

DIVERGENCIA EN PROTEÍNAS, ADN MITOCONDRIAL Y COMPATIBILIDAD REPRODUCTORA A TRAVÉS DEL ISTMO DE PANAMÁ¹

Nancy Knowlton,^{2,3} Lee A. Weight,² Luis Aníbal Solórzano,² DeEtta K. Mills,² Eldredge Bermingham²

¹ Reimpreso con la autorización correspondiente del autor o casa editora: Divergence in proteins, mitochondrial DNA, and reproductive incompatibility across the Isthmus of Panama. *Science* 260: 1629-1632, 1993. Manuscrito recibido: enero 19, 1993; aceptado: abril 26, 1993.

² Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales, Apartado 0843-03092, República de Panamá.

³ Dirección para correspondencia.

RESUMEN: En general, se cree que el flujo de genes vinculó muchas poblaciones de aguas someras del Caribe y del Pacífico oriental hasta el cierre del istmo, ocurrido hace 3.0 a 3.5 millones de años. Las medidas de divergencia bioquímica y reproductora de siete pares de camarones *Alpheus*, que son parientes transístmicos cercanos, muestran que el aislamiento ocurrió en forma gradual y no simultánea. Los cuatro pares menos divergentes proporcionan el mejor cálculo de las tasas de divergencia molecular y de especiación. Los datos ecológicos, genéticos y geológicos sugieren que el flujo genético fue perturbado en los tres pares restantes, por cambios ambientales ocurridos varios millones de años antes de completarse la barrera del istmo.

Se cree que el aislamiento geográfico facilita la diferenciación y la especiación, debido a la perturbación del flujo genético (1). Los pares fraternos de taxones marinos separados por el Istmo de Panamá son ideales para estudiar estos procesos (2 - 5), puesto que la época de la separación del Caribe y del Pacífico oriental está bien definida, y es relativamente reciente (6, 7). Este marco geológico ha estimulado el estudio de taxones fraternos transístmicos para comprobar la exactitud de los relojes moleculares y para calcular la época de otros eventos evolutivos (3, 4, 8). Sin embargo, ha sido difícil interpretar las discrepancias y calcular las posibles diferencias filogenéticas de las tasas de divergencia (9), debido al escaso número de taxones y caracteres estudiados. Para tratar estos problemas, investigamos la divergencia en las alozimas, el ADN mitocondrial (ADNmt) y de la compatibilidad reproductora de siete pares transístmicos de taxones hermanos, de aguas someras, en camarones del género *Alpheus*.

Utilizamos la literatura taxonómica para determinar los pares transístmicos que aparecieran descritos en forma específica y sin ambigüedades, como parientes cercanos, según criterios morfológicos (10). La recolección a lo largo de ambas costas y en islas cercanas, en Panamá central, a profundidades inferiores a 5 m, reveló especies hermanas no reconocidas, además de dichos pares (11). En total, examinamos 17 taxones (Cuadro 1): dos pares sin ambigüedades, (P4-C4, P5-C5), tres

tríos (P3-C3, P3-C3'; P6-C6, P6'-C6; P7-C7, P7'-C7) y un cuarteto (P1-C1, P1-C2, P2-C1, P2-C2). Utilizamos caracteres compartidos, tales como patrones anatómicos y de color (12), para establecer las relaciones dentro de los tríos y el cuarteto. Resultaron siete pares de especies hermanas transístmicas, según la definición morfológica (en negrilla en los Cuadros 1 y 2).

En cada taxón, determinamos las alozimas mediante electroforesis convencional de gel de almidón (13) y efectuamos la secuencia de un segmento de ADNmt, el gen citocromo oxidasa I (COI) (14). El comportamiento agresivo se utilizó como estimativo de los componentes de comportamiento y de compatibilidad reproductora (15), porque estos camarones atacan a los individuos heteroespecíficos y a todos los coespecíficos, con la excepción de aquellos que pudieran convertirse en pareja (16). Calculamos la divergencia genética entre pares transístmicos con D de Nei para las alozimas, y la secuencia corregida del porcentaje de divergencia de Kimura para el ADNmt (17). Calculamos la divergencia de la compatibilidad de comportamiento, mediante normalización de medidas de tolerancia e intolerancia, en los pares transístmicos y la cotejamos con los valores observados en los apareamientos de los coespecíficos intraoceánicos de control (15).

