

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Doctorado en Ciencias
en Ecología Marina**

**Influencia del comportamiento reproductivo en la distribución
de la variabilidad genética en la guitarra rayada, *Zaptryx
exasperata* en el Pacífico mexicano**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Doctor en Ciencias

Presenta:

Ana Yonory Castillo Páez

Ensenada, Baja California, México
2017

Tesis defendida por

Ana Yonory Castillo Páez

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Axayácatl Rocha Olivares
Director de tesis

Dr. Oscar Sosa Nishizaki

Dr. Miguel Ángel del Río Portilla

Dr. Felipe Galván Magaña

Dr. Jonathan Rubén Sandoval Castillo



Dra. María Lucía del Carmen Lares Reyes
Coordinadora del Posgrado en Ecología Marina

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Ana Yonory Castillo Páez © 2017

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Ana Yonory Castillo Páez** como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en Ecología Marina

Influencia del comportamiento reproductivo en la distribución de la variabilidad genética en la guitarra rayada, *Zapteryx exasperata* en el Pacífico mexicano

Resumen aprobado por:

Dr. Axayácatl Rocha Olivares
Director de tesis

La identificación de las barreras físicas y biológicas que producen una heterogeneidad en la distribución de la variabilidad genética es relevante para comprender los mecanismos de conectividad y diferenciación poblacional. El objetivo principal de este trabajo fue evaluar si los comportamientos reproductivos, como la paternidad múltiple y la filopatría reproductiva femenina, actúan como barreras biológicas y contribuyen en la diferenciación poblacional que la guitarra rayada *Zapteryx exasperata* presenta en el norte del Pacífico mexicano. Para esto, se caracterizaron e identificaron marcadores moleculares polimórficos tanto de herencia matrilineal (ADN mitocondrial), como biparental (microsatélites nucleares) y fueron utilizados en análisis filogenéticos, filogeográficos, de estructura poblacional y de paternidad. En primera instancia, se encontró que la guitarra rayada se ha identificado erróneamente, puesto que el carácter diagnóstico más conspicuo (coloración) que distingue a las especies del género es plástico. Se identificaron tres poblaciones diferenciadas genéticamente, una en Sonora, otra en Sinaloa y una más en la costa occidental de Baja California. Si bien existió una marcada estructura poblacional matrilineal, los análisis estadísticos no detectaron filopatría reproductiva femenina. Sin embargo, si se encontró paternidad múltiple y aislamiento por distancia. Estos resultados son relevantes para la conservación de la guitarra rayada, puesto que la especie está sujeta a una elevada mortalidad por pesca y pueden ser la base para el diseño de políticas para el manejo de este batoideo y especies con historias de vida e intervalos de distribución similares. Las normativas oficiales mexicanas para la pesca responsable de este grupo de peces, deberían de considerar las características biológicas intrínsecas de cada especie como las evaluadas en este estudio, para un manejo pesquero adecuado.

Palabras clave: Género *Zapteryx*, marcadores moleculares, filogenia, diferenciación poblacional, sistemas de apareamiento

Abstract of the thesis presented by **Ana Yonory Castillo Páez** as a partial requirement to obtain the Doctor of Science degree in Marine Ecology

Influence of the reproductive behavior in the distribution of genetic variability of banded guitarfish, *Zapteryx exasperata* in the Mexican Pacific

Abstract approved by:

Dr. Axayácatl Rocha Olivares
Thesis Director

Identifying the physical and biological barriers that produce heterogeneity in the distribution of genetic variability is relevant to understand the mechanisms of connectivity and population differentiation. The main goal of this study was to determine if reproductive behaviors such as multiple paternity and female reproductive philopatry act as biological barriers and contribute to the population differentiation that the banded guitarfish *Zapteryx exasperata* presents in the northern Mexican Pacific. To do this, I identified and characterized both matrilineal (mitochondrial DNA) and bi-parental (nuclear microsatellites) inherited polymorphic genetic markers, which were used in phylogenetic, phylogeographic, population structure and paternity analyses. I found that the banded guitarfish has been misidentified because the most conspicuous diagnostic character (coloration) appears to be plastic in species of the genus *Zapteryx*. Three genetically differentiated populations were identified in Sonora, Sinaloa and one in the western coast of Baja California. Although there was a strong matrilineal population structure, statistical analyses did not detect female reproductive philopatry; however, multiple paternity and isolation by distance were documented. These results are relevant for the conservation of the banded guitarfish because of its high fishing mortality, as they can be the basis for the design of management policies of this batoid and of other species with similar life histories and distribution ranges. Mexican official regulations for responsible fishing of batoids should take into consideration species-specific intrinsic characteristics such as the ones analyzed here.

