between 0% and 0.5%, and inter-specific between 2.9% to 5.1%. The morphological and genetic results support the existence of three taxa for the southern Gulf of California.

Keywords: *Opisthonema*, mtDNA, COI, geometric morphometry, taxonomy, species discrimination, barcode, intra and inter-specific divergence.

INTRODUCCIÓN

Generalidades

Los peces pelágicos menores son de gran importancia ecológica y económica. En el ambiente marino, son alimento de un gran número de especies de peces, aves y mamíferos (Holt, 1975) y su importancia económica se deriva de los importantes volúmenes de la captura y de la generación de empleos (Nevárez-Martínez *et al.*, 2006). Este grupo de peces representa alrededor del 50% de la captura de organismos marinos en México (450,000 t promedio, durante 1973-2011), lo que los define como una de las pesquerías más importantes del país (SAGARPA, 2011; FAO, 2011). En el Pacífico mexicano, las seis especies de las que se obtiene el 70% de la captura de pelágicos menores son: *Sardinops sagax* (Jenyns, 1842); *Opisthonema libertate* (Günther, 1867); *O. bulleri* (Regan, 1904); *O. medirastre* Berry & Barrett, 1963; *Scomber japonicus* Houttuyn, 1782 y *Engraulis mordax* Girard, 1854 (DOF, 2010). La captura tiene varios destinos, y principalmente se utiliza para la elaboración de harina y obtención de aceite (85%), que a su vez se utiliza como materia prima en la elaboración de alimento para animales domésticos. El restante 15% se destina al consumo humano como producto enlatado y congelado (Nevárez-Martínez *et al.*, 2006).

La norma oficial mexicana *NOM-003-PESC-1993* regula la pesca de pelágicos menores. Esta pesquería emplea embarcaciones de cerco en aguas de jurisdicción federal del Océano Pacífico, incluyendo el Golfo de California (SEPESCA, 1994). Entre estas regulaciones está la limitación del esfuerzo pesquero y la talla de captura. Este tipo de pesquerías se caracteriza por ser multiespecífica, es decir, se obtienen varias especies con un mismo arte de pesca (Nevárez-Martínez *et al.*, 2006).

El Golfo de California, la región pesquera más importante del país, particularmente, las costas del estado de Sinaloa, ocupa el segundo lugar, después de Sonora, en producción en cuanto a volúmenes de captura en peso vivo (Vallarta-Zarate, 2012). Para la región de Sinaloa, la temporada de pesca de

sardina va de noviembre a septiembre, y la pesquería detiene operaciones en el mes de octubre debido a la baja disponibilidad del recurso. En este mes la industria aprovecha para dar mantenimiento a la flota y equipo de pesca (Jacob-Cervantes, 2010).

La flota pesquera de pelágicos menores en el sur del Golfo de California (de las costas de Sinaloa hasta sur de Jalisco), capturaba hasta 1980 alrededor de 15,000 t anuales. Desde entonces se vino incrementando de forma sostenida. En el año 2000, se alcanzaron 70,000 t, en el 2009 fueron más de 120,000 t aunque en el 2013 se lograron poco más de 68,000 t (Jacob-Cervantes *et al.*, 2014; SAGARPA, 2011) (Fig. 1). En esta región, la pesca se realiza en aguas cercanas a la costa y captura a la sardina crinuda (*Opisthonema libertate*, *O. bulleri* y *O. medirastre*) y la anchoveta bocona (*Centengraulix mysticetus*). La sardina crinuda conforma las especies objetivo de la pesquería (Jacob-Cervantes, 2010); sin embargo, las capturas no se registran por especie, sino que son agrupadas bajo el término crinuda.

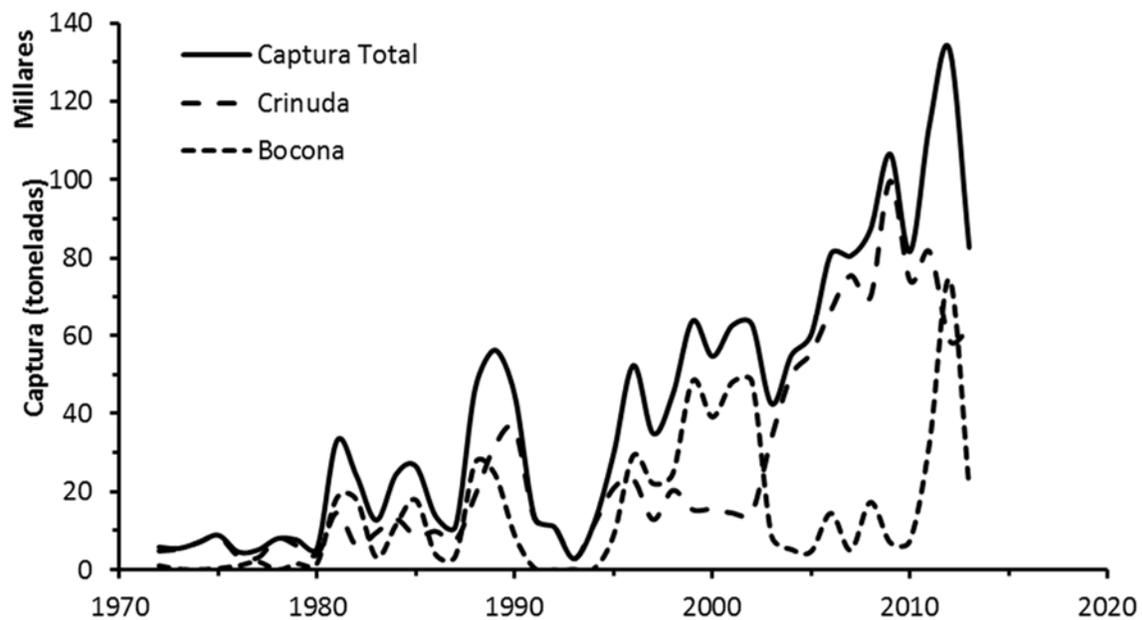


Figura 1. Serie histórica de capturas de la pesquería de pelágicos menores en el sur del Golfo de California y desembarcada en el puerto de Mazatlán, Sinaloa.

Los trabajos académicos realizados sobre este recurso tienen en común la no diferenciación de las especies, por ello, se han referido a este grupo como el complejo *Opisthonema* spp. y consideran *a priori* que se trata en mayor proporción de *O. libertate* (Solokov & Wong, 1972). Incluso, algunos autores consideraron a *O. libertate* como la única especie del género en la costa noroccidental de México (Berdegue, 1956). La mayor parte del esfuerzo de investigación en los peces pelágicos menores en el Golfo de California se ha dirigido a la sardina monterrey, por ser la especie que predomina en esa región (e.g. Félix-Uraga *et al.*, 1986; Lluch-Belda *et al.*, 1989; Nevárez-Martínez *et al.*, 2006).

A la fecha, el conocimiento que se tiene sobre la sardina crinuda en el ámbito de las pesquerías es impreciso debido a la carencia o deficiente identificación de las especies que integran el recurso. Lo anterior representa un inconveniente considerable para la evaluación poblacional, ya que los modelos de evaluación son basados en parámetros (fecundidad, proporción de sexos, etc.) inespecíficos, que pueden sesgar las estimaciones de la biomasa del recurso.

En el presente estudio se analiza la variabilidad genética a partir de secuencias del ADN mitocondrial (ADNmt) y la variabilidad morfométrica a partir de la forma corporal de las especies que integran el complejo de la sardina crinuda en la zona sur del Golfo de California. La variabilidad morfométrica se fundamenta en que el crecimiento y la forma ocurren sobre una doble regulación: la expresión de la forma es regulada genéticamente (Lombarte & Leonard, 1993; Cardinale *et al.* 2004; Vignon & Morat, 2010); así como ambientalmente mediante los factores tales como la profundidad, la temperatura del agua y el tipo de sustrato que controlan el crecimiento (Lombarte & Leonard, 1993; Gagliano & McCormick, 2004; Mérigot *et al.*, 2007). Estos análisis se realizan con el fin de proporcionar elementos que permitan diferenciar entidades taxonómicas y evaluar los posibles sesgos en la identificación tradicional basada en caracteres merísticos y morfológicos.

Biología y taxonomía de la sardina crinuda

El término sardina crinuda es uno de los nombres comunes por el que se conoce a las cinco especies de género *Opisthonema*. Estas especies pertenecen al orden Clupeiforme, suborden Clupeoidei y familia Clupeidae. Son peces marinos que se encuentran sólo en aguas tropicales y subtropicales cercanas de la costa del continente americano (Berry & Barrett, 1963). El género tiene una especie representante en el Atlántico, *Opisthonema oglinum* (Lesueur, 1818), que habita desde el sur de Brasil (28° de latitud sur) hasta el sur del Golfo de Maine (42° latitud norte), incluyendo Golfo de México y Caribe. En el Océano Pacífico, se localizan *Opisthonema libertate*, *O. bulleri*, *O. medirastre*, y *O. berlangai* (Berry & Barret, 1963); las tres primeras distribuidas desde el norte de Perú hasta la costa occidental de la península de Baja California y Golfo de California, y la última presenta una distribución confinada a los alrededores de las islas Galápagos (Berry & Barrett, 1963) (Fig. 2).



Figura 2 Área de distribución de las cinco especies pertenecientes al género *Opisthonema*

La familia Clupeidae está integrada por peces fusiformes, con forma oval en una sección transversal, con una serie completa de escudetes a lo largo del abdomen (los escudetes pélvicos siempre están presentes); la boca es terminal, tienen dos supra maxilares y los dientes son pequeños. La aleta dorsal es corta y se ubica casi en la mitad del cuerpo. La aletas pélvicas se encuentran enfrente, debajo y justo detrás de la base de la aleta dorsal; la aleta anal es corta y está muy detrás del último radio de la aleta dorsal; las escamas son adherentes y de tamaño moderado, de 40 a 50 en las series laterales (Whitehead, 1985).

El género *Opisthonema* posee como características distintivas una prolongación filamentosa del último radio de la aleta dorsal (Fig. 3), una hilera de escudetes a lo largo de la línea media ventral, hileras de escamas que atraviesan el dorso entre

la cabeza y la aleta dorsal y una molleja elíptica de paredes delgadas (Berry & Barrett, 1963) (Ver diagnosis).

Existen sólo pequeñas diferencias morfológicas entre las cinco especies y la diferenciación práctica entre ellas se basa en la combinación de dos consideraciones: (1) el área geográfica y (2) el número de branquiespinas en relación con la longitud estándar (Berry & Barrett, 1963). Según estos autores, el número de branquiespinas en el hueso ceratobranquial del primer arco branquial varía de acuerdo con la especie: *O. bulleri* presenta entre 28 y 35, *O. medirastre* entre 50 y 68, y *O. libertate* entre 71 y 107.

Diagnosis

Opisthonema libertate (Günther, 1866).-Las branquiespinas ceratobranquiales aumentan en número con el incremento correspondiente de la longitud corporal hasta tamaños de más de 200 mm de LE; 79 a 110 branquiespinas ceratobranquiales en ejemplares de 200 mm de LE.

Opisthonema medirastre Berry & Barret, 1963.-Branquiespinas ceratobranquiales aumentando en número con el correspondiente incremento de la longitud corporal hasta cerca de 170 a 200 mm de LE; en especímenes de 200 mm de LE se encuentran de 50 a 69 branquiespinas ceratobranquiales.

Opisthonema bulleri (Regan, 1904).- Las branquiespinas ceratobranquiales aumentan en número con el correspondiente incremento de la longitud corporal hasta cerca de 140 a 170 mm de LE; 26 a 36 branquiespinas ceratobranquiales en especímenes de 170 a 200 mm de LE.

En las costas de Sinaloa, el desove de *O. libertate* se presenta en los meses de verano-otoño, mientras que en *O. bulleri* ocurre en primavera y verano. La época reproductora de *O. medirastre* no se ha definido por completo para el noroeste mexicano. Sin embargo, se ha planteado que el periodo más probable sea invierno (Páez-Barrera, 1976; Rodríguez-Domínguez, 1987). Estas especies se alimentan principalmente de fito y zooplancton.

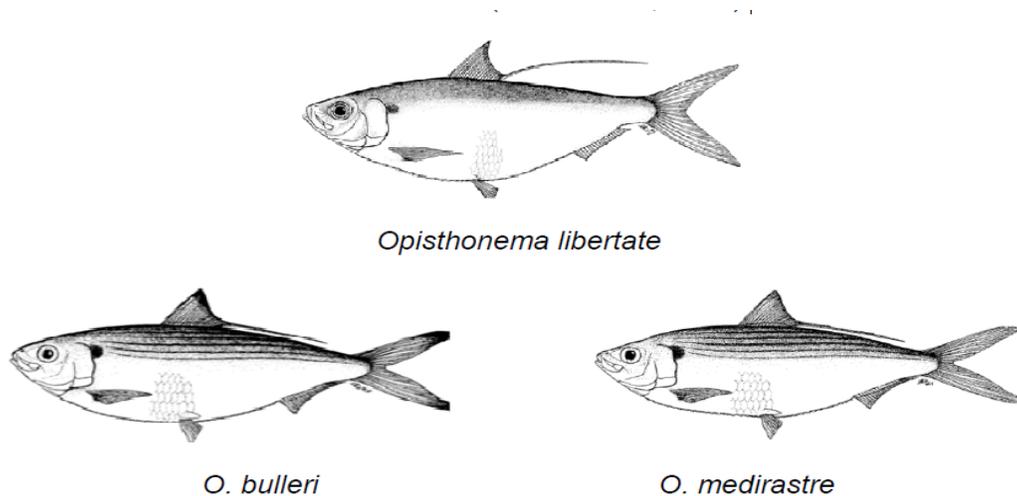


Figura 3 Especies de sardina crinuda objeto de la pesquería de pelágicos menores en el sur del Golfo de California (tomadas de Fisher *et al.*, 1995).

La aplicación de la morfometría geométrica

El uso de la morfometría para el estudio de los peces tiene sus bases desde finales del siglo XIX cuando la cuantificación de las variaciones de la forma se empezó a utilizar para discernir entre grupos de organismos por medio de la comparación de tallas (Cadrin, 2000). Esto significó un avance, pero sus alcances fueron limitados debido a que la aproximación se basaba en una comparación univariada (King, 1985). Lo anterior imponía una limitante al análisis corporal debido a que la morfología de los individuos es multidimensional y su variación es un fenómeno multifactorial por naturaleza (Zelditch *et al.*, 2004).

