

NOTAS

Homogeneidad genética en tiburón angelito (*Squatina californica*) del Golfo de California, evidenciada por análisis PCR-RFLP de la región control del ADN mitocondrial.

José Manuel Grijalva-Chon,* Akiuki Kaichi** y Ken-ichi Numachi.**

El tiburón angelito es un componente de la pesquería multiespecífica de tiburón de México, cuya importancia se ha discutido por otros autores (Bonfil *et al.* 1990; Applegate *et al.* 1993; Bonfil, 1997; Castillo-Géniz *et al.* 1998). La estadística oficial de pesca no hace distinción por especies, sino por tallas: individuos menores de 150 cm de longitud total se denominan “cazones”, y organismos de más de 150 cm se denominan “tiburones” (Castillo-Géniz, 1998). Para conocer la contribución real de cada especie de tiburón a la pesquería son necesarios más estudios como los de Bonfil *et al.* (1990), Villavicencio-Garayzar *et al.* (1997), y Márquez-Farías y Castillo-Géniz (1998).

Existe una ausencia de información científica relacionada a la composición específica de la pesquería mexicana de tiburón, aunque hay algunos esfuerzos recientes (Castillo-Géniz *et al.*

1998). Para cualquier especie que requiera manejo, la información de la estructura genética poblacional es fundamental, especialmente la existencia de homogeneidad a lo largo del rango geográfico de la pesquería. Al igual que para las otras especies de tiburón, la estructura genética para el tiburón angelito mexicano es desconocida. Una herramienta útil para el estudio de la variabilidad poblacional es el análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de secciones específicas amplificadas de ADN mitocondrial (ADNmt), por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Este análisis ha probado ser de gran utilidad para detectar variación intraespecífica (Tegelström, 1992; Randi, 2000) en una gran variedad de especies. La región control mitocondrial regula la replicación y transcripción del genoma mitocondrial y además es la parte más variable de ese genoma (Randi, 2000). Esta región ha sido bien estudiada en peces (Stepien y Kocher, 1997) y se ha utilizado en muchos estudios genéticos poblacionales. La literatura de análisis PCR-RFLP del ADNmt en recursos pesqueros es numerosa, y su utilidad en estos estudios es ampliamente discutida en Ferris y Berg (1987), Ovenden (1990), Grant *et al.* (1999) y Mustafa y Rahman (1999). Un aspecto importante para el diseño de oligonucleótidos iniciadores en peces es la secuencia de genomas mitocondriales publicados, disponibles para varias especies (Randi, 2000), los cuales sirven de base para tal diseño.

El tiburón angelito, *Squatina californica*, tiene una distribución discontinua a lo largo de la costa del Pacífico americano, desde el SE de Alaska al Golfo de California y desde Perú a Chile (Eschmeyer *et al.* 1983). Los angelitos viven cercanos al fondo a profundidades no mayores a los 200 m y son relativamente inactivos y de movimientos lentos (Fischer *et al.* 1995). Gaida (1997) analizó la estructura genética mediante alozimas del tiburón angelito en las Islas Channel de California y atribuyó la subdivisión poblacional encontrada a la limitada movilidad y

*Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad de Sonora.

**School of Marine Science and Technology, Tokai University, Japan.

a la incapacidad de nadar entre una isla y otra. En el Golfo de California la plataforma continental es muy estrecha, especialmente a lo largo de la costa de Baja California, y el cruce de una costa a otra esta fuertemente restringido por las profundas cuencas (Fig. 1).

El objetivo del estudio presentado en este documento fue determinar la variación genética en la región control del ADNmt, utilizando la técnica PCR-RFLP en dos muestras pequeñas de angelito del Golfo de California; esto, como un

estudio piloto sobre la estructura genética poblacional del tiburón angelito.

Se colectaron dos muestras (20 individuos por cada una) de tiburón angelito en Isla Tiburón e Isla San José (fig. 1), en el Golfo de California, México. Los tiburones fueron colectados por pescadores artesanales utilizando palangres durante los meses de enero y febrero de 1996. Se tomaron muestras de músculo y se preservaron en alcohol al 99% hasta su análisis.