Keywords: Genus *Zapteryx*, molecular markers, phylogeny, population differentiation, mating systems

Dedicatoria

*Este gran esfuerzo va dedicado a mis dos motores,
mis padres,
Leonel Edulfo Castillo y María Ana Yibe Páez*

Agradecimientos

Le agradezco al CICESE por haberme aceptado en su posgrado de Ecología Marina.

Al CONACyT por otórgame la beca para poder llevar acabo mis estudios de doctorado (1212918).

Al posgrado en Ecología Marina por el apoyo económico en los últimos seis meses del doctorado.

A UC MEXUS-CICESE por el apoyo financiero para realizar una estancia en la Universidad de California sede Santa Cruz.

A los miembros del laboratorio de Molecular Ecology de la NOAA-Santa Cruz y en especial al Dr. John Carlos Garza, por haberme permitido realizar en su laboratorio parte de mi tesis doctoral, muchas gracias por esa magnífica oportunidad y por su apoyo constante.

A los miembros del comité de tesis, muchísimas gracias por el apoyo incondicional y constante, sin duda sus aportaciones fueron valiosas tanto para mi formación académica y para que este proyecto llegara a su fin.

Al Dr. Axa, muchas gracias por haberme aceptado en su grupo de laboratorio, son siete años de trabajo duro pero hoy reconozco que valieron la pena. Le agradezco porque no solo me formo académicamente sino también como persona, muchas cosas he aprendido de usted y espero seguir haciéndolo. Gracias por confiar en mí.

A Dr. Erick Oñate, Omar Santana y Francesco Cicala por haberme acompañado en las salidas de campo y ayudarme a coleccionar material biológico.

A Dr. Felipe Galván, Dra. María del Pilar Blanco, Dr. Jonathan Sandoval, Dr. Javier Tovar, Dr. David Corro, Dra. Nancy Saavedra, Carmina y Agustín por proporcionar tejido muscular de *Zapteryx exasperata*.

A todos mis compañeros de laboratorio de Ecología Molecular por las cervezas, las partidas de juegos de mesa, sobre todo por la ayuda incondicional y claro está por las discusiones de temas de interés.

A mis amigos, cada uno de ustedes sabe que los llevo en mi corazón, gracias por los ratos de convivio con café, vino, cerveza, comida, esos momentos ayudaron a que mi estancia en Ensenada y a que la culminación de este proyecto fuera más llevadera.

Por último a mi hermosa familia, sé que tantos años de lejanía valen la pena, los quiero y los llevo en mi corazón, todos los días los pienso y les deseo lo mejor. Los amo.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	x
Lista de tablas.....	xii
Lista de anexos	xiii
Capítulo 1. Introducción general.....	1
1.1 Sistemas de apareamiento y filopatría.....	1
1.2 Estructura y conectividad poblacional	4
1.3 Biología y distribución de <i>Zapteryx exasperata</i>	5
1.4 Justificación	7
1.5 Pregunta de investigación	8
1.6 Hipótesis.....	8
1.7 Objetivos	9
1.7.1 Objetivo general	9
1.7.2. Objetivos específicos	9
Capítulo 2. Caracterización del genoma mitocondrial y loci microsatelitales en <i>Zapteryx exasperata</i> a través de la secuenciación de siguiente generación	10
2.1 Introducción	10
2.2 Metodología	11
2.2.1 Obtención del material biológico	11
2.2.2 Extracción de ADN genómico	11
2.2.3 NGS y ensamblaje de novo	11
2.2.4 Identificación, diseño y selección de microsatélites candidatos	12
2.2.5 Amplificación y genotipificación de los microsatélites candidatos	13
2.2.6 Anotación del genoma mitocondrial	13