La morfometría geométrica es una de las técnicas empleadas para medir la variación en la forma que ha sido aplicada a la resolución de problemas de índole taxonómico (ver. Zelditch *et al.*, 2004). Esta técnica se basa en la detección y registro de marcas corporales homologas a través del empleo de sus coordenadas para representar matemáticamente la forma del cuerpo. Con esta información es posible cuantificar la diferencia entre unidades biológicas en términos de la intensidad y dirección de las deformaciones (Vergara-Solana, 2012). Esta técnica además permite una representación gráfica de las diferencias, por medio de las gradillas finas de deformación (Bookstein, 1989).

La utilidad de la morfometría geométrica para problemas taxonómicos radica en que es una herramienta poderosa para cuantificar diferencias morfológicas que pueden ser empleadas para inferir la cercanía filogenética y/o ecológica (Ridley, 2003; Cadrín *et al.*, 2005). La aplicación más común de esta herramienta en los trabajos taxonómicos es para discriminar grupos y cuantificar las diferencias entre éstos (e.g. Rohlf, 1998; Adams *et al.*, 2004; Zelditch *et al.*, 2004). En peces, estos análisis se basan en la cuantificación de las características morfológicas externas, y son útiles en la evaluación de la existencia de stocks fenotípicos (Cadrin & Friedland, 1999; Cadrin, 2000; Ibañez-Aguirre *et al.*, 2006; Ramírez-Pérez *et al.*, 2010; García-Rodríguez *et al.*, 2011). Alternativamente, la delimitación de los grupos fenotípicos también se ha basado en el análisis morfométrico de estructuras específicas como otolitos (DeVries *et al.*, 2002; Félix-Uraga *et al.*, 2005) o escamas (Ibañez *et al.*, 2007) y urohiales (Chollet-Villalpado, 2012).

La morfometría geométrica también ha sido utilizada para analizar los patrones de crecimiento de las especies, lo que puede aportar información para apoyar la resolución de problemas taxonómicos (Loy *et al.*, 1998; Zelditch *et al.*, 2003; Zelditch *et al.*, 2004). De igual forma, es una técnica ideal para analizar los patrones alométricos debido a que los modelos conceptuales relacionados con este fenómeno fueron formulados en términos geométricos (Alberch *et al.*, 1979). El término alometría se utiliza para hacer referencia al cambio en las proporciones corporales respecto al cambio de magnitud del organismo (Gould, 1966).

Aplicación de marcadores moleculares en sistemática

El empleo de la información contenida en los genes para resolver problemas de taxonomía y filogenia, se ha empleado desde hace más de 30 años, cuando se utilizaron sondas para marcar RNA ribosomal para identificar e inferir filogenia de eubacterias y arqueobacterias (Fox *et al.*, 1980). Desde entonces su uso se ha difundido de manera vertiginosa hasta el punto que recientemente se han hecho esfuerzos para generar grandes bases de datos que tienen la intención de resguardar y difundir la información genética de la biodiversidad global (Hebert *et al.*, 2003; Tautz *et al.*, 2003).

Uno de los enfoques del uso del ADN para auxiliar a la taxonomía es la generación de los llamados “códigos de barra genéticos” (*barcodes*, por su denominación en inglés). Los códigos de barra genéticos se fundamentan en la secuenciación de un gen dado de algún espécimen claramente identificado, posteriormente esta secuencia servirá de referencia para comparar la información de especímenes colectados y poder identificarlos de una manera expedita y con un escaso margen de error (Vogler & Monaghan, 2006). Si bien esta idea no es nueva, ha sido extendida por la iniciativa de Hebert *et al.* (2003), la cual implica la estandarización de un fragmento del gen de la Subunidad I del Citocromo Oxidasa (COI). Es conveniente señalar que los códigos de barra no son un sistema taxonómico por sí mismo, más bien es un sistema de identificación (Vogler & Monaghan, 2006).

El análisis de secuencias de genes es una de las áreas más activas dentro de los usos de datos moleculares en taxonomía (e.g. Nei & Kumar, 2000; Wiley & Lieberman, 2011). Específicamente, secuencias de ADN mitocondrial (ADNmt) son una herramienta útil para la discriminación de especies (Kocher *et al.*, 1989). La importancia del ADNmt reside principalmente en el hecho de que es de origen uniparental y en consecuencia proporciona relevante información sobre los linajes evolutivos. Esta estrategia de secuenciación, ha sido ampliamente utilizada para inferir filogenias (Nei & Kumar, 2000; Wiley & Lieberman, 2011)

Una ventaja de emplear secuencias de genes para resolver problemas taxonómicos deriva de la gran cantidad de caracteres que se encuentran contenidos en cada gen (Hills & Weins, 2000). En particular, los genes 16SrRNA, Citocromo b y el COI se han utilizado para resolver problemas en la identificación de especies (e.g. Grant & Utter, 1984; Patarnello *et al.*, 1994; Di Finizzio *et al.*, 2007; Imaizumi *et al.*, 2007; Lakra *et al.*, 2009). También, a partir del análisis molecular es posible comparar linajes distantes, los cuales por la ausencia de diversos caracteres morfológicos compartidos resulta complicado realizar comparaciones basadas en expresiones fenotípicas (Hills & Weins, 2000).

Si bien los datos moleculares presentan algunas ventajas sobre los datos tradicionalmente usados en taxonomía, tampoco puede ser aceptado que estos sean considerados como la única fuente de información requerida (Vergara-Solana, 2012). Por ejemplo, el análisis de secuencias puede no soportar diferencias entre individuos aun existiéndolas, cuando el proceso de especiación se deba a cambios en el número de cromosomas (e.g. poliploidias) (Moriz & Cicero, 2004). También existen especies que son difíciles de distinguir molecularmente cuando el tiempo que han tenido para divergir, después del aislamiento, no ha sido suficiente (Vergara-Solana, 2012). De esta manera, información de naturaleza distinta debe ser incluida para sustentar el estatus taxonómico conveniente, ya que el uso de las secuencias de los genes por lo general no aportan tanta información para el conocimiento de la biología del organismo, como podría ser aquel inferido y soportado por análisis conductuales, fisiológicos o anatómicos. Considerando lo anterior, el uso de distintas estrategias complementarias puede llevar a una mejor comprensión y descripción del elenco taxonómico con el que contamos (Vergara-Solana, 2012).

La intención principal de este estudio es revisar si el complejo de sardina crinuda se encuentra conformado por tres entidades distintas como actualmente se establece, con base en la aplicación técnicas moleculares y morfométricas. Cabe precisar que la definición precisa de estas especies permitirá una mejor evaluación de los “stocks”, y una mayor comprensión de la dinámica poblacional de las especies.

ANTECEDENTES

La literatura existente sobre las especies de *Opisthonema* del Pacífico no es tan abundante como para otras especies de pelágicos menores de importancia comercial. Relativamente son pocos los trabajos que analizan sus aspectos biológicos o pesqueros. La mayoría de ellos se refieren a nivel de género, principalmente debido a la problemática en la diferenciación de las especies en todas sus fases de vida (Vallarta-Zarate, 2012).

La gran similitud morfológica en las especies de *Opisthonema* ha generado la duda si las diferencias encontradas podrían reflejar variabilidad intra-específica o la existencia de caracteres diagnósticos de cada especie, como sucede en otras especies (Medina-Espinoza, 2013).

Berry & Barret (1963) describieron cinco especies del género *Opisthonema*: *O. libertate*, *O. medirastre*, *O. bulleri* (para el Pacífico Oriental), *O. berlangai* (Islas Galápagos) y *O. oglinum* (del Atlántico), y elaboraron un método para su identificación, el cual se basa en el número de branquiespinas del hueso ceratobranquial del primer arco branquial en función de la longitud patrón y el área geográfica de captura: entre 28 y 35 branquiespinas corresponde a *O. bulleri*, entre 50 y 68 a *O. medirastre*, entre 71 y 107 a *O. libertate*, entre 58 y 80 a *O. berlangai* y entre 30 y 46 a *O. oglinum*.

Desde entonces han existido discrepancias respecto a la validez para *Opisthonema medirastre*, debido principalmente a su gran semejanza con *O. libertate*, y en algún tiempo se planteó que se trataba de una sola especie o razas geográficas cuyo proceso evolutivo no había alcanzado aún el nivel específico (Lagunez-Moreno, 1989).

La validez específica de los caracteres merísticos propuestos por Berry & Barret (1963) fue cuestionada por Rodríguez-Sánchez (1985), al emplear un método tridimensional y método de densidad de branquiespinas para la separación de las especies. La base de estos métodos es que el espacio interbranquial aumenta de *O. libertate* a *O. medirastre* y es aún más grande en *O. bulleri*, así la densidad de branquiespinas disminuye en el mismo sentido. Con base en ello, este autor señala que con los caracteres merísticos propuestos por Berry & Barret (1963) solo podían distinguirse dos especies; *O. libertate* y *O. bulleri* ya que los caracteres merísticos propuestos para identificar a *O. medirastre* eran solo una continuación en número de caracteres de *O. libertate*.

Por su parte, López-Lemus (1986) basado en un análisis de polimorfismo de alozimas (electroforesis) propuso la hipótesis de que se trataba de una sola

especie con tres morfo-tipos. Ya que al igual que otros autores, señala que un mismo genotipo se expresa de formas distintas a distintos ambientes (Gould *et al.*, 1974; Woodruff & Gould, 1980; Lam & Calow, 1988; Sánchez *et al.*, 2011). A su vez, Lagunez-Moreno (1989) mediante análisis cariológico y análisis electroforético en proteínas de las especies *O. libertate* y *O. medirastre* en las costas de Baja California Sur, sugirió la presencia de una sola especie de acuerdo con la variación intra específica para esta región.

Rodríguez-Domínguez (1987) y Hedgecock *et al.* (1988) encontraron características bio-ecológicas y genéticas, respectivamente, que validan específicamente los caracteres merísticos propuestos inicialmente por Berry & Barrett (1963) para la identificación de las tres especies del género *Opisthonema* Gill, 1861 del Pacífico Mexicano.

Torres-Ramírez (2004) propuso criterios complementarios para la identificación taxonómica del complejo *Opisthonema* spp. Estos se basan en la forma de inserción de la branquiespina en la base del segmento ceratobranquial y la cantidad de espículas en el cuerpo de la branquiespina en cada una de las especies. Además, señala otras características cualitativas, como el color del hueso ceratobranquial, para *Opisthonema bulleri* un color rojo oscuro, para *O. medirastre* un color menos rojo y para *O. libertate* un color más atenuado casi blanco. También comenta que las branquiespinas de la parte ceratobranquial son de diferente grosor. En *O. bulleri* la branquiespina es gruesa y corta, en *O. medirastre* es menos gruesa y un poco más larga y en *O. libertate* las branquiespinas es delgada y larga.

Si bien trabajos existentes contemplan descripciones anatómicas y morfológicas (Rodríguez-Sánchez, 1985; Rodríguez-Domínguez, 1987; Hedgecock *et al.*, 1988; Torres-Ramírez, 2004) y estudios moleculares basados en análisis de alozimas (López-Lemus, 1986; Hedgecock *et al.*, 1988), en conclusión, estos trabajos denotan una incertidumbre sobre la composición específica del género *Opisthonema*.

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 forma del cuerpo y en datos moleculares sustentados en secuencias de ADN resultaran de gran utilidad para resolver dicha problemática (Zelditch *et al.*, 2004; Lee, 2004). En particular, la aplicación de la morfometría geométrica ha permitido reconocer variaciones morfológicas difíciles de detectar mediante otras aproximaciones (Márquez *et al.*, 2010). Por otra parte, el empleo de datos genéticos resulta primordial para determinar los niveles de divergencia y de relaciones filogenéticas. Por tal motivo, secuencias de ADN, principalmente ADN mitocondrial, correspondientes a genes tales como el 16SrRNA y el COI, han sido ampliamente utilizados en estudios taxonómicos y de sistemática (Matsumoto, 2003; Campbell *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2009).

La mayoría de los estudios realizados en México sobre el género *Opisthonema* en el Pacífico Oriental (Rodríguez-Sánchez, 1985; Rodríguez-Domínguez, 1987; Hedgecock *et al.*, 1988; Lagunez-Moreno, 1989; Torres-Ramírez, 2004) consideran en principio el trabajo de Berry & Barret (1963) quienes reconocen tres especies, de manera de hipótesis nula, en el presente estudio la asignación *a priori* de las entidades se realizó de acuerdo a esta postura.

JUSTIFICACIÓN

Los peces pelágicos menores representan alrededor del 50% de la captura de organismos marinos en México (SAGARPA, 2013). Su pesquería se desarrolla básicamente en el noroeste mexicano y la captura se descarga principalmente en Ensenada, Baja California; en San Carlos y Adolfo L. Mateos en Baja California Sur; Mazatlán, Sinaloa y en Guaymas y Yavaros en Sonora. Esta actividad sobresale en el Golfo de California del resto de las zonas de pesca, debido a que ahí se registran los mayores volúmenes de captura. La captura comercial la integran siete especies entre sardinas, anchovetas y la macarela. La sardina del Pacífico *Sardinops sagax* es la especie objetivo, excepto en las costas de Sinaloa donde la pesca se dirige a la sardina crinuda (*Opisthonema* spp.). Lo anterior ha

repercutido en el interés de los estudios biológico-pesquero, los cuales se han centrado principalmente en la sardina del Pacífico (Félix-Uraga 2005; Morales-Bojórquez 2003), el resto de las especies poco se han abordado, más allá de sus cambios anuales en la captura total de pelágicos menores.

La pesca de sardina crinuda en el sur del Golfo de California ha adquirido gran importancia en la última década, lo que ha generado la necesidad de estudios que aporten y complementen información requerida para establecer regulaciones con fines administrativos y de manejo para estas especies (Vallarta-Zarate, 2012).

Se considera que del complejo *Opisthonema* spp., la mayor proporción específica en la captura le corresponde aparentemente a *O. libertate*. Sin embargo, las estimaciones poblacionales pueden estar sesgadas ya que las evaluaciones se hacen sin discriminar entre las especies, esto puede tener repercusiones considerables en la interpretación de los análisis pesqueros. De esta manera, es importante establecer una forma adecuada para discriminar a las especies del género.

Debido a lo anterior, el presente estudio aportará como base metodológica, a los análisis relacionados con la discriminación práctica de las especies del género *Opisthonema* distribuidos en el Pacífico mexicano, información mediante el análisis de secuencias de ADN mitocondrial y análisis morfométrico a partir de la forma corporal, además de sustentar con mayor robustez la existencia de estas tres especies para esta región.

HIPÓTESIS

El complejo sardina crinuda perteneciente al género *Opisthonema* capturado en el Noroeste de México, se encuentra integrado por tres entidades taxonómicas distintas. Estas entidades presentan diferencias genéticas y morfométricas que pueden ser cuantificadas a partir de análisis de secuencias de marcadores moleculares y de la morfología corporal.