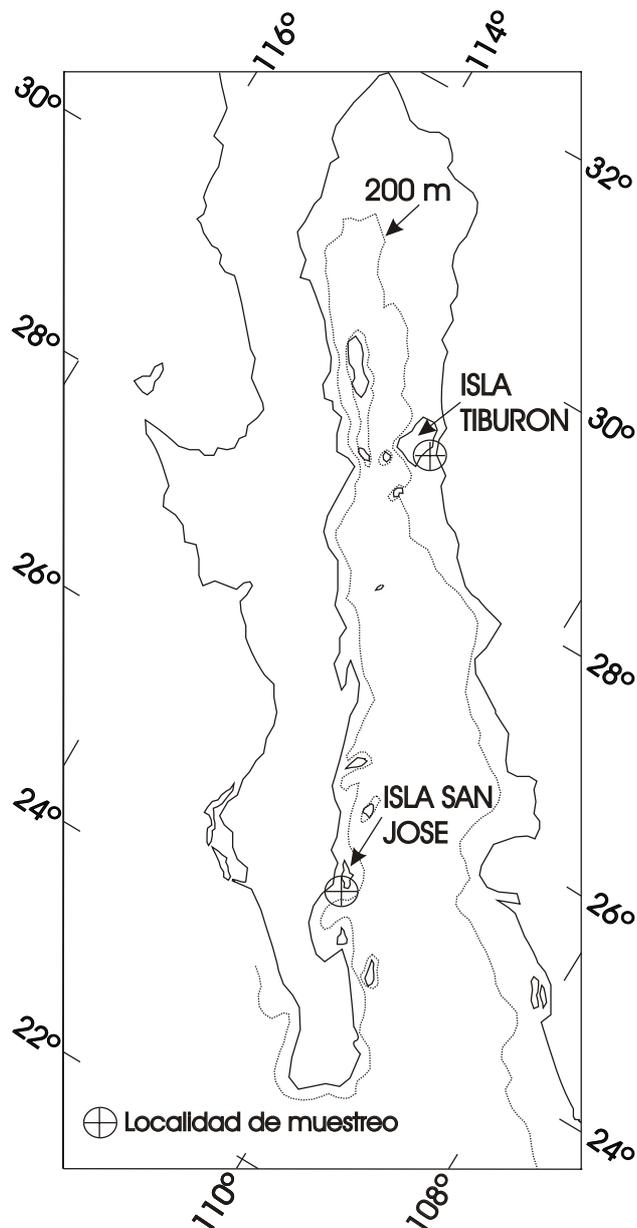


Figura 1. Mapa del Golfo de California mostrando los sitios de colecta de las muestras de tiburón angelito. La línea

Tabla I. Patrones de fragmentos de restricción de la región control mitocondrial del tiburón angelito. Los tamaños de los fragmentos fueron estimados utilizando el estándar PhiX174-*HaeIII*.

<i>AfaI</i>	<i>AvaII</i>	<i>AsuI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>MvaI</i>	<i>MspI</i>	<i>HinfI</i>		<i>MboI</i>	
A	A	A	A	A	A	A	B	A	B
620	1078	1048	1191	763	1127	1322	1217	1053	1065
559	440	423	417	454	417		100	456	417
430				424					

El ADN total fue extraído de acuerdo a Grijalva-Chon *et al.* (1994). Se amplificó la región mitocondrial entre los genes 12S-RNAr y RNAt-Pro, comprendiendo la región control, para lo cual se diseñaron los iniciadores oligonucleótidos H:utilizando el promotor 5'TTGACCCTAATCTATGGGGTGATA-3' y L:para la banda densa y el promotor 5'CGAAACC(C/A)TC(G/A)T(C/T)CCCACT-3', utilizando los métodos descritos en Kocher *et al.* (1989), Gilbert *et al.* (1988) y Chang *et al.* (1994) para la banda L y Palumbi *et al.* (1991) para la banda H. para la banda ligera. Las condiciones para la reacción en cadena de la polimerasa fueron un paso inicial de desnaturalización a 94C por dos minutos y 30 ciclos de las condiciones siguientes: 94C por 30 segundos, 55C por 30 segundos y 72C por 180 segundos. El paso final fue de 72C por 10 minutos.

Los productos del PCR fueron digeridos con ocho enzimas de restricción de cuatro (*RsaI*, *AsuI*, *HinfI*, *HaeIII*, *MboI* y *MspI*) y cinco bases (*AvaII* y *MvaI*), *AfaI*, *AsuI*, *HinfI*, *HaeIII*, *MboI* y *MspI*) siguiendo las instrucciones de los fabricantes (Takara Biomedicals y Toyobo). Los fragmentos digeridos fueron separados por tamaño en geles de agarosa al 2%, teñidos con

bromuro de etidio y fotografiados. Como estándar de tamaño se utilizó a PhiX174-*HaeIII* (Takara Biomedicals).