2.3 Resultados	14
2.3.1 La diversidad alélica en la guitarra rayada es extremadamente baja.....	14
2.3.2 El mitogenoma de la guitarra rayada presenta una segunda región no codificante.....	17
2.4 Discusión	20
2.4.1 La diversidad alélica en la guitarra rayada.....	20
2.4.2 El mitogenoma de la guitarra rayada es similar a otros elasmobranquios.....	21
2.5 Publicaciones.....	24
Capítulo 3. Patrones morfológicos, moleculares y biogeográficos del género <i>Zapteryx</i> (pez guitarra) del Pacífico mexicano.....	25
3.1 Introducción	25
3.2. Materiales y métodos	27
3.2.1 Muestreo	27
3.2.2 Extracción de ADN genómico	28
3.2.3 Amplificación y secuenciación	28
3.2.4 Análisis de secuencias.....	29
3.2.5 Análisis filogenéticos	29
3.3 Resultados.....	30
3.3.1 Identificación morfológica	30
3.3.2 Patrones de variación genética	31
3.3.3 Evidencia de plasticidad fenotípica	31
3.3.4 Más de un linaje de <i>Zapteryx</i> en el Pacífico mexicano	34
3.4 Discusión	36
3.4.1 Polimorfismo de color en <i>Zapteryx exasperata</i>	37
3.4.2 Linajes genéticos de <i>Zapteryx</i> en el Pacífico mexicano	38
3.4.3 Implicaciones taxonómicas.....	40
3.5 Publicaciones.....	41
Capítulo 4. Patrones complejos de estructura poblacional de la guitarra rayada <i>Zapteryx exasperata</i> en el norte del Pacífico mexicano	42
4.1 Introducción	42
4.2 Metodología.....	44

4.2.1 Muestreo	44
4.2.2 Extracción de ADN genómico y amplificación de genes de interés	45
4.2.3 Caracterización de la diversidad en genes mitocondriales y nucleares.....	46
4.2.4 Estructura y flujo genético poblacional.	47
4.2.5 Patrones filogeográficos	48
4.2.6 Sesgo en la dispersión de los sexos	48
4.2.7 Aislamiento por distancia	49
4.3 Resultados.....	49
4.3.1 Heterogeneidad en la distribución de variabilidad del ADN mitocondrial.	49
4.3.2 Baja variabilidad genética en el ADN nuclear.	51
4.3.3 Patrones de diferenciación poblacional de <i>Z. exasperata</i> en el Norte del Pacífico mexicano.	56
4.3.4 Conectividad poblacional de <i>Z. exasperata</i> en el Norte del Pacífico mexicano.	58
4.3.5 Patrones filogeográficos de <i>Z. exasperata</i> en el Norte del Pacífico mexicano.	59
4.3.6 La dispersión de machos y hembras no difiere.	62
4.3.7 Aislamiento por distancia	63
4.4 Discusión	63
4.4.1 La baja diversidad del genoma de la guitarra rayada	64
4.4.2 Poblaciones alopátricas en ambas costas de la Península de Baja California	66
4.4.3 La población de Sinaloa es morfológica y genéticamente diferenciada.....	67
4.4.4 Variabilidad fenotípica de la guitarra rayada	69
4.4.5 Implicaciones para la conservación	70
Capítulo 5. Primera evidencia de paternidad múltiple en un batoideo vivíparo.	71
5.1 Introducción	71
5.2 Metodología.....	74
5.2.1 Obtención de camadas y extracción de ADN.....	74
5.2.2 Estimación genética de paternidad múltiple	74
5.3 Resultados.....	75
5.4 Discusión	76
Capítulo 6. Discusión general y conclusión.....	81