OBJETIVO GENERAL

Analizar diferencias genéticas y fenotípicas de las especies que conforman el complejo *Opisthonema spp.* (Clupeiformes: Clupeidae) en el sur del Golfo de California.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificación específica de los ejemplares de *Opisthonema spp.* utilizando los caracteres merísticos, como el número y las características de las branquias del hueso ceratobranquial del primer arco branquial.
- Evaluar las diferencias morfométricas del cuerpo de los organismos diferenciados mediante criterios merísticos.
- Evaluar la existencia de clados a partir de distancias genéticas entre secuencias de ADNmt dentro del género *Opisthonema* y revisar su congruencia con las entidades detectadas morfológicamente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestreo

De septiembre del 2011 a diciembre del 2012, se recolectaron mensualmente ejemplares de sardina crinuda de los desembarques de la flota sardinera en Mazatlán, la cual pesca desde el norte de Sinaloa al sur de Jalisco (Fig. 4). Las muestras se mantuvieron congeladas hasta su procesamiento en el laboratorio de Biología Pesquera de la Facultad de Ciencias del Mar, en Mazatlán, Sinaloa. Se midió la longitud total (LT), furcal (LF) y estándar (LE) con una precisión ± 1 mm; y se registró el peso total (PT) y peso eviscerado (PE) a una precisión ± 1 g. Durante este proceso se tomaron imágenes digitales del lado izquierdo de los organismos con una cámara digital (Kodak EasyShare CD33, 3.1 megapíxeles) montada sobre una base y con una escala métrica. Además, se recolectó el primer arco branquial, el cual fue lavado con agua, dejado al ambiente por 24 horas y digitalizado posteriormente utilizando una cámara digital empotrada en un estereoscopio. Finalmente, se recolectó una muestra de tejido (músculo) la cual se preservó en alcohol al 96%.

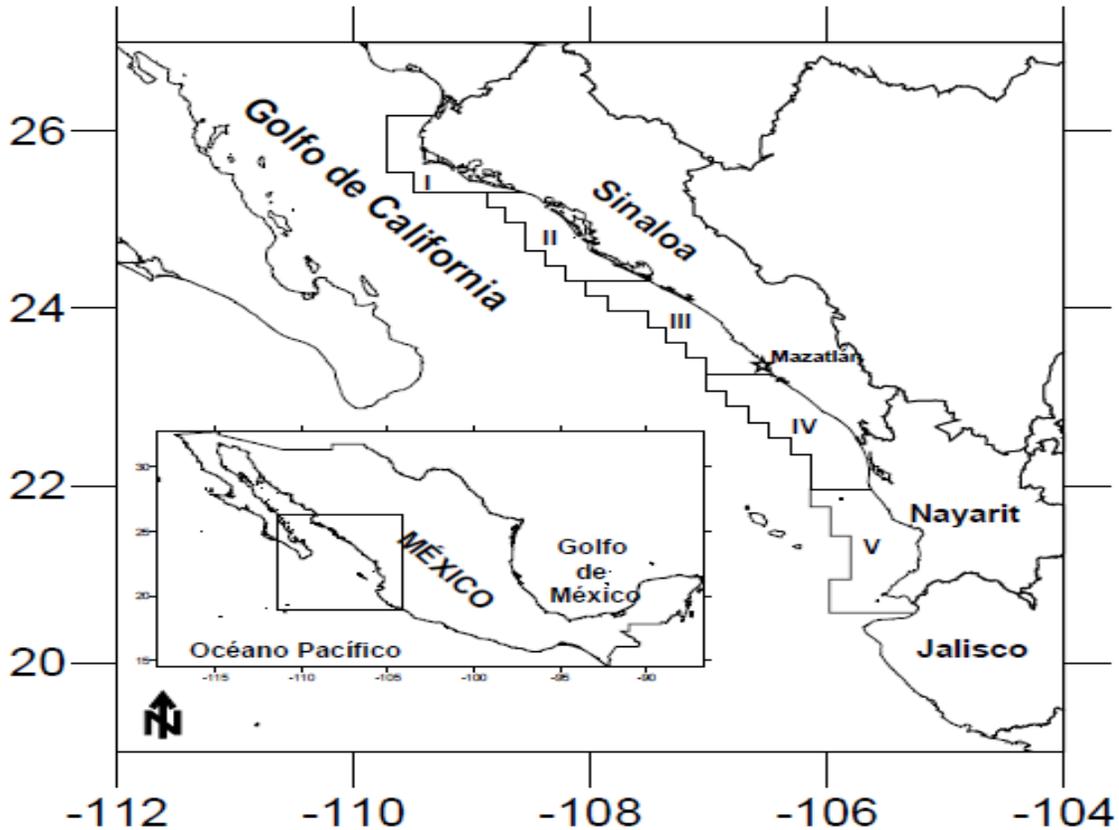


Figura 4. Área de pesca de la flota de pelágicos menores en el sur del Golfo de California y zonas administrativas (I-V).

Identificación de especies a partir de caracteres merísticos

Los organismos muestreados se clasificaron taxonómicamente a través del conteo del número de branquiespinas ceratobranquiales con respecto a la longitud estandar de acuerdo con las claves de Berry & Barret (1963). Para el conteo, fue necesario identificar la union entre los extremos de los huesos hiperbranquial y ceratobranquial. En ese sitio la branquiespina extrema del arco hiperbranquial forman una especie de triángulo en su base, como se muestra en la figura 5. La branquiespina extrema donde el segmento ceratobranquial se une al segmento hypobranquial se identifica porque su base se inserta encima o por delante (hacia el segmento ceratobranquial) y se observa una mancha blanca en el cartílago que une ambos segmentos. El número de branquiespinas y la presencia de espículas fueron evaluadas en las imágenes digitales del primer arco branquial, y en

particular en el hueso ceratobranquial (Fig. 6). Se utilizó el programa TPsDig (F.J. Rohlf, disponible en: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>) para enumerar las branquiespinas y se asignó la especie de acuerdo a su número y a la presencia-ausencia de espículas.

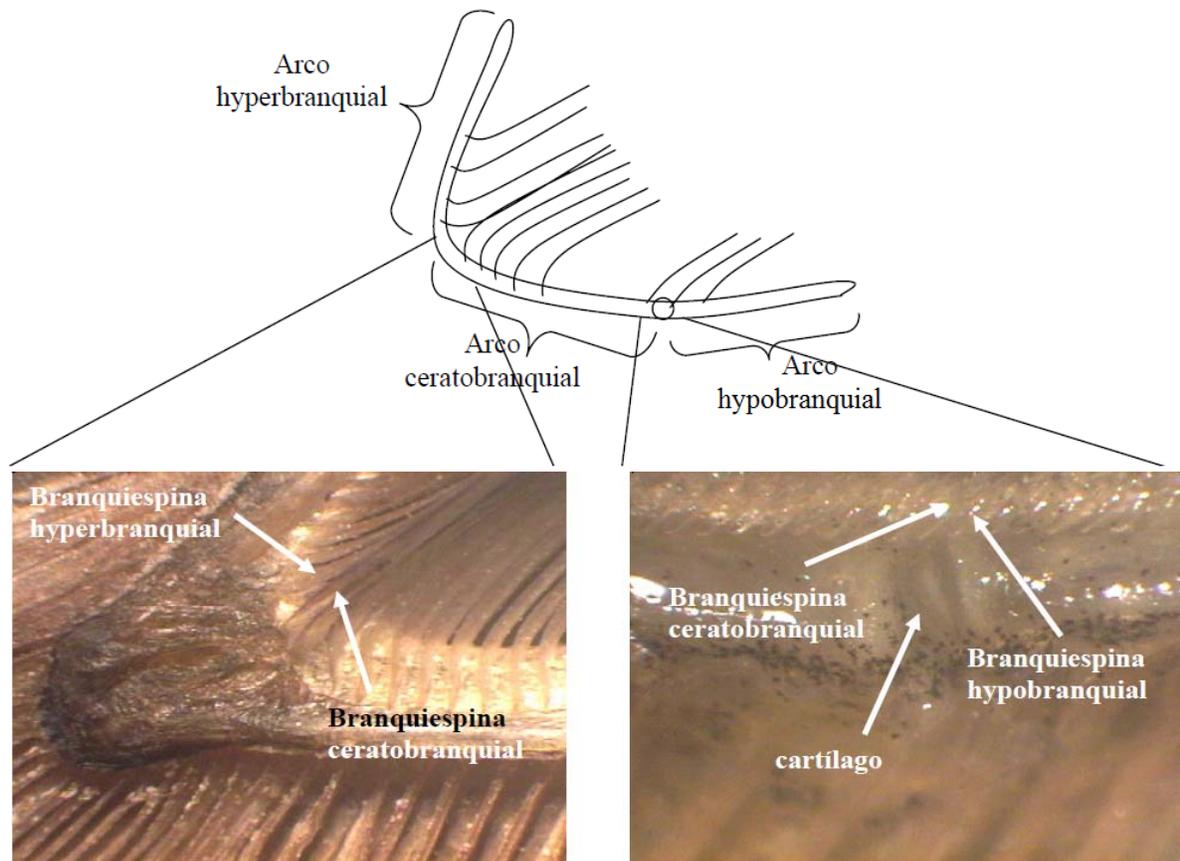


Figura 5. Características de las branquiespinas extremas del segmento ceratobranquial del primer arco branquial de un ejemplar de sardina crinuda.

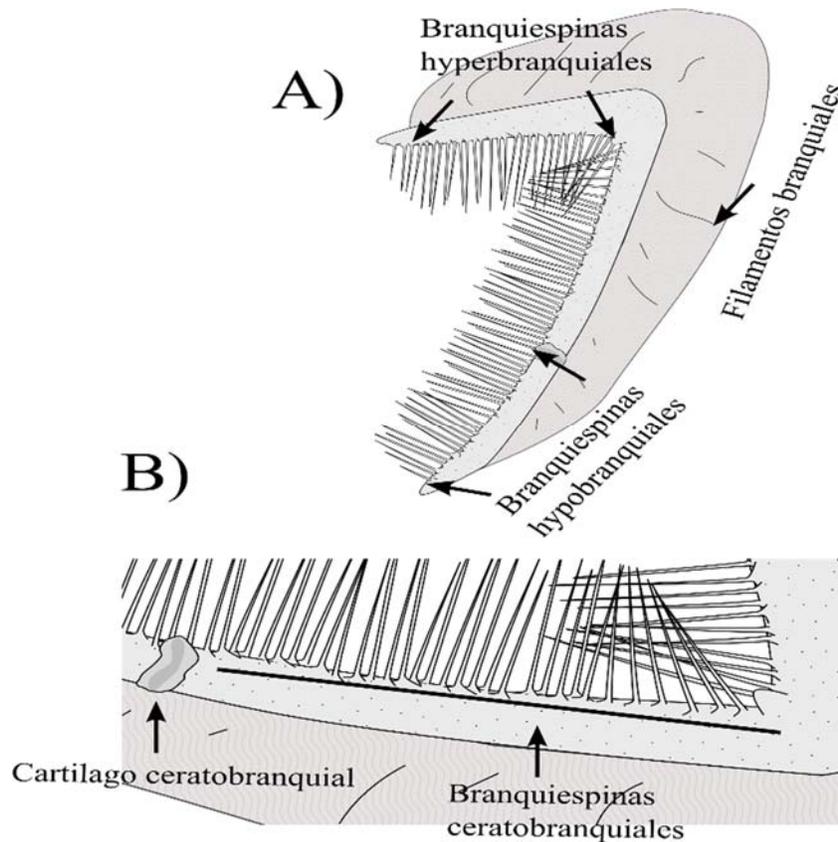


Figura 6. Características de las branquiespinas extremas del segmento ceratobranquial del primer arco branquial de un ejemplar de sardina crinuda. **a)** primer arco branquial de cada ejemplar de *Opisthonema*, **b)** branquiespinas y hueso ceratobranquial, utilizado para la primera identificación específica de los ejemplares de *Opisthonema* mediante el conteo de cada una de las branquiespinas.

Diferencias morfométricas entre especies

El análisis de las diferencias entre la forma del cuerpo de los organismos muestreados se realizó utilizando las imágenes digitales. Todas las imágenes en formato jpg fueron cargadas en una computadora para su posterior caracterización morfométrica.

La descripción y comparación de la forma del cuerpo del pez, fue basada en las configuraciones generadas de la digitalización (coordenadas X, Y) de marcas anatómicas naturales (“Landmarks” término con el que se conoce en la literatura inglesa) ubicadas principalmente sobre el contorno del cuerpo. El criterio para la

selección de las marcas consistió en elegir aquellas que pudieran reconocerse fácilmente y que estuvieran en el mismo plano.

Para poder representar zonas del cuerpo sin marcas naturales (contornos), se generó a partir de las marcas naturales una gradilla de referencia con distancias radiales angularmente equidistantes que pudieran ser comparables en todos los organismos (Fig. 7a). Las referencias fueron creadas en el programa MakeFan (Sheets, 2004). Una vez que se construyeron las referencias, se pudieron asignar y ubicar puntos (semi-marcas o semi-landmarks) en la intersección de cada distancia radial con el contorno del cuerpo (Fig. 7b). En total se seleccionaron 13 puntos de referencia (considerando marcas y semi-marcas; Fig. 7c). De esta manera se obtuvo la configuración de cada organismo. Todas las digitalizaciones fueron realizadas empleando el programa TpsDig (Rohlf, 2004).

El efecto ajeno a la variación propia de la forma como la posición, escala y rotación de las configuraciones de los puntos que definieron el contorno del cuerpo del organismo, fueron eliminados de la siguiente manera. El efecto de los dos primeros se eliminará poniendo todas las configuraciones sobre un mismo origen y escalándolas a un mismo tamaño del centroide (en geometría, el centroide de un objeto "A" perteneciente a un espacio n -dimensional es la intersección de todos los hiperplanos que dividen a "A" en dos partes de igual n -volumen con respecto al hiperplano. Matemáticamente, es el promedio de todas las coordenadas que definen al objeto "A"). El efecto de la rotación, fue eliminado mediante el proceso de superimposición de Procrustes Generalizado el cual consiste en minimizar las diferencias entre los puntos homólogos, ajustándolos a través del procedimiento de mínimos cuadrados. Es pertinente mencionar que el espacio donde se realiza el ajuste de Procrustes Generalizado es una hiperesfera de n -dimensiones, conocido como el espacio de Kendall.