Estas tres medidas de divergencia apoyan consistentemente las asignaciones de pares de especies hermanas transístmicas, según la morfología y el patrón de color.

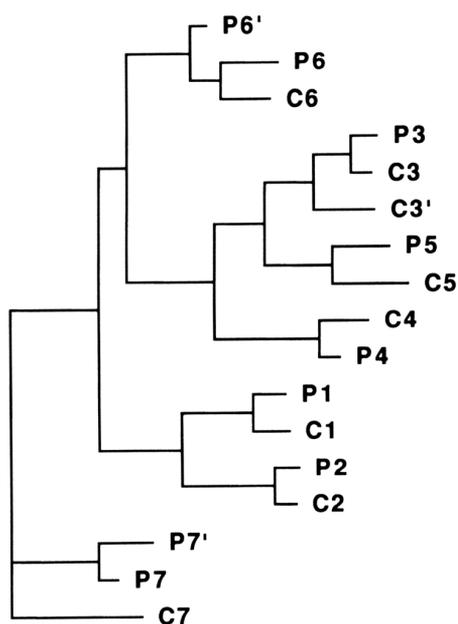


Figura 1. Árbol filogenético de mayor parsimonia, construido con PAUP basado en las secuencias del ADNmt (18). A las transiciones se les asignó una cuarta parte del peso de las transversiones (con base en la abundancia de transiciones, cuatro veces mayores que las transversiones de nuestros datos); las raíces del árbol comienzan con el clado P7-P7'-C7. Los códigos de los taxones son como aparecen en el Cuadro 1.

Dentro de los tríos y el cuarteto, los pares de especies hermanas transístmicas, en general, muestran mayor compatibilidad reproductora, menor divergencia de alozimas y menor divergencia del ADNmt, que los pares de especies transístmicas no hermanas (compárense los valores en negrilla con los de tipo normal, en los Cuadros 1 y 2). El análisis de parsimonia (18) de las secuencias del ADNmt, también apoyan esta asignación (Figura 1).

Los siete pares de especies transístmicas hermanas mostraron una variación de casi tres veces, si no mayor, en la divergencia molecular y reproductora (Cuadros 1 y 2). Más aun, cada medida se relacionó en forma fuerte y significativa (aunque no perfectamente), con las otras dos (Figura 2). La discrepancia más notoria consiste en el valor reducido de la D de Nei, en comparación con la divergencia del ADNmt para el par P1-C1, un patrón que también apareció en uno de los tres pares transístmicos de erizos de mar estudiados (4). La concordancia general de las medidas de divergencia se explica mejor con el aislamiento gradual. La hipótesis nula, que afirma que el aislamiento fue simultáneo, pero las tasas de divergencia muy variables, es incompatible con el patrón observado, puesto que las enzimas meta-

bólicas, el ADNmt y el reconocimiento de pareja no comparten una base mecanicista para poder relacionar las tasas de divergencia en forma automática.

Hay otras pocas explicaciones sostenibles para este patrón de variación coherente, pero ninguna parece aplicable en este caso. Es improbable que las diferencias en la intensidad de la selección natural, o sexual afecten a todos los tres sistemas en forma paralela y no puedan explicar el patrón comparable observado de sustituciones silentes del ADNmt (19) en algún caso. Igualmente, tampoco existe evidencia para las diferencias entre los pares en el tamaño histórico efectivo de las poblaciones, ni tiempos de generación que puedan relacionarse con la divergencia (20).

La conclusión de que el aislamiento no fue simultáneo justifica la eliminación de los pares menos semejantes al calcular la divergencia molecular. La división de los valores de divergencia de las alozimas y de las secuencias del ADNmt en los pares P1-C1, P2-C2, P3-C3 y P4-C4 por el tiempo transcurrido desde el cierre definitivo del paso del mar panameño, que se ha calculado entre 3.0 y 3.5 millones de años (ma) (6,7), produce una tasa aproximada de divergencia de 0.03 a