Se calculó la diversidad de haplotipo y de nucleótido (Nei, 1987), y la divergencia entre las localidades (Nei y Tajima, 1981). Para probar la homogeneidad de las frecuencias haplotípicas se utilizó el método aleatorizado de Monte Carlo con 1000 réplicas (Roff y Bentzen, 1989) con el paquete estadístico REAP (McElroy *et al.* 1992). El análisis *Gst* de diferenciación entre las localidades se calculó de acuerdo a Nei (1987), considerando a los haplotipos como alelos de un locus.

Tres angelitos de la Isla San José no proporcionaron extractos de ADN de buena calidad. El fragmento amplificado tuvo una longitud de 1,506111 pb, y todas las enzimas lo dividieron la región control en dos o más fragmentos, pero sólo *HinfI*, y *MboI* y *MspI* revelaron un polimorfismo (Tabla I). Se obtuvieron tres haplotipos, y más del 94% de los individuos compartieron el haplotipo más común. Los otros haplotipos fueron exclusivos para cada área (Tabla II). No se encontraron diferencias en las frecuencias genotípicas con el método Monte Carlo, ya que 702 réplicas

Tabla II. Distribución de haplotipos y variabilidad genética en tiburón angelito del Golfo de California. Las letras de los genotipos compuestos denotan, de izquierda a derecha, los patrones de digestión para *HinfI*, y *MboI*. y *MspI*.

Genotipo compuesto	Isla Tiburón	Isla San José
AA	19 (95%)	16 (94.1%)
BA	1 (5%)	
AB		1(5.9%)
No. de individuos	20	17
Diversidad de haplotipos	0.1000	0.1176
Diversidad de nucleótido	0.0099	0.0062

igualaron o excedieron la ² original ($p=0.702$). La divergencia de nucleótidos entre las muestras fue de 0.00037, y el *Gst* estimado fue de 0.079. Las diversidades de haplotipo (nucleón) y de nucleótido promedio fueron de 0.1090.00008 y 0.0080.000003, respectivamente.

Faber y Stepien (1997) reportaron que la región control en varias especies de peces de la familia Percidae varía entre 908 y 1248 pares de bases, con gran variabilidad inter e intraespecífica. Esta variación está dada por el número variable de secuencias repetidas similares a las encontradas en otros taxa de vertebrados. Esto podría explicar la variación del tamaño del genoma del tiburón angelito.

De acuerdo a la divergencia de nucleótido y al análisis de Monte Carlo, podemos sugerir que existe una homogeneidad genética en el tiburón angelito del Golfo de California. Los valores de divergencia de nucleótido fueron negativos, y Nei y Tajima (1981) mencionan que las muestras con una relación genética muy cercana pueden dar valores de divergencia negativos. El número diferente de individuos analizados por sitio puede sesgar las diferencias en la diversidad de nucleótido entre las localidades (0.99 y 0.62%). La carencia de diferenciación genética entre las localidades se puede atribuir a la imposibilidad del tiburón angelito de cruzar las profundas cuencas del Golfo de California, y a que, a pesar de su lento comportamiento, los ~1,500 km de línea costera entre los sitios de colecta no son suficientes para un aislamiento genético. Varias posibilidades, sPor lo tanto, sólo con un estudio genético poblacional más robusto, que tome en cuenta un mayor tamaño de muestra con al menos al menos 50 individuos por localidad, y un mayor número de enzimas de restricción, se podrán plantear conclusiones más definitivas.

Existen muy pocos estudios basados en el análisis del ADN mitocondrial (ADNmt) sobre la estructura genética de tiburones y los que existen se enfocan al análisis RFLP de la molécula total de ADNmt (Heist, *et al.* 1995, 1996a, 1996b; Gardner y Ward, 1998). La variación intraespecífica reportada aquí para el angelito (0.00881%) es mayor que la reportada para otras especies de tiburón, pero menor que el 1% reportado para

peces marinos para ADNmt (Ovenden, 1990), aunque la comparación con otros estudios sobre genética de tiburón no es directa debido a que no siempre se utilizan las mismas enzimas de restricción.