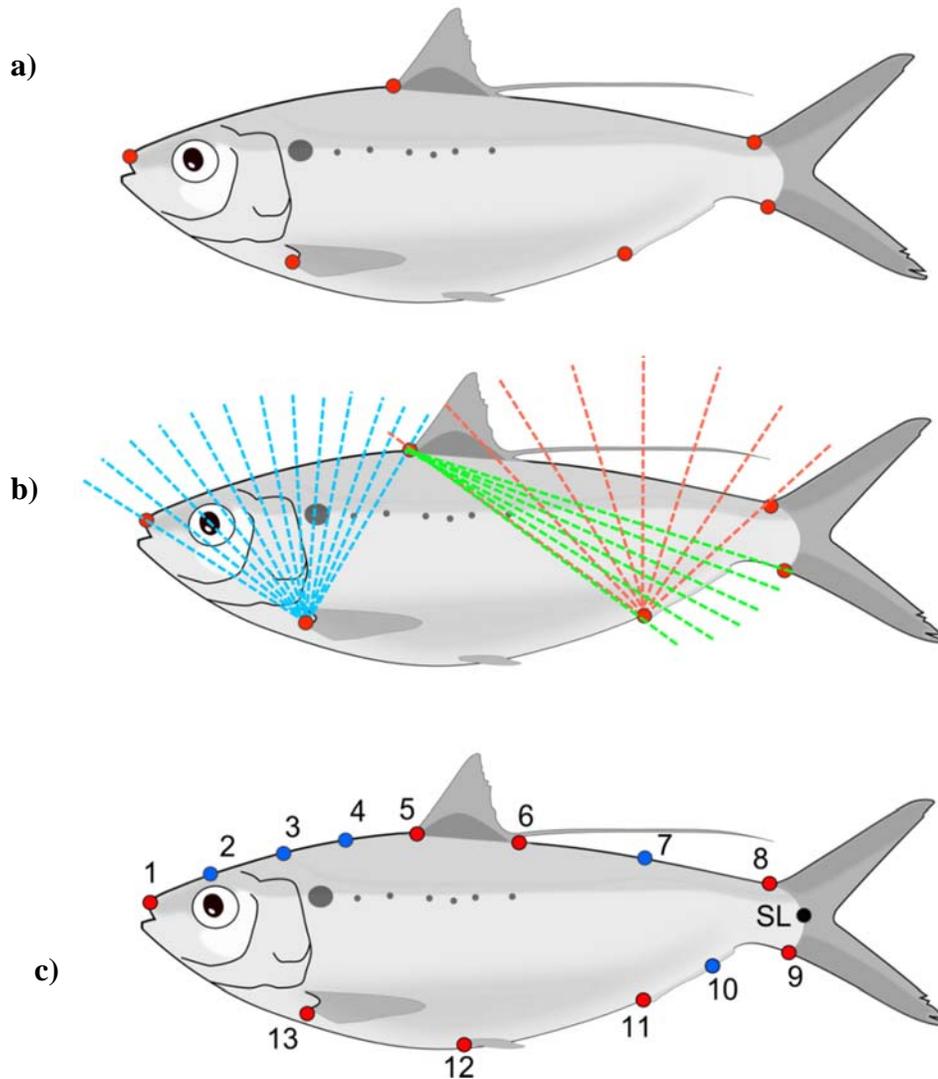


Figura 7. Marcas naturales utilizadas para generar las referencias **(a)**. Gradillas de referencias con distancias radiales angularmente equidistantes **(b)**, y configuración obtenida de cada pez integrada a partir de la selección de 13 marcas totales **(c)**. Los puntos rojos indican las marcas naturales ubicadas a partir de referencias anatómicas y los puntos azules las (semimarcas).

Análisis de los datos morfométricos

Las coordenadas ajustadas mediante el método de Procrustes Generalizado fueron transformadas mediante un análisis de componentes principales (CP) con la matriz de las fuerzas de deformación. Este procedimiento se realiza para evitar tener variables correlacionadas entre si y para llevar las variables de un espacio

curvo (espacio de Kendall) a uno euclidiano, ya que hacer análisis estadísticos es necesario tener variables que cumplan con estas premisas.

Este análisis consiste en generar nuevas variables a través de ajustar una función de interpolación a las coordenadas X, Y de los puntos homólogos para cada organismo en una muestra con respecto a una referencia, esta interpolación genera una matriz de fuerzas de deformación (con estas variables se construyen las gradillas finas de deformación). La referencia fue la configuración promedio de los puntos homólogos. Posteriormente se realizó el CP para generar unas nuevas variables llamadas Deformaciones Parciales, (Rohlf, 1993).

Los scores de las Deformaciones Parciales fueron usados para realizar los análisis estadísticos. En primer lugar se realizó un Análisis de Variables Canónicas (AVC), el cual describe la variación entre grupos. El AVC produce un nuevo juego de variables que son las combinaciones lineales de las variables originales que buscan maximizar la varianza que discrimina los grupos. Las diferencias en los grupos se observaron al graficar los valores (scores) producidos del AVC. Estadísticamente, la diferencia entre grupos fue revisada mediante un Análisis de Varianza Multifactorial (MANOVA, por sus siglas en inglés), y probada a partir del valor de Lambda de Wilks (Λ) cuyo límite inferior (cero) indica una discriminación perfecta y su límite superior (1) sugiere no diferenciación.

Se obtuvo una matriz de asignación empleando las distancias cuadráticas de Mahalanobis sobre los "scores" producidos por el AVC. La asignación se basa en considerar la distancia existente entre cada individuo y la media del grupo más cercano. Además, este cálculo de las distancias cuadráticas de Mahalanobis se utilizó para construir un dendograma con el fin de visualizar las afinidades entre las formas diferentes de especies. Los resultados del AVC fueron obtenidos con el programa CVAGen6m (Sheets, 2004) y las distancias cuadráticas de Mahalanobis así como el dendograma se realizaron por medio de los programas de cómputo Statistica v.8 ([www. Statsoft.com](http://www.Statsoft.com)) y el módulo Neighbor del programa de cómputo PHYLIP v. 3.69 (Felsenstein, 1989), respectivamente. El error de la clasificación fue determinado con el coeficiente kappa de Cohen (k), el cual evalúa la diferencia

entre el azar y el porcentaje de asignación correcta (Tuset *et al.*, 2003). El coeficiente (k) varía entre 0 a 1, con valores más altos indican una asignación adecuada. En general, un $k > 0.70$ es considerada satisfactoria (Bakeman, & Gottman, 1986).

Se realizó un análisis complementario para corroborar las diferencias entre las especies y para visualizar las diferencias entre las especies mediante las gradillas finas de deformación, para esto se realizó una comparación pareada de la distancia Procrustes (prueba F-Procrustes) entre las configuraciones de cada uno de los grupos. La significancia de la prueba estuvo basada en la comparación del valor de F (razón de varianza) obtenido de los valores observados con aquellos valores obtenidos mediante 100 re-muestreos. La significación de la prueba se obtuvo del porcentaje de veces que el valor de F fue igual o mayor que el valor de F obtenido de los datos observados. Estos análisis fueron realizados en el programa TwoGroup (Sheets, 2004).

Divergencia genética entre especies

Extracción de ADN y selección de iniciadores

De cada individuo se emplearon aproximadamente 200µg de tejido muscular. Para la extracción del ADN total se emplearon 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 1. 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 transluminador *UV Labnet International, Inc.*

En el presente estudio se aislaron y caracterizaron secuencias parciales del gen de la Sub-unidad I del Citocromo Oxidasa (COI) ya que además de ser el fragmento estándar para generar códigos de barras, este gen debido a su tasa de

mutación permite hacer inferencias a una escala poblacional así como a nivel de especie o de género (De Oliveira- Ribeiro, 2012).

Para seleccionar los iniciadores para el PCR 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 la información relacionada con iniciadores empleados para amplificar el COI de las especies de *Opisthonema*. A partir de esta búsqueda se encontraron y probaron los iniciadores reportados por Ward *et al.* (2005) (FishF1, FishF2, FishR1, FishR2) y Folmer *et al.* (1994) (LCO1490 y HCO2198) empleando las diferentes combinaciones:

- a) FishF2 (5'TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC-3') y FishR2 (5'ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA-3');
- b) FishF1 (5'TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3') y FishR2 (5'ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA-3'),
- c) FishR1 (5'TAGACTTCTGGGTGGCAAAGAATCA-3') y FishF2 (5'TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC-3')
- d) LCO1490 (5'GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') y HCO2198 (5'TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3')

De los resultados de estos ensayos, la combinación de iniciadores FishF2 y FishR2 fue la que tuvo un mayor éxito en las amplificaciones de las tres especies del género *Opisthonema* y en consecuencia fueron los iniciadores empleados en este trabajo.

Amplificación y edición de secuencias

A partir del ADN total extraído se amplificaron las secuencias del COI mediante la PCR empleando los iniciadores FishF2 y FishR2. El volumen de la reacción fue de 25µl y fue constituida de la siguiente manera: 1.16µl de ADN genómico; 2.5µl PCR Buffer Taq (10x); 0.5µl dNTP's (10mM) (*Invitrogen*); 1µl MgCl (50mM) (*Invitrogen*),

0.7µl de cada iniciador (10µM); 17.761 µl H₂O milli-Q y 0.125 U de *Taq* DNA polimerasa (*Invitrogen*). Se empleó un termociclador *BIORAD-Thermal cycler* utilizando el siguiente protocolo: una desnaturalización a 94°C por 2 min, seguido de 35 ciclos integrados por una desnaturalización a 94°C durante 30 s, un alineamiento a 49°C durante 30 s, y una extensión a 72°C por 1 min. Después de completados los 35 ciclos, se realizó una extensión final a 72°C durante 10 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 20 minutos 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 ambos sentidos.

Las secuencias obtenidas fueron comparadas, mediante el software *BLAST: Basic Local Alignment Search Tool* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), con las secuencias depositadas en el *GenBank*®, para verificar si efectivamente las secuencias obtenidas correspondían a especies similares o del mismo género y al mismo fragmento del mtADN. Una vez realizada dicha comprobación, las secuencias fueron arregladas y editadas, se verificó la complementariedad de las hebras y se corrigieron las ambigüedades, obteniendo una secuencia única de cada individuo. Lo anterior fue realizado empleando los softwares *Sequencher 5.0* y *Chromas Pro 1.41*. Posteriormente, todas las secuencias fueron alineadas a partir del algoritmo *Clustal W* (Larkin *et al.*, 2007) y limitadas a un mismo tamaño (583 pb) en el software *MEGA 5.05*® (Tamura *et al.*, 2011).

Análisis de datos genéticos

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 & 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).

Finalmente, se realizó un dendrograma 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 apareadas más cortas entre los *taxa*. Se utilizó el modelo de sustitución de Kimura-2 parámetros y la robustez de las ramas fue estimada a partir de 1000 iteraciones. El mejor árbol es aquel que minimiza las diferencias genéticas (Lemey *et al.*, 2009; Tamura *et al.*, 2011).

RESULTADOS

Diferencias merísticas

Durante el periodo de estudio (septiembre del 2011-enero del 2014) se muestrearon 1,598 organismos de sardina crinuda (Tabla 1). Se recolectaron muestras en todos los meses, excepto en febrero por cuestiones logísticas y en octubre, cuando opera una veda a la pesca por la baja disponibilidad del recurso. En abril el número de sardinas recolectadas no superaron los 30 ejemplares, y en el resto de los meses la muestra fue ≥ 60 ejemplares. También, las zonas de pesca estuvieron representadas en el muestreo (Tabla 2). El muestreo incluye la distribución espacio-temporal de la pesca para la zona de estudio (noviembre-septiembre). Además, de que presenta un patrón consistente en la proporción del muestreo en las zonas administrativas de pesca.

Tabla 1. Resumen del número de sardinas crinuda *Opisthonema* spp. muestreadas por mes en las descargas realizadas en Mazatlán. La zona de pesca es el sur del Golfo de California. Septiembre 2011–enero 2014.

Género	ene	mar	abr	may	jun	jul	ago	sep	nov	dic	Total
<i>Opisthonema</i>	214	139	30	100	62	298	279	190	92	194	1,598

Tabla 2. Resumen del número de sardinas crinuda *Opisthonema* spp. muestreadas por zona de pesca (I-V) en el sur del Golfo de California, durante septiembre 2011–enero 2014.

Género	I	II	III	IV	V	Sin Referencia	Total
<i>Opisthonema</i>	229	119	626	281	41	302	1,598

De los 1,598 organismos muestreados, a 1,254 fue posible asignarle una categoría taxonómica específica de acuerdo con los criterios de Berry & Barret (1963) y de Torres Ramírez (2004). El diagrama de dispersión de la longitud estándar (LE) y número de branquiespinas ceratobranquiales se presenta en la figura 8. Es notable que en el intervalo de 13 a 18 cm de LE se presenta un continuo en la nube de puntos que superar los límites del intervalo de branquiespinas por especie; para estos ejemplares fueron clave, para la asignación por especie, los criterios de Torres Ramírez (2004). Del material biológico recolectado, el 13.3% le corresponde a *O. bulleri*, el 33.8% a *O. medirastre* y el 52.9% a *O. libertate*. Estacionalmente, *O. libertate* es la especie más abundante en los muestreos desde noviembre (inicio de la temporada de pesca) hasta mayo y de junio a septiembre *O. medirastre* (Fig. 9). *O. bulleri*, la menos representada en el muestreo presentó dos picos uno en marzo y el otro en julio.

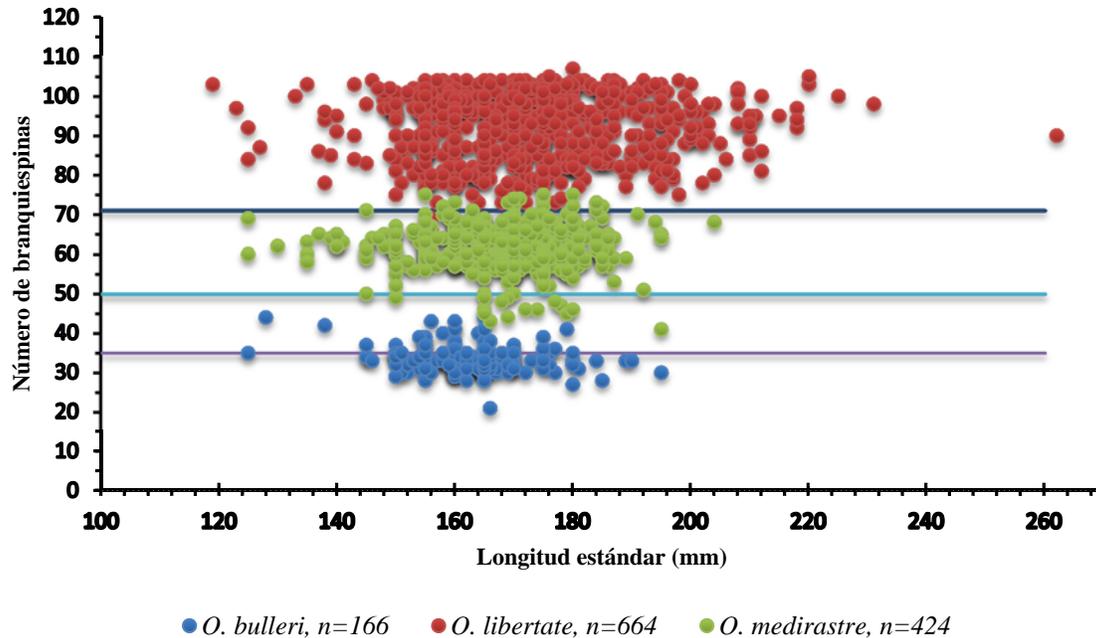


Figura 8. Diagrama de dispersión del número de branquiespinas ceratobranquiales del primer arco branquial respecto de la LE de la sardina crinuda capturada en las costas del sur del Golfo de California. Las líneas horizontales definen los límites del intervalo del número de branquiespinas de acuerdo con Berry & Barret (1963). *O. bulleri* 28-35, *O. medirastre* 50-68 y *O. libertate* 71-107.