Cuadro 1. Comparaciones moleculares (13,14) de taxones transístmicos. Los siete pares de taxones hermanos aparecen en negrilla. Los nombres de las especies actualmente reconocidas (10) con anotaciones sobre especies simpátricas hermanas no descritas (11), son: P1, *Alpheus rostratus*; C1, *A. paracrinitus* sp. b; P2, *A. paracrinitus*; C2, *A. paracrinitus* sp. a; P3, *A. panamensis*; C3, *A. formosus* sp.; a; C3', *A. formosus* sp. b; P4, *A. cylindricus*; C4, *A. cylindricus*; P5, *A. saxidomus*; C5, *A. simus*; P6, *A. canalis* sp. b; C6, *A. nuttingi*; P6', *A. canalis* sp. a; P7 y P7', *A. cristulifrons*; C7, *A. cristulifrons* (P, Pacífico; C, Caribe). La divergencia genética entre pares se calculó con la D de Nei para alozimas y con la secuencia de divergencia porcentual corregida de Kimura para el ADNmt (17).

Taxones	Alozimas	ADNmt COI
		Promedio (variación)
P1, C1	0.028	7.7 (7.3-8.2)
P1, C2	0.183	17.3 (17.0-17.6)
P2, C2	0.114	6.6 (6.4-6.7)
P2, C1	0.119	17.4 (16.7-18.2)
P3, C3	0.109	7.7 (7.2-8.1)
P3, C3'	0.124	13.4 (13.1-13.6)
P4, C4	0.121	8.5 (8.4-8.7)
P5, C5	0.177	13.4 (13.4)
P6, C6	0.188	10.5 (10.4-10.7)
P6', C6	0.224	9.0 (8.7-9.4)
P7, C7	0.272	19.2 (18.6-19.5)
P7', C7	0.231	19.7 (19.3-20.4)

Cuadro 2. Comportamiento de tolerancia e intolerancia, en pares transísmicos macho - hembra (T) relativos a los pares intraoceánicos de control (I) (15). Aparecen como la proporción de pares, el número de contactos pasivos, el número de ataques, el número de contactos agresivos y la compatibilidad general (mediana de las cuatro medidas) . Las especies son las que se describen en el Cuadro 1. No hay datos disponibles para la combinación P7'-C7. Los valores reducidos indican que los pares transísmicos exhiben poco comportamiento de tolerancia o mucho comportamiento de intolerancia en comparación con los pares intraoceánicos del mismo taxón. Nótese que el comportamiento apareado, no conduce, necesariamente, a la producción de nidadas fértiles. Durante un período de 30 días posterior a esta observación de comportamientos, sólo una réplica del par P3-C3 produjo nidadas fértiles (que representan un 1% de todos los pares transísmicos examinados, en comparación con una producción de nidadas fértiles del 60%, en los pares intraoceánicos de control).

Taxones	Tolerancia (T/I)		Intolerancia (I/T)		Compatibilidad
	Emparejado	Contacto pasivo	Ataque	Contacto agresivo	
P1, C1	0.86	1.97	2.18	0.49	1.42
P1, C2	0.00	0.00	0.11	0.10	0.05
P2, C2	0.67	0.33	1.40	0.48	0.58
P2, C1	0.00	0.02	0.15	0.10	0.06
P3, C3	0.45	0.66	0.49	0.31	0.47
P3, C3'	0.00	0.03	0.35	0.26	0.15
P4, C4	0.00	0.07	0.33	0.53	0.20
P5, C5	0.33	0.51	0.14	0.13	0.24
P6, C6	0.00	0.01	0.33	0.19	0.10
P6, C6	0.00	0.00	0.09	0.04	0.02
P3, C7	0.00	0.01	0.14	0.00	0.01

* balaeniceps, en el original

0.04 para la D de Nei, y de entre 2.2% y 2.6%, para la secuencia del ADNmt por cada 10⁶ años (21). Los tiempos calculados a partir de la divergencia para los otros tres pares, utilizando estas calibraciones son de 4.4 a 6.1 (P5-C5), de 4.0 a 6.3 (P6-C6) y de 6.8 a 9.1 (P7-C7) millones de años.