Villavicencio-Garayzar *et al.* (1997) encontraron diferencias en el promedio de la longitud total y la longitud a la primera madurez entre angelitos del Golfo de California y de la costa del Pacífico de la península de Baja California. Ellos sugieren la posibilidad de dos poblaciones basados en sus análisis morfométricos. Para probar esa hipótesis es necesario analizar muestras de mayor tamaño en ambos lados de la península. Si las diferencias morfométricas reportadas por Villavicencio-Garayzar *et al.* (1997) tienen una base genética, el análisis PCR-RFLP de la región control mitocondrial puede ser apropiado para probar su hipótesis.

El tiburón angelito se captura principalmente durante el invierno en el Golfo de California, así como el tiburón dormilón búfalo (*Heterodontus mexicanus*) y la musola segadora (*Mustelus lunulatus*) (Galvan-Magaña *et al.* 1989). Sin embargo, para administrar apropiadamente la pesquería multiespecífica de tiburón de México es crítico comprender algo más que los datos de captura estacionales. Estudios específicos sobre dinámica poblacional, historia de vida y genética poblacional son de una necesidad urgente (Applegate *et al.* 1993; Bonfil, 1997; Villavicencio-Garayzar *et al.* 1997, entre otros), aunque difíciles de llevar a cabo en el corto plazo debido al gran número de especies. Sólo un efectivo programa de investigación cooperativo y un plan de manejo multiespecífico podrá hacer esto posible.

Agradecimientos

Agradecemos a Carlos Villavicencio-Garayzar y a Lázaro Cadena-Cárdenas (Universidad Autónoma de Baja California Sur) su ayuda en las actividades de muestreo. Este proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con el convenio 2007P-N9507. Agradecemos los comentarios de Gregory Hammann.

Bibliografía

- Applegate S.H., F. Sotelo-Macias y L. Espinosa-Arrubarrena, 1993. An overview of Mexican shark fisheries, with suggestions for shark conservation in Mexico. En S. Branstetter (Ed.): Conservation Biology of Elasmobranchs: 31-37. U.S. Dep. Commer., NOAA Tech. Rep. NMFS 115
- Bonfil R., 1997. Status of shark resources in the southern Gulf of Mexico and Caribbean: implications for management. *Fish. Res.*, 29: 101-117.
- Bonfil R., D. De Anda y R. Mena, 1990. Shark fisheries in Mexico: The case of Yucatan as an example. En H.L. Pratt Jr., S.H. Gruber y T. Taniuchi (Eds.): Elasmobranchs as Living Resources: Advances in the Biology, Ecology, Systematics, and the Status of the Fisheries: 427-441. U.S. Dep. Commer., NOAA Tech. Rep. NMFS 90.
- Castillo-Géniz J.L., J.F. Márquez-Farías, M.C. Rodríguez-de la Cruz, E. Cortés y A. Cid-del Prado, 1998. The Mexican artisanal shark fishery in the Gulf of Mexico: towards a regulated fishery. *Mar. Freshwater Res.*, 49: 611-620.
- Chang Y.S., F.L. Huang y T.B. Lo, 1994. The complete nucleotide sequence and gene organization of carp (*Cyprinus carpio*) mitochondrial genome. *J. Mol. Evol.*, 38: 138-155.
- Eschmeyer W.N., E.S. Herald y H. Hammann, 1983. A Field Guide to Pacific Coast Fishes of North America. Houghton Mifflin Company. Boston. 336 pp.
- Faber J.E. y C.A. Stepien, 1997. The utility of mitochondrial DNA control region sequences for analyzing phylogenetic relationships among populations, species, and genera of the Percidae. En T.D. Kocher y C.A. Stepien (Eds.): Molecular Systematics of Fishes: 129-143. Academic Press. San Diego. 314 pp.
- Ferris S.D. y W.J. Berg, 1987. The utility of mitochondrial DNA in fish genetics and fishery management. En N. Ryman y F. Utter (Eds.): Population Genetics and Fishery Management: 277-299. University of Washington Press, Seattle. 420 pp.
- Fischer W., F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K.E. Carpenter y V.H. Niem, 1995. Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Vol. II: 647-1200. FAO. Rome.
- Gaida I.H., 1997. Population structure of the Pacific angel shark, *Squatina californica* (Squatiniiformes: Squatinidae), around the California Channel Islands. *Copeia*, 1997: 738-744.
- Galvan-Magaña F., H.J. Nienhuis y A.P. Klimley, 1989. Seasonal abundance and feeding habits of sharks of the lower Gulf of California, México. *Calif. Fish and Game*, 75: 74-84.
- Grant W.S., J.L. García-Marín y F.M. Utter, 1999. Defining population boundaries for fishery management. En S. Mustafa (Ed.): Genetics in Sustainable Fisheries Management: 27-72. Fishing News Books, Oxford. 223 pp.
- Grijalva-Chon J.M., K. Numachi, O. Sosa-Nishizaki y J. de la Rosa-Vélez, 1994. Mitochondrial DNA analysis of North Pacific swordfish *Xiphias gladius* population structure. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 115: 15-19.
- Gardner M.G. y R.D. Ward, 1998. Population structure of the Australian gummy shark (*Mustelus antarcticus* Günther) inferred from allozymes, mitochondrial DNA and vertebrae counts. *Mar. Freshwater Res.*, 49: 733-745.
- Gilbert T.L., J.R. Brown, P.J. O'Hara, N.E. Buroker, A.T. Beckenbach y M.J. Smith, 1988. Sequence of tRNA(Thr) and tRNA(Pro) from white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) mitochondria. *Nucl. Acids Res.*, 16: 11825.
- Heist E.J., J.E. Graves y J.A. Musick, 1995. Population genetics of the sandbar shark (*Carcharhinus plumbeus*) in the Gulf of Mexico and Mid-Atlantic Bight. *Copeia*, 1995: 555-562.
- Heist E.J., J.A. Musick y J.E. Graves, 1996a. Genetic population structure of the shortfin mako (*Isurus oxyrinchus*) inferred from restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 53: 583-588.
- Heist E.J., J.A. Musick y J.E. Graves, 1996b. Mitochondrial DNA diversity and divergence among sharpnose sharks, *Rhizoprionodon terraenovae*, from the Gulf of Mexico and Mid-Atlantic Bight. *Fish. Bull.*, 94: 664-668.
- Kocher T.D., W.K. Thomas y A. Meyer, 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86: 6196-6200.
- McElroy D., P. Moran, E. Bermingham y I. Kornfield, 1992. REAP: an integrated environment for the manipulation and phylogenetic analysis of restriction data. *J. Heredity*, 83: 157-158.
- Márquez-Farías J.F. y J.L. Castillo-Geniz, 1998. Fishery biology and demography of the Atlantic sharpnose shark, *Rhizoprionodon terraenovae*, in the southern Gulf of Mexico. *Fish. Res.*, 39: 183-198.
- Mustafa S. y R.A., Rahman. 1999. Marine genetic resources and sustainable fisheries management. En S. Mustafa (Ed.): Genetics in Sustainable Fisheries Management: 75-98. Fishing News Books, Oxford. 223 pp.
- Nei M., 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York, 512 pp.