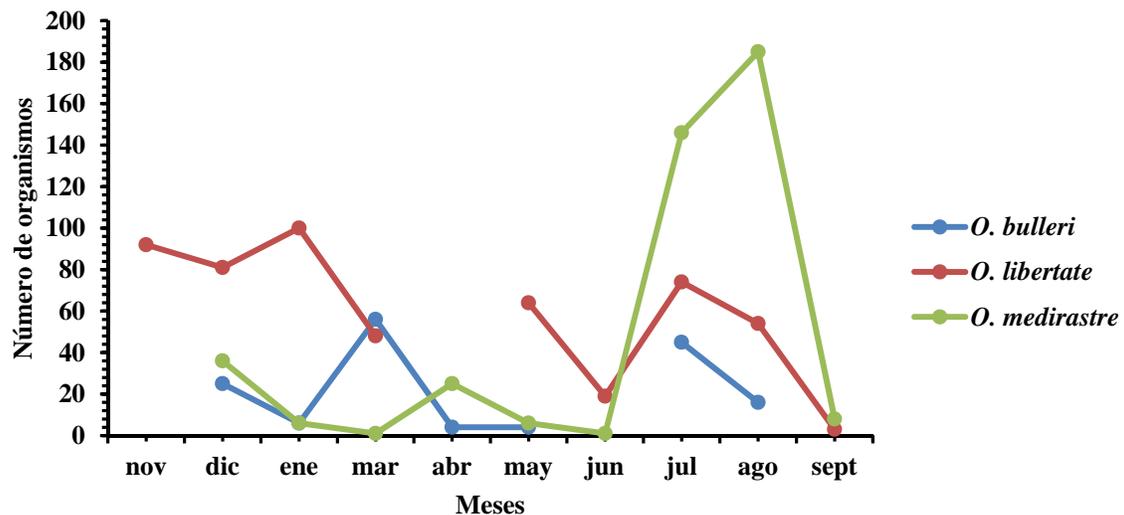


Figura 9. Número de especímenes muestreados por mes por especie del complejo *Opisthonema* de las capturas en la parte sur del Golfo de California.

Los ejemplares identificados como *O. libertate* y los identificados como *O. medirastre* presentaron una base recta de las branquiespinas ceratobranquiales

(Fig. 10a y 10b). A diferencias de lo anterior, las sardinas identificadas como *O. bulleri* presentaron una base oblicua (Fig. 10c).

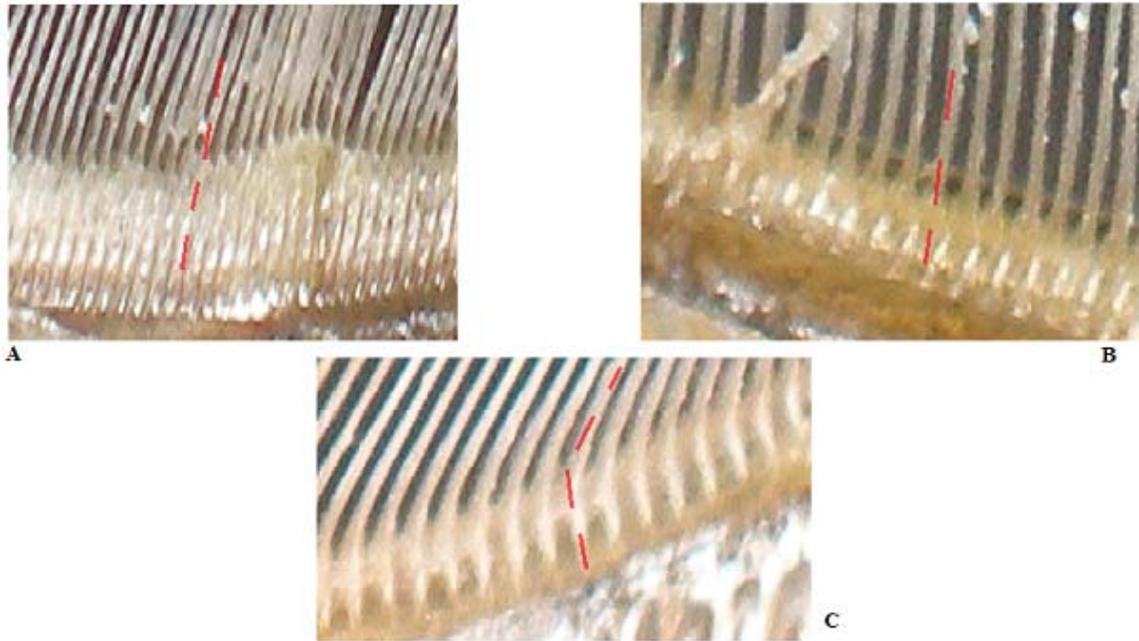


Figura 10. Base recta de las branquiespinas ceratobranquiales del primer arco branquial de *O. libertate* y *O. medirastre* (a) y (b), base oblicua del primer arco branquial de *O. bulleri* (c).

Las branquiespinas del primer arco branquial de los ejemplares de *O. libertate* no mostraron espículas (Fig. 11a). En *O. medirastre* la presencia de espículas se presentó con una frecuencia mayor pero abundancia moderada, aunque en algunos casos no presentaron ninguna espícula (Fig. 11b). En *O. bulleri* las branquiespinas frecuentemente presentaron espículas y en una proporción mayor en comparación con *O. medirastre*, pero de igual manera también hubo casos en que no hubo presencia de espículas (Fig. 11c).

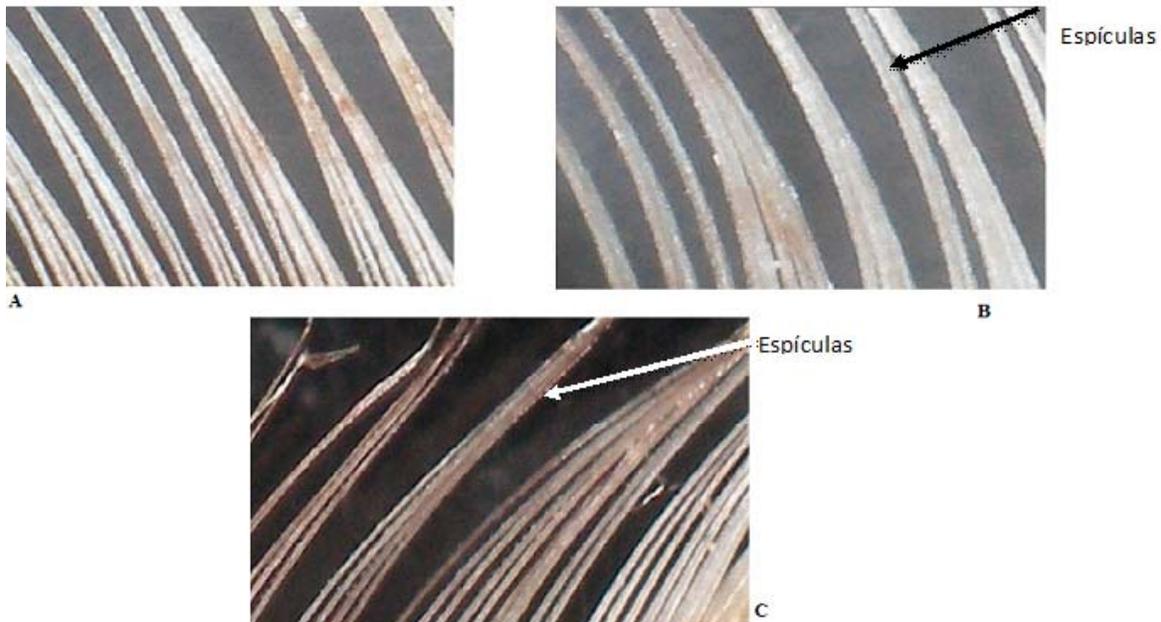


Figura 11. Branquiespinas ceratobranquiales de un ejemplar *O. libertate* no presentaron espículas **(a)**. Branquiespinas ceratobranquiales de un ejemplar de *O. medirastre* presentaron desde abundantes hasta pocas espículas **(b)**. Branquiespinas ceratobranquiales de un ejemplar de *O. bulleri* **(c)**.

Diferencias morfométricas

Para los análisis de la forma del cuerpo se seleccionaron 228 especímenes del género *Opisthonema* (76 por especie). El tamaño de muestra por especie lo definio el número de ejemplares de *O. bulleri* disponibles, la especie menor representada en el muestreo. Cabe aclarar que al evaluar las imágenes digitales del total de especímenes identificados como *O. bulleri* ($n=166$), solamente 76 reunieron la calidad (resolución) necesaria para los análisis de la forma del cuerpo de la sardina crinuda.

Los resultados obtenidos del AVC indicaron diferencias estadísticamente significativas entre las especies (Tabla 3) lo que soportan la existencia de morfotipos diferentes (Lambda de Wilks (Λ)= 0.26, $P < 0.001$, VC1; Lambda de Wilks (Λ) = 0.75, $P < 0.001$; VC2).

Tabla 3. Parámetros de las dos variables canónicas generadas

Variable	Lambda	Ji-cuadrada	g.l.	Probabilidad
VC1	0.2676	282.74	44	p<0.0
VC2	0.7588	59.19	21	p<0.001

La tendencia del diagrama de dispersión de los valores respecto de las dos variables canónicas no representan el poder discriminante de cada una (Fig. 12), Es pertinente aclarar que la VC1 (eigenvalue=85.2%) posee 3 veces más poder discriminante que el VC2 (eigenvalue=14.7%). La disposición espacial de los valores sugiere que las formas de *O. medirastre* y *O. libertate* presentan una apariencia corporal más similar entre ellas. La forma de *O. bulleri* se encuentra principalmente separada de las otras dos especies por la primera variable canónica. La segunda variable canónica separa a *O. medirastre* de *O. libertate*. Considerando las distancias cuadráticas de Mahalanobis, se obtuvo una matriz de asignación, obteniéndose un 79% de asignación correcta de los ejemplares (Tabla 4).

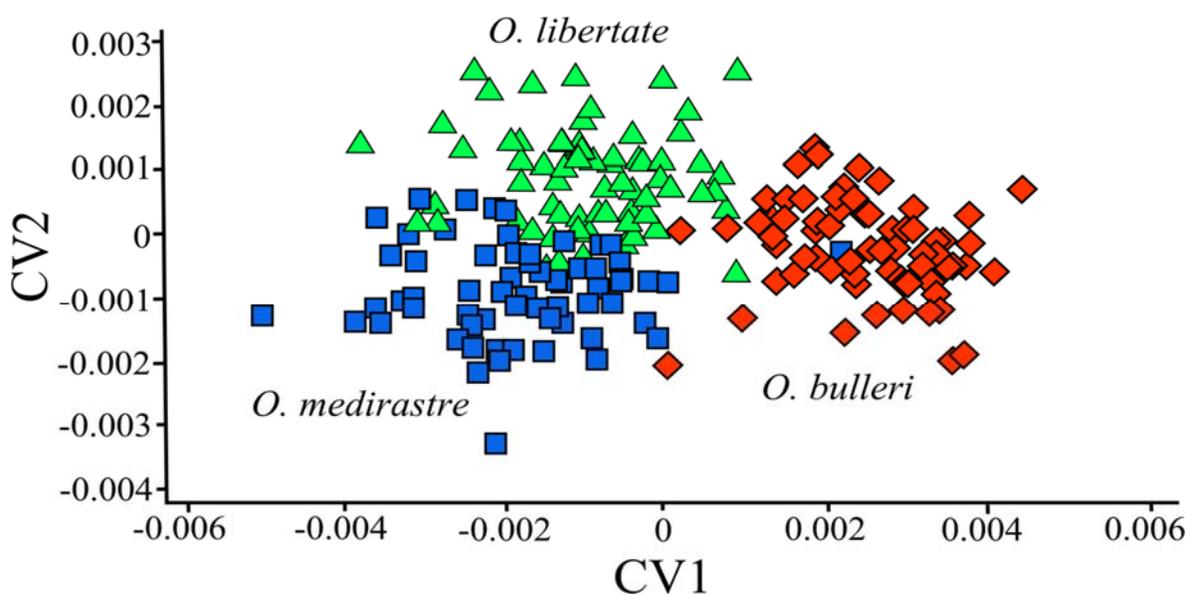


Figura 12. Scores de las variables canónicas. Dispersión de los especímenes por especie de *Opisthonema* spp.

Tabla 4. Matriz de clasificación correcta generada a partir de las distancias de Mahalanobis.

Especies	<i>O. bulleri</i>	<i>O. medirastre</i>	<i>O. libertate</i>	Total	(%) asignación correcta
<i>O. bulleri</i>	64	7	5	76	84.2%
<i>O. medirastre</i>	9	57	10	76	75%
<i>O. libertate</i>	1	16	59	76	77.6%
Total/Promedio	74	80	74	228	79%

La representación gráfica de la relación entre la forma de las especies se representa a través de un dendograma (Fig. 13), construido usando las distancias cuadráticas de Mahalanobis. La ubicación de los valores por especie sugiere una mayor similitud entre las formas de *O. medirastre* y *O. libertate*, la especie que presenta una forma menos similar dentro de estas tres especies es *O. bulleri*.