Es probable que la divergencia genética, anterior al cierre definitivo se haya facilitado debido a los cambios ocurridos en las condiciones oceanográficas. Los conjuntos de foraminíferos fosilizados sugieren una interrupción de las conexiones circulatorias a través del paso marino de Panamá, de entre 12.9 y 7.0 millones de años, como un resultado de una alteración en los patrones de las corrientes, seguida por una nueva conexión restringida de aguas someras, cuya profundidad se redujo hasta menos de 50 m, hace 6.3 ma (7). Hace 5.0 ma, los gasterópodos estrómbidos mostraban una divergencia importante a nivel subgenérico (22) y se habían establecido comunidades de foraminíferos béticos relacionados con carbonatos, en el sur del Caribe (23). Desde entonces, los pares P5-C5 y P6-C6 probablemente se separaron durante los períodos de marcada disminución de la profundidad y de divergencia ambiental, que precedieron el cierre definitivo. El aislamiento de P7/P7' de C7, quizás ocurrió cuando la hipotética barre-

ra cerró la circulación y por falta de entrecruzamiento, al restablecerse la conexión parcial entre los océanos. Las transiciones ambientales también parecen haber estimulado divergencias intraoceánicas (24).

Todos los camarones estudiados son formas completamente marinas de aguas someras, con larvas planctónicas. Sin embargo, presentan algunas diferencias de distribución que podrían afectar la sensibilidad a los cambios de las condiciones, relacionados con el surgimiento gradual del istmo. Los miembros de los pares más divergentes del Pacífico se encuentran a mayor profundidad en la zona intermareal o bien, son escasos en ambientes de gran sedimentación (25) (Figura 2). Por tanto, el hecho de que las larvas se apartaran de las aguas someras sobre el istmo en formación (6,7), pudo acelerar el aislamiento genético de estos pares.

Nuestros datos también pueden usarse para calcular las tasas de divergencia de la compatibilidad reproductora. Aun los pares menos divergentes muestran fuerte aislamiento reproductor, pero considerable compatibilidad de comportamiento y la producción esporádica de nidadas fértiles, también ocurre (Cuadro 2). Esta observación sugiere que, como para otros grupos (5,27), entre 3.0 y 3.5 millones de años serían el

tiempo mínimo necesario para desarrollar un fuerte aislamiento reproductor bajo el modelo alopatrico clásico, de división de dos poblaciones de gran tamaño, sin contactos secundarios.

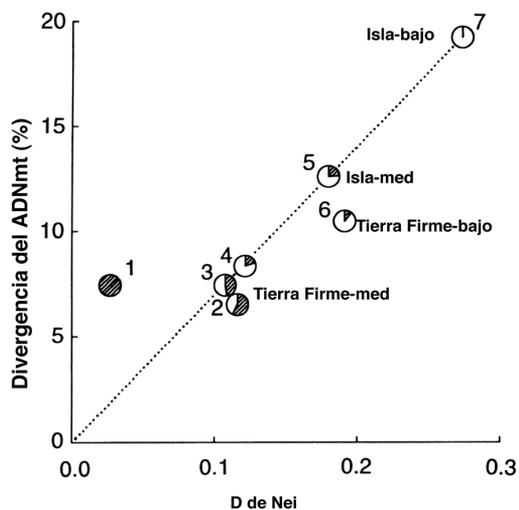


Figura 2. Relación entre la divergencia de alozimas (resumida como la D de Nei), la divergencia de la secuencia del ADNmt y la compatibilidad de comportamiento entre machos y hembras de siete pares de especies transistmicas hermanas (ambos valores aparecen en negrilla en los Cuadros 1 y 2). En cada par, la compatibilidad mediana de comportamiento se resume en forma de gráfico, dentro del círculo que muestra la relación entre las dos medidas de divergencia bioquímica. Los datos correspondientes a cada par son independientes de los datos para los demás pares. Cada medida de diferenciación se correlaciona significativamente con las otras dos medidas. Los coeficientes de correlación de rangos de Spearman son: $r_s = 0.82$, $P < 0.02$ (D de Nei – ADNmt); $r_s = 0.93$, $P < 0.001$ (D de Nei – compatibilidad); $r_s = 0.79$, $P < 0.03$ (ADNmt – compatibilidad). Estos coeficientes son significativos, según se determina con el método secuencial de Bonferroni (28). Los hábitats de los miembros de los pares del Pacífico aparecen marcados (25). La línea de puntos que conecta el origen con el par más divergente muestra una relación lineal entre las dos medidas bioquímicas, que es consistente con la suposición de la ausencia inicial de divergencia genética.