Nei M. y F. Tajima, 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics*, 97: 145-163.

Ovenden J.R., 1990. Mitochondrial DNA and marine stock assessment: a review. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, 41: 835-853.

Palumbi S.R., A. Martín, S. Romano, W.O. McMillan, L. Stice y G. Grabowski, 1991. *The Simple Fool's Guide to PCR*. University of Hawaii. Honolulu. 35 pp.

Randi E., 2000. Mitochondrial DNA. En A.J. Baker (Ed.): *Molecular Methods in Ecology*: 136-167. Blackwell Science, Oxford. 337 pp.

Roff D.A. y P. Bentzen, 1989. The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: ² and the problem of small samples. *Mol. Biol. Evol.*, 6: 539-545.

Stepien C.A. y T.D. Kocher, 1997. Molecules and morphology in studies of fish evolution. En T.D. Kocher y C.A. Stepien (Eds.): *Molecular Systematics of Fishes*: 1-11. Academic Press. San Diego. 314 pp.

Tegelström H., 1992. Detection of mitochondrial DNA fragments. En A.R. Hoelzel (Ed.): *Molecular Genetic Analysis of Populations. A Practical Approach*: 89-113. IRL Press. Oxford. 315 pp.

Villavicencio-Garayzar C.J., E.M. Meléndez y C. Downton, 1997. Tiburones capturados comercialmente en la Bahía de La Paz, B.C.S. En R. Urbán y M. Ramírez (Eds.): *La Bahía de La Paz, Investigación y conservación*: 181-192. UABCS-CICIMAR-SCRIPPS. La Paz, B.C.S., México.

Recibido: 29 de Enero del 2002

Aceptado: 12 de Marzo del 2002