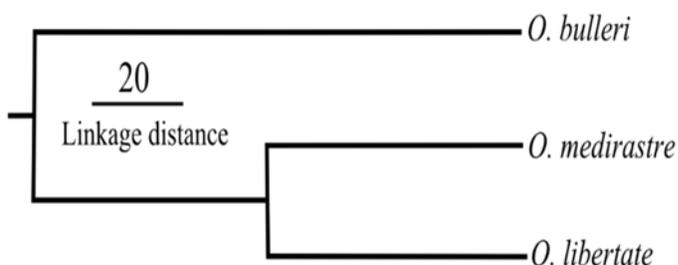


Figura 13. Dendograma generado con el algoritmo del método de grupos de pares por medio del método Neighbor Joining, utilizando las distancias cuadráticas de Mahalanobis por especie.

El coeficiente kappa de Cohen indica que el porcentaje de asignación correcta obtenido, no es producto del azar ($k=0.68$, error estándar=0.041, intervalo de confianza del 95%=0.605 a 0.764, $Z=16.6$, $P < 0.001$).

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en todas las comparaciones pareadas. Entre *O. bulleri* y *O. libertate*, $F= 20.46$, $p < 0.01$; entre *O. bulleri* y *O. medirastre* $F= 14.04$, $p < 0.01$; y entre *O. libertate* y *O. medirastre*, $F= 13.03$, $p < 0.05$). La tendencia en la variación de la forma entre grupos fue

visualizada graficando los vectores producidos del análisis de las deformaciones parciales e interpolando la variación ocurrida entre las marcas homólogas (Thin Plate Spline) (Fig. 14). Se observa que *O. bulleri* presentó los cambios morfológicos más importantes de este complejo de especies (Fig. 14a, b); una menor elevación dorsal del cuerpo, donde todas las marcas tienden a desplazarse hacia la zona dorsal, dando como resultado un individuo que se puede describir como de menor altura. Mientras que en las otras especies, la orientación de las flechas de la parte dorsal es diagonal hacia la parte posterior y ventral (Fig. 14c), que va del inicio de la aleta anal al inicio inferior de la aleta caudal, presentando una mayor depresión entre estos puntos la especie *O. libertate* con respecto a *O. mediraastre*.

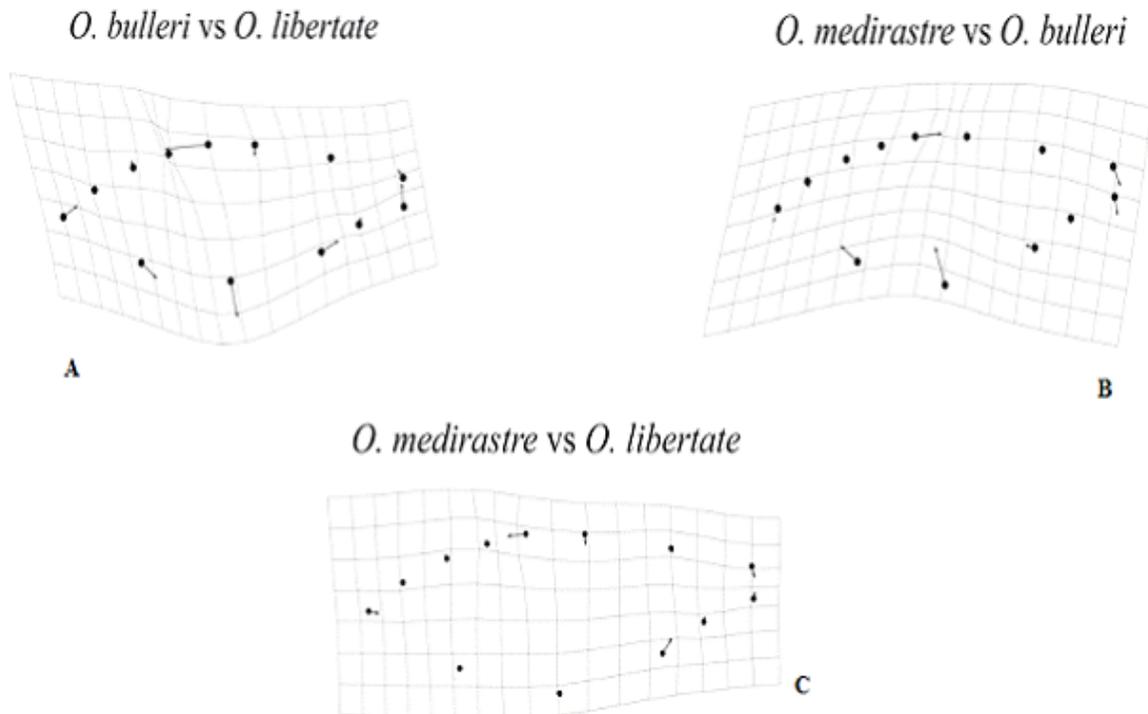


Figura 14. Gradillas de deformación creadas a partir de la comparación de la forma promedio de cada especie con respecto al promedio general, donde el tamaño y dirección de las flechas indican la magnitud de variación entre las especies. Las gradillas se presentan aumentadas a 2X. **(a)** y **(b)**, *O. bulleri* presenta una forma corporal diferente (menor altura del cuerpo) con respecto de *O. mediraastre* y *O. libertate*. **(c)** mientras que *O. mediraastre* y *O. libertate* diferenciándose por cambios en la región del pedúnculo caudal a la aleta anal, y del pedúnculo caudal a la aleta dorsal.

Análisis genético

Las muestras de tejido para este análisis provienen de los organismos que se distribuyeron en los límites del intervalo del número de branquiespinas que separan una especie de otra (ver Fig. 8). Estas sardininas presentan mayor interés, ya que para su identificación taxonómica fue necesario la combinación de criterios de Berry & Barret (1963) y Torres-Ramírez (2004). Se revisó un total de 25 secuencias correspondientes a las tres especies: *O. bulleri* ($n= 8$); *O. medirastre* ($n= 10$); *O. libertate* ($n= 7$). El tamaño del fragmento analizado fue de 583 pb del ADNmt

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 (Fig. 15). Dentro de cada clado las distancias genéticas (0.000, 0.005, 0.004), fueron considerablemente más bajas que las distancias existentes entre los clados (Tabla 5 y 6). El porcentaje de divergencia intra-específico, fue en promedio de 0.3%; mientras que la divergencia más baja encontrada entre cualquier par de especies fue 2.9% (*O. libertate* vs *O. medirastre*) (Tabla 5 y 6).

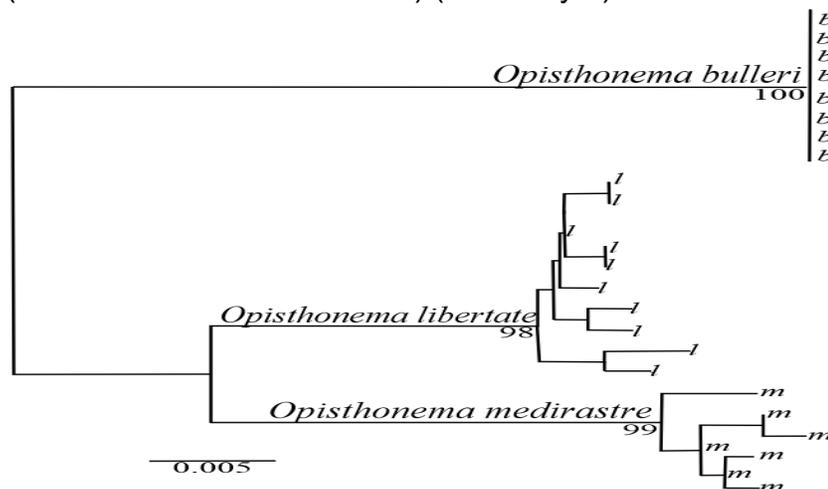


Figura 15. Árbol de agrupación construido por medio del método Neighbor Joining, (Bootstrap 1000) y utilizando distancias genéticas basadas en el modelo de Kimura 2-parámetros. La anchura de los barras terminales refleja la variabilidad de todas las secuencias de cada clado y la altura el tamaño de muestra. Se pueden observar tres grupos genéticamente diferentes y una variabilidad muy baja dentro de cada clado.

Tabla 5. Porcentaje de divergencia intra-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).

Especie	(%) divergencia intra-especifica
<i>O. bulleri</i>	0.0
<i>O. libertate</i>	0.5
<i>O. medirastre</i>	0.4
Promedio	0.3

Tabla 6. Valores de divergencia genética dados en porcentajes encontrados en este estudio para cada una de las tres especies de *Opisthonema* spp. con base en el modelo de Kimura-2 parámetros (modelo de sustitución nucleotídica que asigna distinto peso a una transversión de una transición).

	1	2	3
<i>O. bulleri</i>			
<i>O. libertate</i>	4.6		
<i>O. medirastre</i>	5.1	2.9	

DISCUSIÓN

La importancia comercial que ha adquirido la sardina crinuda ha captado el interés científico para llevar a cabo estudios relativos a su biología y su pesquería (Jacob-Cervantes, 2010), Sin embargo, aún no se ha considerado esta información para el manejo de estas especies. Por ejemplo, uno de los aspectos que no se han tomado en cuenta en la pesquería de este recurso, es el registro de datos distinguiendo las especies por lo que a la fecha la información pesquera se obtiene de manera global para el género *Opisthonema*. Aunque este inconveniente práctico ha sido reconocido, aun son necesarios estudios que aborden, por una parte, la validación del número de especies existentes en la región y por otra que identifiquen rasgos biológicos que permitan el reconocimiento de cada una de las entidades taxonómicas a nivel específico. En el presente estudio se aporta información sobre la congruencia de los datos genéticos, merísticos y morfológicos, para la validación taxonómica de las especies de *Opisthonema*, distribuidas en la región del Golfo de California. En consecuencia, con ello se soporta el reconocimiento de características fenotípicas y moleculares que permiten la correcta identificación de individuos.

Los porcentajes de divergencia del COI encontrados en el presente estudio validan la existencia de tres especies. La longitud de las ramas del árbol de *Neighbor-Joining* (Fig. 15), indica una elevada divergencia entre los clados, respecto a los bajos niveles de diferenciación genética al interior de cada clado, y soportan fuertemente existencia de tres grupos naturales. Lo anterior confirma la propuesta de diversos autores (Berry & Barret, 1963; Rodríguez-Domínguez, 1987; Hedgecock *et al.*, 1988; Torres-Ramírez, 2004) quienes sugieren la existencia de tres entidades taxonómicas a nivel de especie.

Los clados reconocidos mediante datos moleculares fueron compatibles con la clasificación actual basada en caracteres merísticos y morfológicos. Esto es lo esperado considerando la hipótesis de la “no especificidad de los caracteres” propuesta por Sokal & Sneath (1963). Esta hipótesis hace referencia de manera general a que a partir de un buen muestreo de caracteres fenotípicos es posible

tener una muestra representativa del genotipo, ya que el fenotipo esta codificado en varios genes.

Aun cuando el número de organismos analizados en el presente estudio fue menor al analizado por Berry & Barret (1963), fue posible observar que el problema para la identificación de las especies de *Opisthonema*, considerando los criterios propuestos por estos autores, es la amplia variabilidad en el número de branquiespinas que se observa a cualquier longitud. A pesar de que es posible distinguir tres grupos, el principal inconveniente se presenta en organismos con conteos que caen fuera de los intervalos designados para cada especie, ya que de acuerdo a los autores *O. bulleri* presenta un intervalo de 28 a 35, *O. medirastre* de 50 a 68 y *O. libertate* de 71 a 107. Lo anterior indica que los ejemplares cuyo número de branquiespinas se encuentre entre estos rangos, puede ser cualquiera de las tres.

Rodríguez-Domínguez (1987) revisó este problema separando los grupos por muestra pero admite que al graficar datos de ejemplares recolectados en diferentes lugares y tiempos el traslape también es evidente. Rodríguez Sánchez (1985) propuso el método de densidad de branquiespinas con el cual separa a las tres especies adecuadamente, pero consume aún más tiempo que el método de Berry & Barret (1963). Por su parte Torres-Ramírez (2004), propuso una nueva clave basada en las características de la branquiespinas y la presencia o ausencia de espículas. Estos son caracteres mucho más fáciles de observar, lo que ayuda a una identificación más rápida y da un mayor soporte a los criterios propuestos por Berry & Barret (1963). En el presente estudio los organismos que se traslaparon en el número de branquiespinas ceratobranquiales considerando la longitud estándar (Fig. 8) fueron identificados empleando la clave de Torres-Ramírez (2004).

La composición por especie obtenida en este trabajo es congruente ya que *Opisthonema libertate* es la especie del complejo *Opisthonema* que presenta el mayor aporte en las capturas (Ruiz & Lyle, 1992) y *Opisthonema bulleri*, en las costas de Sinaloa y Nayarit, México, es la especie que ocupa el tercer lugar en las

capturas de este género (Castro-González *et al.*, 1997). Esto sugiere que la composición por especie en las capturas del complejo *Opisthonema*, en el área de estudio, refleja la abundancia específica en el medio ambiente (Vega-Corrales, 2010). Además, indica, como mencionan Stevenson y Carranza (1981), que esta pesquería está destinada a la captura simultánea de las tres especies de este género y no existe evidencia para determinar que sea selectiva.

La abundancia de estas especies está determinada por condición ecológica, posiblemente con una mayor influencia de la temperatura (Rodríguez-Domínguez, 1987; López-Lemus, 1993; Soto, 1999; Castro-González *et al.*, 1997). Estos autores atribuyen la variabilidad temporal y la poca abundancia de *O. bulleri* en aguas someras, a que su hábitat es más oceánico. Además de esta información, el conocimiento empírico de los pescadores, como lo señala Rodríguez-Domínguez (1987), les permite adoptar una clasificación con base a las tonalidades de los peces al momento de la captura: *O. libertate* es reconocida como sardina café, posiblemente porque se les introduce agua con sangre entre las escamas durante la maniobra de pesca y al secarse les confiere esta tonalidad; y *O. bulleri* es reconocida como sardina azul, lo cual se debe a que durante la maniobra de pesca las escamas se desprende y la piel desnuda presenta una tonalidad azulosa. Para *O. medirastre* no se tiene información si es reconocida por algún color particular.

El porcentaje de asignación correcta observado en el presente estudio, utilizando la forma del cuerpo del pez, fue en promedio adecuado (79%), comparados con otros trabajos de otras especies basados en la forma del otolito (70%-95% Tuset *et al.*, 2006, 89.3%; Ramírez-Pérez, 2010) y la forma del cuerpo (98.0%, Yakubu & Okunsebor, 2011; 85.1%; Vergara-Solana *et al.*, 2013). Esta información indica que la forma del cuerpo de la sardina crinuda en el sureste del Golfo de California es robusta para discriminar individuos.