RECONOCIMIENTOS

Les agradecemos a J. Jara, F. Bouche, E. Gómez y R. Hamilton por su asistencia técnica; a E. Duffy, A. Herre, J. Jackson, H. Lessios, A. Martin, P. Morris, R. Rowan y D. Zeh por comentar el manuscrito; al Instituto Smithsonian por el apoyo económico y al gobierno de Panamá (Recursos Marinos) y a la Nación Kuna por la autorización para capturar los especímenes.

REFERENCIAS Y NOTAS

1. E. Mayr. *Animal Species and Evolution* (Harvard Univ. Press, Cambridge, 1963).
2. D. S. Jordan. *Am. Nat.* 42, 73 (1908); E. Mayr., *Evolution* 8, 1 (1954); I. Rubinoff thesis, Harvard University (1963); G. J. Vermeij, *Biogeography and Adaptation* (Harvard Univ Press, Cambridge, MA, 1978); D. S. Jones and P. F. Haxson in *The Great American Biotic Interchange*; F. G. Stehli and S. D. Webb, Eds (Plenum, New York 1985). pp 325-355; J. R. Weinberg and V. R. Starczak, *Mar. Biol.* 103, 143 (1989); H. A. Lessios, *Am Nat* 135, (1990).
3. H. A. Lessios *Nature* 280, 599 (1979). A. T. Vawter, R. Rosenblatt, G C Gorman, *Evolution* 34, 705 (1980). H. A. Lessios, *ibid* 35, 618 (1981). T. Collins, *Paleontol. Soc. Spec. Pub.* 6, 68 (1992).
4. E. Bermingham and H. A. Lessios, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 2734 (1993).
5. R. W. Rubinoff and I. Rubinoff, *Evolution* 25, 88 (1971); H. A. Lessios, *ibid.* 38, 1144 (1984); R. W. Rubinoff and C. W. Cunningham, *ibid.* 44, 933 (1990).
6. T. Saito, *Geology* 4, 305 (1976); L. D. Keigwin, Jr. *Science* 217, 350 (1982); A. G. Coates et al. *Geol. Soc. Am. Bull* 104, 814 (1992); but see G. Keller, C. E. Zenker, S. M. Store, J. S., *Am Earth Sci* 2, 73 (1989).
7. H. Duque-Caro, *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 77, 203 (1990), but see P. F. Haxson and A. G. Fischer, *Micro-paleontology* 32, 32 (1986).
8. S. A. McCommas, *Mar. Biol* 68, 169 (1982); A. P. Martin, G. J. P. Naylor, S. R. Palumbi *Nature* 357, 153 (1992).
9. J. H. Gillespie. *The Causes of Molecular Evolution* (Oxford Univ. Press, New York, 1991).
10. Pacific taxa; W. Kim and L. G. Abele. *Smithsonian Contrib. Zool* 454, 1 (1988); L. B. Holthuis, *Zool. Meded.* 55, 47. (1980). Caribbean taxa: F. A. Chace Jr., *Smithson. Contrib. Zool.* 98, 1 (1972).
11. N. Knowlton and D. K. Mills, *Proc. San Diego Soc. Nat. Hist.* 18, 1 (1992).
12. Los caracteres que vinculan los pares transistmicos dentro de los tríos y el cuarteto son presencia o ausencia de manchas dorsales y banda terminal del abdomen dividida o entera (pares P1-C1 y P2-C2, respectivamente), en ambos sexos la pinza menor con peine de setas (par P3-C3) y antenas azules y ausencia de espina móvil en el isquión del tercer período (par 6-C6). Actualmente, P7 y P7' sólo pueden distinguirse por medios bioquímicos y parecen haberse diferenciado con posterioridad a la separación del Caribe y el Pacífico (véase Figura 1).
13. Utilizamos técnicas y terminología estándar de electroforesis horizontal, con gel de almidón [R.W. Murphy, J. W. Sites, Jr., D. G. Buth, C. H. Haufler, en *Molecular Systematics*, D. M. Hillis y C. Moritz, Eds. (Sinauer, Sunderland, MA, 1990), pp. 45-126]. Todas las especies comparten 16 loci [con excepción de P1, C1; P2, C2 (sin actividad de CPDH) y P5, C5 (sin actividad de OPDH, FUMH, ALD, LDH-1)]. Cinco loci fueron monomorfos (PER, GP, FUMH, LDH-1, CK) y 11 fueron polimorfos (ALD, MDHP, LDH-2, GDH, ICD, MDH-1, MDH-2, OPDH, GPI, TPI-2, PGM). El tamaño medio de la muestra por locus, promediado para todas las especies fue 18.7 y el porcentaje de los loci polimorfos varió entre el 12.5 y el 37.5%, con un promedio del 20.9%. Los datos se analizaron con BIOSYS-1 [D. L. Swofford y R. B. Selander, *J. Hered.* 72, 281 (1981)].