Las diferencias en la forma corporal de las especies puede ser observada mediante las gradillas de deformación, las cuales indican que la región anterior, entre la aleta dorsal-ventral, y la región posterior inferior, entre la aleta anal-inicio

caudal inferior, fueron las más importantes para distinguir las variaciones de la forma del cuerpo de las tres especies (*O. bulleri*, *O. medirastre* y *O. libertate*). Así, estos resultados permitieron reconocer la ubicación y la dirección de los cambios morfológicos.

La variación fenotípica puede ser resultado de una variedad de factores ambientales como la temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y profundidad (Winberger, 1992; López-Lemus, 1993). Esta respuesta incluye también cambios en: comportamiento, fisiología, mortalidad, crecimiento, ciclo de vida y demografía; de los cuales algunos pueden ser expresados a nivel individuo y otros a nivel generacional (Rodríguez-Domínguez, 1987; Soto, 1999; Castro-González *et al.*, 1997; Miner *et al.*, 2005). Una explicación más profunda de las causas y de las posibles implicaciones de estas diferencias requiere de estudios más específicos. Con base en lo anterior, los resultados muestran que el empleo de la morfometría geométrica en la forma del cuerpo permite detectar diferencias fenotípicas relevantes entre entidades taxonómicas.

Otros autores, han sustentado la diferenciación de estas especies a partir de descripciones merísticas; sin embargo, la falta de consistencia y acuerdos sobre el empleo de estas descripciones han dado lugar a interpretaciones erróneas para el reconocimiento de las especies. La plasticidad morfológica observada es resultado de la capacidad del genotipo de producir variantes (expresadas en distintas características: coloración, forma del cuerpo, número de branquiespinas, características de esas branquiespinas, entre otros) y del efecto de las presiones ambientales que éstas experimentan. Tomando en consideración el traslape en el número de branquiespinas en el segmento ceratobranquial del primer arco branquial en relación a la longitud estándar, así como la presencia de características de las branquiespinas, Rodríguez-Sánchez (1985) cuestiona la validez taxonómica de *O. medirastre* ya que señala que los caracteres merísticos reconocibles para esta especie son solo un traslape en número de *O. libertate*. Los resultados morfométricos encontrados en el presente estudio muestran efectivamente una mayor similitud entre estas entidades; sin embargo, los análisis

moleculares indican que se trata de dos entidades distintas. La mayor similitud fenotípica entre estas dos especies puede ser el resultado de una mayor relación filogenética (como puede ser sugerido de los datos moleculares), de presiones ambientales similares o de ambas situaciones.

Debido a que los organismos de una misma especie tienden en general a ser muy parecidos entre sí, una estrategia metodológica para su reconocimiento es emplear las expresiones 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 (Medina-Espinoza, 2013), 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). Considerando lo anterior, la resolución de conflictos taxonómicos es conveniente abordarlo con diferentes estrategias que permitan complementar una idea robusta que soporte el reconocimiento de entidades taxonómicas naturales.

El análisis de la estructura poblacional de una especie, es de gran importancia en el desarrollo de una estrategia óptima para su eficiente explotación (Ramírez-Pérez, 2010). Sí los administradores pesqueros incluyeran variaciones intra-específicas en sus consideraciones, podrían necesitar información sobre las diferencias biológicas entre los grupos de especies locales y comprender los procesos tanto genéticos como ecológicos que estén influenciando en la separación (MacLean & Evans, 1981). Por lo tanto, la identificación por especie es un requisito indispensable para la evaluación, debido a que con esto se podría evitar errores en las estimaciones de la biomasa de las especies.

Es importante resaltar, que con el presente trabajo se aborda por primera vez el uso de la morfometría geométrica para reconocer las diferencias de la sardina crinuda. Hedgecock *et al.*, (1988) demostraron la utilidad de la forma del cuerpo para distinguir la variación entre estas especies mediante morfometría tradicional,

pero con base en ésta solo resaltó la altura como característica distintiva para las tres especies.

Los esfuerzos futuros en el estudio de las especies de *Opisthonema* es conveniente que giren en torno a explorar la existencia de posibles barreras genéticas al interior de cada especie a partir del hallazgos de una estructura poblacional evidente; estudiar las condiciones ambientales a lo largo del rango de distribución de las especie que influyen en la formación de los grupos poblacionales, y en consecuencia revisar si estos grupos potenciales mantienen parámetros de vida distintos o similares (Ramírez-Pérez, 2010). La respuesta permitiría aportar recomendaciones necesarias para el manejo de la pesquería de sardina crinuda en el Pacífico mexicano. La disminución de las pesquerías alrededor del mundo ha permitido despertar un gran interés en conocer la estructura genética de peces comercialmente importantes con respecto a la identificación por especie o stocks y al manejo de pesquerías (Gauldie, 1991 & Sotelo *et al.*, 1993).

En muchos casos, los caracteres morfológicos (tamaño, forma y apariencia) de las especies de peces son suficientes para identificarlas adecuadamente. Sin embargo, cuando estos caracteres diagnósticos son removidos por diferentes factores, resulta de gran importancia disponer con métodos eficientes para la identificación de especies (Hastein *et al.*, 2001). Distintas aproximaciones han sido aplicadas para discriminar entre especies de peces, incluyendo análisis de variación geográfica en caracteres merísticos y morfométricos, electroforesis y diversos métodos que se basan en la detección de proteínas específicas de peces (Berry & Barret, 1963; Hedgecock *et al.*, 1988). Sin embargo, la aplicación del ADN para la identificación y autenticación de especies ha crecido notoriamente durante la última década (Mackie *et al.*, 1999). Entre las ventajas prácticas se encuentra el hecho de que el ADN es más termoestable que muchas proteínas y la misma información está presente en todas las células de los organismos haciendo por consiguiente a todos los tejidos adecuados para los análisis (Mackie *et al.*, 1999).

La comparación del COI de secuencias de las tres especies, con ejemplares identificados morfológicamente como *O. bulleri*, *O. medirastre* y *O. libertate* respectivamente cada una, detectó en principio que dos ejemplares de las especies *O. bulleri*, y *O. medirastre* estaban incorrectamente identificados, ya que se asociaron a clados diferentes, lo cual era más probable una mala identificación que errores en la manipulación de las secuencias. Con base en lo anterior y teniendo la certeza de que dichos ejemplares pertenecían al clado que se les había asociado mediante el árbol de agrupación con el método *Neighbor Joining*, se verificó la identificación merística para detectar este error. Y así se detectó que las dos secuencias pertenecían a su correspondiente asignación molecular.

Los resultados encontrados a partir del análisis genético indican que hay evidencia del establecimiento de tres diferentes especies de sardina crinuda a lo largo del sureste del Golfo de California. Respuestas adicionales en torno a existencia de poblaciones genéticamente distintas en cada especie deberán ser detectadas en análisis posteriores. Existen limitaciones inherentes a los tipos de marcadores moleculares utilizados, y es importante considerar su alta sensibilidad a bajos niveles de flujo genético (Carvalho & Hauser, 1994). Así, información procedente de marcadores polimórficos deberían de ser considerada en futuros estudios enfocados a estudios poblacionales de cada una de estas especies.

CONCLUSIONES

1. Los datos moleculares validan la existencia de tres entidades taxonómicas asociadas a las tres especies reconocidas del género *Opisthonema* mediante caracteres merísticos presentes en el Pacífico mexicano.
2. Las tres especies de sardina crinuda reportadas para el Pacífico mexicano (Berry & Barret, 1963) pueden ser diferenciadas por el número de branquiespinas ceratobranquiales en relación con la longitud estándar, pero además se deben de considerar los criterios diagnósticos propuestos por Torres Ramírez (2004), como lo es el tomar en cuenta la base de la branquiespina y la presencia y ausencia de espículas en las branquiespinas. Ya que cuando existe el traslape en la cantidad de branquiespinas presentes en el hueso ceratobranquial sirve de apoyo el observar estas estructuras para una mejor discriminación de especies en este complejo.
3. Las tres especies presentan diferencias en la forma del cuerpo. *Opisthonema bulleri* se distingue de las otras dos especies por la altura del cuerpo. La mayor diferencia entre *O. medirastre* y *O. libertate* radica en la forma entre la aleta anal y la base del pedúnculo caudal, donde *O. libertate* presenta una mayor depresión después de la aleta anal.
4. *Opisthonema medirastre* y *O. libertate* fueron las especies genéticamente más similares, lo cual sugiere que pueden ser las especies filogenéticamente más cercanas. Estas dos especies, también fueron las que presentaron la mayor similitud morfológica de las tres entidades.

BIBLIOGRAFIA

- Adams, D., F. Rohlf & D. Slice. 2004. Geometric morphometrics: Ten years of progress following the revolution. *Italian Journal of Zoology*, 71(1):5-16.
- Alberch, P., S.J. Gould, G. F. Oster & D. B. Wake. 1979. Size and shape in ontogeny and phylogeny. *Paleobiology*, 5(3): 296-317.
- Bakeman, R. & Gottman, J.M. (1986) *Observación de la interacción: Introducción al análisis secuencial*. Madrid: Morata
- Berdegue A., J. 1956. Peces de importancia comercial en la costa noroccidental de México. Dir. Gral. Pesca e Ind. Con., Sria. Marina, México, 345 p.
- Berry, D.H. & I. Barrett. 1963. Análisis de las branquiespinas y denominación del arenque de hebra *Opisthonema*. *Inter-Amer.Atun Trop. Bol.* 7(2): pp 137-190.
- 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.
- Cadrin, S.X. & K.D. Friedland. 1999. The utility of image processing techniques for morphometric analysis and stock identification. *Fisheries Research* 43: 129 - 139.
- Cadrin, S.X., 2000. Advances in morphometric identification of fishery stock. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 10: 91- 112.
- Cadrin, S.X. 2005. Morfometric Lanmarks. En: S.X. Cadrin, K.D. Friendland and J.R. Waldman (Eds.). *Stock Methods identifications: Aplicacion in Fisheries Science*. 153-172 p.
- Campbell, D. C., J. M. Serb, J. E. Buhay, K. J. Roe, R. L. Minton & C. Lydeard, 2005. Phylogeny of North American amblesmines (Bivalvia, Unionoida): prodigious polyphyly proves persasive across genera. *Invertebrate Biology*. 124 (2): 131-164.

- Cardinale, M., P. Doering-Arjes, M. Kastowsky & H. Mosegaard. – 2004. Effects of sex, stock, and environment on the shape of known-age Atlantic cod (*Gadus morhua*) otoliths. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 61: 158-167.
- Carvalho, G. R. & L. Hauser. 1994. Molecular genetics and the stock concept in fisheries: *Rev. Fish Biol. Fisher.*, 4: 326-350.
- Castro-Gonzalez, J. J., Lizarraga-Rodriguez, H. M. & Chapa-Morales, O. (1997). Fecundidad de la sardina crinuda *Opisthonema bulleri* (Pisces: Clupeidae) entre las costas de Sinaloa y Nayarit, Mexico. *Rev. Biol. Trop.*, 44/45, 659-661.
- 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.
- Chollet Villalpando, J.G. 2012. El hueso urohial en la familia Gerreidae (Teleostei: perciformes): análisis taxonómico y filogenético. (Tesis Maestría en Ciencias). La Paz: Centro de Ciencias Interdisciplinario de Ciencias Marinas.
- 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.
- DeVries, D.A., C.B. Grimes & M.H. Prager, 2002. Using Otolith shape analysis to distinguish Eastern Gulf of Mexico and Atlantic Ocean stocks of king mackerel. *Fish. Res.*, 57: 51-62.
- Di Finizzio, A., Guerriero, G., Russo, G. L. & Ciarcia, G. (2007). Identification of gadoid species (Pisces: Gadidae) by sequencing and PCR-RFLP analysis mitochondrial 12S and 16S rRNA gene fragments. *European Food Research and Technology* 225, 337-383 344.
- DOF. 2010. Diario Oficial de la Federación. Acuerdo mediante el cual se da a conocer la actualización de la Carta Nacional Pesquera. México:

FAO. 2011. Fisheries Topics: Statistics. *En: FAO Fisheries and Aquaculture Department* (en línea). Roma. (23/oct/2011). <http://www.fao.org/fishery/topic/2017/es>

Félix-Uraga, R., V.M. Gomez-Muñoz, C. Quiñonez-Velazquez., F.N Melo-Barerra, K.T. Hill & W. García-Franco, 2005. Pacific sardine (*Sardinops sagax*) stock discrimination off the West coast of Baja California and Southern California using otolith morphometry. *CalCOFI Rep.*, 46:113-121.

Félix Uraga, R. 1986. Edad, crecimiento y estructura poblacional de *Sardonops sagax caerulea* en Bahía Magdalena, B.C.S., durante 1981 a 1984. Tesis de maestría, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR), I.P.N., La Paz, B.C.S., México, 103 p.

Félix-Uraga, R., C. Quiñonez-Velázquez, K. T. Hill, V. M. Gómez-Muñoz, F. N. Melo-Barrera, & W. García-Franco. 2005. Pacific sardine (*Sardinops sagax*) stock discrimination off the west coast of Baja California and southern California using otolith morphometry. *Calif. Coop. Oceanic Fish. Invest. Rep.* 46:113–121.

Felsenstein, J. 1989. PHYLIP – Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics*.5:164

Fisher W, Krup F, Schneider W, Sommer C, Carpenter KE & Niem VH. 1995. Guía FAO para la identificación de las especies para los fines de la pesca. Pacífico centro Oriental. Roma.

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vriejenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3(5):294–299.

Fox, G.E., E. Stackebrandt, R. b. Hespell, J. Gibson. J. Maniloff, T. A. Dyer, R. S. Wolfe, W. E. Balch, R. S. Tanner, L. J. Magrum, L. B. Zablen, R. Blakemore,

- R. Gupta, L. Bonen, B. j. Lewis, D. A. Stahl, K. R. Luehrsen, K. N. Chen & C. R. Woese. 1980. The phylogeny of prokaryotes. *Science*. 209: 457-463.
- Gagliano, M. & McCormick MI (2004) Feeding history influences otolith shape in tropical fish. *Marine Ecology Progress Series* 278:291-296.
- García-Rodríguez, F.J., S.A. García-Gasca, J.C. Cruz-Agüero & V.M. Cota-Gómez. 2011. A study of the population structure of the Pacific sardine *Sardinops sagax* (Jenyns, 1842) in Mexico based on morphometric and genetic analyses. *Fish. Res.*107: 169-176.
- Gauldie, R. W. 1999. Taking stock of genetics concepts in fisheries management. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48: 722-731.
- 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.
- Gould, S. J. 1966. Allometry and size in ontogeny and phyogeny. *Biol. Rev.* 41: 587-640.
- Grant, W. & Utter, F. M. (1984). Biochemical population genetics of Pacific Herring 393 (*Clupea pallasii*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 41, 851-864.
- Hastein, T., B. J. Hill, F. Berthe & D. V. Lighter. 2001. Traceability of aquatic animals. *Rev. Sci. Tech.*, 20 (2): 564-583.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S.L. & de Waard, J.R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B* 270, 313- 401 321.
- Hedgecock D. K., Nelson & L. G. López-Lemus. 1988, Biochemical genetic and morphological divergence among three species of thread. *CalCOFI Rep.*, Vol. XXIX pp 110-128.