14. El ADN genómico se extrajo de camarones individuales y en la mayoría de las especies, una región 681-pn (pares de nucleótido) fue amplificada por la reacción en cadena de la polimerasa y los iniciadores COI **a** y **f** del ADNmt [S. Palumbi y otros, *The Simple Fool's Guide to PCR* (Department of Zoology, University of Hawaii, Honolulu, 1991)]. Una región 640-pn de las especies P1, C1, P2, C3 y P7 se amplificó con un iniciador específico para *Alpheus* (H7188 5'-CATTAG-GCCTAA-GAAGTGTG-3') con COI **f** y una región 511-pn de la especie C2 se amplificó con dos iniciadores específicos para *Alpheus* (H7083 5'-AATARGGG-GAATCACTGGGCAAT-3' y L6595 5'-TATAT-CAACACTTATTTTGATT-3'). Se hizo la secuencia del trenzado ligero y del pesado, del ADNmt, en experimentos separados, luego de una digestión de exonucleasa del producto de la amplificación de la doble trenza o con métodos de secuenciación de doble trenzado. Se hizo la secuencia de dos individuos de cada uno de los 17 taxones, que produjeron cuatro valores de divergencia para cada par de taxones. En promedio, el 76% de las secuencias analizadas fueron comprobadas por el traslape de los trenzados ligeros y pesados.
15. Observamos el comportamiento de un macho y de una hembra colocados en una vasija con un pequeño resguardo durante 30 minutos y registramos dos medidas de tolerancia (número de contactos pasivos, pareados versus separados, al final del período de observación) y dos medidas de intolerancia (número de ataques, número de contactos agresivos) [ver métodos en (16)]. Los machos y hembras eran de tamaño superior al tamaño mínimo reproductor, concordaban en tamaño y se usaron sólo una vez. Por cada par de taxones transísmicos emparetados efectuamos cuatro categorías de experimentos: dos intraoceánicos (macho caribeño + hembra caribeña, macho del Pacífico + hembra del Pacífico) y dos transísmicos (macho caribeño + hembra del Pacífico, hembra caribeña + macho del Pacífico). Se utilizaron las réplicas de cada uno (en general de tres a cuatro) para calcular el porcentaje de pruebas que resultaron en parejas, número promedio de ataques, contactos agresivos y contactos pasivos por prueba. Con estos datos, se calcularon los valores promedios intraoceánicos y transísmicos para cada una de las cuatro medidas de comportamiento. Calibramos encuentros transísmicos con encuentros intraoceánicos de los mismos taxones, dividiendo el uno por el otro (valores transísmicos divididos por valores intraoceánicos para interacciones de tolerancia, intraoceánicos divididos por transísmicos para interacciones de intolerancia), así que, mientras mayor fuera el valor, mayor sería la compatibilidad de comportamiento transísmico en relación con los controles intraoceánicos.
16. B. A. Nolan and M. Salmon, *Forma Function* 2, 289 (1970); N. Knowlton and B. D. Keller, *Behav. Ecol. Sociobiol.* 10, 289 (1982); *Bull. Mar. Sci.* 37, 893 (1985).
17. M. Nei, *Genetics* 89, 583 (1978); M. Kimura, *J. Mol. Evol.* 16, 111 (1980).
18. D. L. Swofford PAUP, Phylogenetic Analysis Using Parsimony, version 3.1; (Illinois Natural History Survey, Champaign, IL 1993).
19. El promedio de los porcentajes con sitios degenerados cuatro veces con las transversiones fueron 7.2 (P1-C1), 4.2 (P2-C2), 3.6 (P3-C3), 3.0 (P4-C4), 10.1 (P5-C5), 10.6 (P6-C6) y 26.9 (P7-C7).