- Hills, D. m. & j. Weins. 2000. Molecules versus morphology in systematics: conflicts, artifacts and misconceptions. En Wiens, J. Phylogenetic analysis of morphological data. Smithsonian institution press. Washington y Londres. 1-19 p.
- Holt SJ. 1975. Los recursos alimenticios del océano. *En: Oceanografía*. Madrid: Selecciones del *Scientific American*; 400-414.
- Ibañez-Aguirre, A.L., E. Cabral-Solis, M. Gallardo-Cabello & M.E. Espino-Barr, 2006. Comparative morphometrics of two populations of *Mugil curema* (Pisces: Mugilidae) of the Atlantic and Mexican Pacific coasts. *Sci.Mar.*, 70: 139-145.
- Ibañez, A.L., Cowx, I.G. & O'higgins, P. 2007. Geometric morphometric analysis of fish scales for identifying genera, species, and local populations within the Mugilidae. *Canadian. Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 64:1091-110
- Imaizumi, K., Akutsu, T., Miyasaka, S. & Yoshino, M. (2007). Development of species identification tests targeting the 16S ribosomal RNA coding region in mitochondrial DNA. *International Journal of Legal Medicine* 121, 184-191.
- Jacob-Cervantes M. 2010. La pesquería de peces pelágicos menores en el sur del golfo de California. Análisis de la temporada de pesca 2008. *Ciencia Pesquera*. 18(2):47-58.
- Jacob-Cervantes, M. L., R. Vallarta-Zárate, J. Payán-Alejo, D. Becerra-Arroyo, R. de León-Herrera & A. Verde-Hernández. 2014. Análisis integral de la pesquería de pelágicos menores en el sur del golfo de california, durante 2013. *Resúmenes del XXI Taller de Pelágicos Menores*. Ensenada, Baja California. Centro Regional de Investigaciones Pesqueras Ensenada. 11 al 13 de junio de 2014.
- 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.

- King, D.P.F. 1985. Morphological and meristic differences between spawning aggregations of northeast Atlantic herring, *Cuplea harengus*. *L. J. Fish Biol.* 26:591-607.
- Kocher, T. D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Paboo, S., Villablanca, F. & Wilson, A.C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 6196-6200.
- Lagunez-Moreno LM. 1989. Identificación de razas geográficas de *Opisthonema* sp en las costas de Baja California Sur. (Tesis Maestría en Ciencias). La Paz: Centro de Ciencias Interdisciplinario de Ciencias Marinas.
- Lakra, W. S., Goswami, M. & Gopalakrishnan, A. (2009). Molecular 421 identification and phylogenetic relationships of seven Indian Sciaenids (Pisces: Perciformes, Scianidae) based on 16S rRNA and cytochrome c oxidase subunit I mitochondrial genes. *Molecular Biology Reports* 36, 831-839.
- 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.
- 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.
- 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.
- Librado P. & J. Rosas. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis od DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 25: 1451-1452.

- Lluch-Belda, D., J. Arvizu, S. Hernández Vázquez, D.B. Lluch-Cota, C.A. Salinas-Zavala, T. Baumgartner, G. Hammann, A. Cota-Villavicencio, C.E. Cotero-Altamirano, W. García-Franco, O. Pedrín-Osuna, Y. Green-Ruiz, S. Lizárraga-Saucedo, M.A. Martínez-Zavala, R. Rodríguez-Sánchez, J.R. Torres-Villegas & F. Páez-Barrera. 1989. En: pesquerías relevantes en México. Tomo I. SEPESCA, Instituto Nacional de la Pesca. México, pp: 419-535.
- Lombarte, A. & Lleonart, J. (1993). Otolith size changes related with body growth, habitat depth and temperature. *Environ. Biol. Fishes* 37, 297-306.}
- López Lemus, L. G. 1986. Genetic relationships of the different morphotypes of the clupeid *Opisthonema* spp. In the west coast of California and Gulf of California. Annual Conference *CalCOFI*, program y Abstracts.
- López-Lemus, L. G. (1993). Diferencias termo-adaptativas de enzimas deshidrogenasas NAD-dependientes de peces marinos pelágicos templados y tropicales. *Ciencia Pesquera*, 10, 89-95.
- Loy, A., L. Mariani, M. Berttellety & L. Tunesi. 1998. Visualizing Allometry: Geometric Morphometrics in the Study of Shape Changes in the Early Stages of Two-Banded Sea Bream, *Diplodus Vulgaris* (Perciformes, Sparidae). *Journal of Morphology*. 233: 137 – 146 pp.
- Mackie, I. M., S. E. Pryde, C. Gonzales-Sotelo, I. Medina, R. Pérez-Martin, J. Quintero, M. Rey-Mendez & H. Rehbein. 1999. Challenges in the identification of species of canned fish. *Trends. Food Sci. Technol.*, 10: 9-14.
- Maclean, J. A. & D. O. Evans. 1981. The stock concept, discreteness of fish stocks, and fisheries management. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 38: 1889-1897.
- 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.

- Matsumoto M. 2003. Phylogenetic analysis of the subclass Pteriomorphia (Bivalvia) from mtDNA COI sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 27: 429–440.
- Medina-Espinoza J. A. 2013. Divergencia morfométrica y genética del género *spondylus* l. (bivalvia: spondylidae) en el Pacífico mexicano y golfo de California. (Tesis Maestría en Ciencias). La Paz: Centro de Ciencias Interdisciplinario de Ciencias Marinas.
- Mérigot B., Letourneur & Lecomte-Finiger R. 2007. Characterization of local populations of the common sole *Solea solea* (Pisces, Soleidae) in the NW Mediterranean through otolith morphometrics and shape analysis. *Mar. Biol.* 151: 997-1008.
- Miner, B. J., S. E. Sultan, S. G. Morgan, D. K. Padilla & R. A. Relyea. 2005. Ecological consequences of phenotypic plasticity. *Trends Ecol. Evol.* Vol., 20 (12): 685-692.
- Morales-Bojórquez E, Gómez-Muñoz V. M, Félix Uraga R & Alvarado-Castillo R. M. 2003. Relation between recruitment, sea surface temperature, and density independent mortality of the Pacific sardine (*Sardinops caeruleus*) off the southwest coast of the Baja California Peninsula, México. *Scientia Marina*. 67(1):25-32.
- Moris, C. & C. Cicero. 2004. AND Barcoding: Promise and Pitfalls. *Plos biology*. 2 (10): 1529-1531.
- Nei, M. & S. Kumar. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press. E. U. A. 339 p.
- Nevárez-Martínez, M.O., M.A. Martínez-Zavala, C.E. Coteró-Altamirano, M.L. Jacob-Cervantes, Y.Green-Ruiz, G. Gluyas-Millán, A. Cota-Villavicencio & J.P. Santos Molina. 2006. La pesquería de pelágicos menores. En: F. Arreguín-Sánchez, L. Beléndez-Moreno, I. Méndez Gómez-Humaran, R. Solana-

- Sansores y C. Rangel-Dávalos (eds.). Sustentabilidad y pesca responsable en México: evaluación y manejo. Instituto Nacional de la Pesca, SAGARPA. México, pp: 263-295.
- Páez-Barrera F. 1976. Desarrollo gonadal, desove y fecundidad de sardina crinuda (Günther) de la zona de Mazatlán basados en el análisis histológico de la gónada. Memorias del Simposium nacional de recursos pesqueros masivos de México. Ensenada, Baja California. México. SEP,
- Patarnello, T., Bargelloni, L., Caldara, F. & Colombo, L. (1994). Cytocrome b and 16S rRNA sequence variation in the *Salmotrutta* (Salmonidae: Teleostei) species complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 3, 69-74.
- Ramírez-Pérez, J.S., C. Quiñónez-Velázquez, F.J. García-Rodríguez, R. Félix-Uraga, & F.N. Melo-Barrera. 2010. Using the Shape of Sagitta Otoliths in the Discrimination of Phenotypic Stocks in *Scomberomorus sierra* (Jordan and Starks, 1895). *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 5(2): 82-93.
- Ramírez-Pérez, J.S. 2010. Estructura poblacional de la sierra del Pacífico *Scomberomorus sierra* Jordan y Starks, 1895 (Perciformes: Scombridae) en el Pacífico mexicano. (Tesis Doctorado). La Paz: Centro de Ciencias Interdisciplinario de Ciencias Marinas.
- Rodríguez-Domínguez G. 1987. Caracterización bioecológica de las tres especies de sardina crinuda (*Opisthonema libertate*, *O. bulleri* y *O. medirastre*) del Pacífico mexicano (Tesis de Maestría). Ensenada, Baja California. México: CICESE.
- Rodríguez- Sánchez R. 1985 Aspectos de dinámica poblacional en apoyo de la separación de las especies del género *Opisthonema* por el método de índice de densidad de branquiespinas. *CalCOFI abstracts*, annual, conference, 22-24 octubre 1985.

- 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 Morphometric to Studies of Ontogeny and Phylogeny. *Systematic Biology*. 47(1):147-158.
- Rohlf, F.J. 2004. Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. *Ital. J. Zool.*, 71: 5-16.
- Ridley, M. 2003. *Evolution*. Wiley-Blackwell E.U.A. 792p.
- Ruiz, L.A. & L. Lyle F. 1992. Fluctuaciones periódicas de la captura de sardina crinuda (*Opisthonema* spp.) en el Golfo de California, 1972-1990. *CalCOFI Rep.* 33:124-129.
- SAGARPA. 2011. Anuario estadístico de acuicultura y pesca 2010. México: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
- SAGARPA. 2013. Anuario estadístico de acuicultura y pesca 2010. México: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
- Sánchez, R., R. D. Sepúlveda, A. Brante y 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.
- SEPESCA. 1994. Normas Oficiales Mexicanas del sector pesca.
- Sheets, H. D. 2004. IMP: Integrated Morphometrics Package. Canisius College. N. Y. <http://www3.Canisius.edu/sheets/morphsoft.html>.
- Sokal, R. R. & P. H. A. Sneath. 1963. Principles of numerical taxonomy. Freeman. San Francisco, Ca. E.U.A. 359p.
- Sotelo, C. G., C. Piñeiro, J. M. Gallardo & R. I Pérez Martin. 1993. Fish species identification in seafoods products. *Trends. Food Sci. Technol.*, 4: 395-401.

- Soto, R. (1999). Estimación de la curva de crecimiento y talla de la primera madurez de tres especies del complejo *Opisthonema* (Pisces: Clupeidae) en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. Tesis de Licenciatura no publicada. Universidad Nacional, Costa Rica.
- Stevenson, D. & Carranza, F. (1981). Maximum yield estimates for the pacific thread herring, *Opisthonema spp.*, fishery in Costa Rica. *Fish. Bull.*, 79, 689-703.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. & 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.
- Tautz, D., P. Arctander, A. Minelli, R. H. Thomas & A. P. Vogler. 2003. A plea for ADN taxonomy. *Trends Ecol. Evol.* 18: 70-74.
- Torres-Ramírez. 2004. Nueva clave de identificación para la sardina crinuda del género *Opisthonema* Gill 1861 en el pacifico mexicano. Tesis de licenciatura. Universidad autónoma de Sinaloa. Facultad de ciencias del mar. Mazatlán, México. 18 pp.
- Tuset, V. M. Lombarte, A. González J. A. Pertusa, J. F. Lorente Ma. J. 2003. Comparative morphology of the sagittal otolith in *Serranus spp.* *Journal of fish biology*. 63, 6: 1491-1504.
- Tuset, V. M., P. L. Rosin & A. Lombarte. 2006. Sagittal otolith shape used in the identification of fishes of the genus *Serranus*. *Fish. Res.*, 81: 316-325.
- Vallarta-Zárate JR 2012. "Distribución y abundancia de la sardina crinuda (*Opisthonema spp*) en el sur del Golfo de California asociada a la variabilidad ambiental durante el periodo 1996-2010" (Tesis Maestría en Ciencias). Mazatlán: Universidad Nacional Autónoma de México.

- Vega-Corrales, L.A. 2010. Evaluación poblacional del stock explotable del complejo *Opisthonema* (Pisces: Cupleidae) en el Golfo de Nicoya, Costa Rica.
- Vergara-Solana F.J. 2012. Sistemática del género *Diapterus* Ranzani, 1842 (*Preciformes: Gerreidae*): análisis morfométricos y moleculares. (Tesis Maestría en Ciencias). La Paz: Centro de Ciencias Interdisciplinario de Ciencias Marinas.
- Vergara-Solana F.J., García-Rodríguez F.J. y De La Cruz Agüero J. 2013. Comparing body and otolith shape for stock discrimination of Pacific sardine, *Sardinops sagax* Jenyns, 1842. *Journal of applied Ichthyology*.
- Vignon, M. & Morat, F. (2010). Environmental and genetic determinant of otolith shape revealed by a non-indigenous tropical fish. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 411, 231-241.
- Vogler, A.P. & M.T. Monaghan. 2006. Recent advances in DNA taxonomy. *J Zool Syst Evol Res.* 45 (1): 1-10.
- Ward RD, Zemplak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 360, 1847–857.
- Whitehead PJ. 1985. Clupeoid fishes of the world an annotated and illustrated catalogue of the herrings, sardines, pilchards, sprats, anchovies and woltherrings. Part 1 *chirocentridae* and *pristigasterida*. Roma: FAO.
- Wiley, E. O. & B. S. Lieberman. 2011. Phylogenetics: Theory and practice of phylogenetic systematics, second edition. Wiley-Blackwell. E.U.A., New Jersey. 427 p.
- Winberger, P. H. 1992. Plasticity of fish body shape. The effects of diet, development, family and age in two species of *Geophagus* (Pisces: Cichlidae). *Biol. J. Linn. Soci*, 45: 197-218.

- 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.
- 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*
- Zelditch, M. L., H.D. Sheets & W. L. Fink. 2003. The ontogenetic dynamics of shape disparity. *Paleobiology*. 29: 139-156.
- Zelditch, M. L., Swiderski, D. L., Sheets, H. D. & Fink, W. L. 2004. Geometric morphometrics for biologists – a primer. Elsevier, San Diego. 443pp.

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 más 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).