20. Si las diferencias de tamaño histórico de las poblaciones fueran causantes de la variación concordante en la divergencia, entonces los pares más divergentes deberían mostrar la menor heterocigocidad [M. Nei, T. Maruyama, R. Chakraborty, *Evolution* 29,1 (1975); R. Chakraborty y M. Nei, *ibid.*, 31, 347 (1977)]. El promedio de los valores de la heterocigocidad variaron de 0.016 a 0.080 (observados) y de 0.015 a 0.125 (Hardy-Weinberg, esperados). No hubo relación entre la heterocigocidad (del Caribe o del Pacífico, valores mínimos, máximos o promedios) y cualquier medida de divergencia [para las correlaciones de rango de Spearman, los valores *P* en todo el cuadro son no significativos en la prueba secuencial de Bonferroni (28); los únicos dos valores individualmente significativos, mostraron una correlación en la dirección contraria a la esperada]. Igualmente, si las diferencias en el tiempo de generación produjeron el patrón de concordancia, entonces los taxones de menor tamaño deberían mostrar la mayor divergencia, debido a una correlación positiva entre el tamaño del cuerpo y el tiempo de generación [R. H. Peters, *The Ecological Implications of Body Size* (Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1983), p. 132] y una correlación negativa entre el tiempo de generación y la tasa de cambio evolutivo (9). Los datos publicados sobre la longitud máxima del caparazón varían entre 6.1 y 15.1 mm, para las especies del Pacífico (10). No hay correlación entre el tamaño máximo y ninguna otra medida de divergencia (en las correlaciones de rango de Spearman, todos los valores *P* son > 0.6).
21. Se usaron las medianas del promedio de divergencia del ADNmt y las distancias Nei (Cuadro 1) para los cuatro pares. Estas calibraciones suponen una relación lineal entre el tiempo y la divergencia para los intervalos sobre los que se calculan o aplican. Estos muestran amplia concordancia con estudios anteriores (3,4,8), aunque los sistemas enzimáticos y las regiones del ADNmt no son equivalentes.
22. J. B. C. Jackson, P. Jung, A.G. Coates, L. S. Collins, *Science* 260, 1624 (1993). Este estudio también muestra variaciones en el tiempo de divergencia comparables a las de *Alpheus*.
23. L. S. Collins, *Paleontol. Soc. Spec. Pub.* 6, 67 (1992).
24. Los valores de los promedios porcentuales corregidos de las secuencias de divergencia para miembros simpátricos de conjuntos de especies hermanas son: 8.1 (P1-P2), 16.4 (C1-C2), 12.1 (C3-C3'), 7.6 (P6-P6') y 6.3 (P7-P7'). Los valores *D*, de Nei, son 0.109 (P1-P2), 0.194 (C1-C2), 0.165 (C3-C3'), 0.216 (P6-P6') y 0.019 (P7-P7').
25. Las diferencias de los hábitats son más evidentes en el Pacífico [P. W. Glynn, *Bull. Biol. Soc. Wash.* 2, 13 (1972)]. La especie P7 se captura normalmente en aguas someras submareales de islas cercanas en corales muertos, la especie P6 sólo se captura durante las mareas bajas extremas (-60 a -85 cm) y la especie P5 está en medio de intermareales, pero restringida a las aguas más claras de las islas cercanas. En contraste, las especies P1, P2, P3 y P4 son abundantes en la zona intermareal mediana y baja a lo largo de la costa.
26. Las habilidades de natación de las larvas de los crustáceos, les permite una amplia elección de hábitats [R. S. Burton y M. W. Feldman, en *Estuarine Comparisons* V. S. Kennedy, Ed. (Academic Press, New York, 1982), pp. 537-551] y la distribución de las larvas en la columna de agua puede reflejar distribuciones de profundidad de adultos de aguas someras [R. K. Grosberg, *Ecology* 63, 894 (1982)].
27. J. A. Coyne and H. A. Orr, *Evolution* 43, 362 (1989).
28. W. R. Rice, *ibid.*, p. 223.