Literatura citada.....	84
Anexos.....	96
Glosario.....	106

Lista de figuras

Figura	Página
1 Representación circular de la organización del mitogenoma de <i>Z. exasperata</i> . Los colores representan los diferentes tipos de genes. El sentido de las flechas indican la orientación de los genes y la ubicación de las flechas (arriba o abajo) depende de la hebra en donde se encuentra el gen ya sea en la pesada o ligera.	19
2 Ubicación de las cuatro repeticiones en tándem encontradas en la segunda región no codificante en el mitogenoma de <i>Z. exasperata</i> . Los números indican la posición de la base en relación a todo el genoma.	20
3 Morfotipos de los peces guitarras del género <i>Zapteryx</i> . a) <i>Z. exasperata</i> del Estero del Soldado, Sonora y b) <i>Z. xyster</i> de Sinaloa. Nótese la presencia de ocelos en la superficie dorsal de <i>Z. xyster</i> (flechas rojas). L, longitud del disco; W, ancho del disco. Un tercer morfotipo se encontró en muestras de Oaxaca (n = 5), pero no hay registro fotográfico disponible (ver texto para más detalles).	30
4 Frecuencia de los haplotipos (ND2, RNC) y alelos (RAG1) en el pez guitarra del género <i>Zapteryx</i> del Pacífico Mexicano. (En paréntesis el tamaño de la muestra; PSC, Puerto San Carlos; PC, Punta Canoas; PSM, Punta Santa María; LM, Laguna Manuela; SI, San Ignacio; BM, Bahía Magdalena; SF, San Felipe; AB, Bahía los Ángeles; MU, Mulegá, LP, La Paz; BK, Bahía Kino; ES, Estero El Soldado; SN, Sinaloa; OA, Oaxaca; PCBC, Costa Pacífica de Baja California; GC, Golfo de California; CP, Pacífico Central; GT, Golfo de Tehuantepec).	33
5 Reconstrucción filogenética bayesiana de genes mitocondriales concatenados (ND2, RC y RNC) de los peces guitarra del género <i>Zapteryx</i> del Pacífico mexicano. Los nodos son soportados con probabilidades posteriores. Morfotipos: 1 sin ocelos dorsales, 2 con ocelos dorsales, 3 nuevo morfotipo no descritos con manchas dorsales y el disco más largo que ancho.	35
6 Reconstrucción filogenética bayesiana de alelos RAG1 de los peces guitarra del género <i>Zapteryx</i> del Pacífico mexicano. Los nodos son soportados con probabilidades posteriores. Morfotipos: 1 sin ocelos dorsales, 2 con ocelos dorsales, 3 nuevo morfotipo no descritos con manchas dorsales y el disco más largo que ancho.	36
7 Distribución haplotípica de loci mitocondriales (ND2, RNC y CAT - concatenación de ND2, RC y RNC) y del gen nuclear RAG1 de <i>Z. exasperata</i> . El color blanco representa haplotipos privados para la localidad. Datos individuales de RC no se muestran.	50

- 8 Asignación individual a cada población ($K=2$) asumiendo una frecuencia alélica independiente, PC, Punta Canoas; BV, Bahía Vizcaíno; SI, San Ignacio; NG, Noroeste del Golfo de California; SG, Suroeste del Golfo de California; SO, Sonora; SN, Sinaloa..... 57
- 9 Flujo genético histórico de *Z. exasperata* estimado a partir de marcadores moleculares. CPBC, Costa del Pacífico de Baja California; COGC, Costa Oeste Golfo de California; SO, Sonora; SN, Sinaloa; ADNmt_{-CAT}, concatenación de tres genes mitocondriales ND2, RC y RNC. Las flechas indican la dirección del flujo genético son proporcionales al número de migrantes por generación ($N_e m$). El tamaño de los círculos es proporcional al estimador del tamaño efectivo poblacional (Θ). 58
- 10 Árbol filogenético bayesiano enraizado de los cincuenta haplotipos generados de la concatenación de tres genes mitocondriales. NG, Noroeste del Golfo de California; SO, Sonora; SN, Sinaloa; SG, Suroeste; SI, San Ignacio; PC, Punta Canoas; BV, Bahía Vizcaíno. 60
- 11 Red haplotípica de parsimonia estadística (TCS) del ADNmt concatenado de *Zaptryx exasperata*. El tamaño de los círculos representa la frecuencia haplotípica, los colores la localidad de procedencia, los círculos grises son haplotipos que faltan y las líneas representan un paso mutacional. NG, Noroeste del Golfo de California; SO, Sonora; SN, Sinaloa; SG, Suroeste; SI, San Ignacio; PC, Punta Canoas; BV, Bahía Vizcaíno. 61
- 12 Dendrograma radial no enraizado del vecino más cercano (neighbor-joining) de microsatélites representando las relación y las distancias genéticas de las localidades muestreadas. Se muestran valores de bootstrap >50 %. R^2 de 0.998 del método de Nei (1987, Da). NG, Noroeste del Golfo de California; SO, Sonora; SN, Sinaloa; SG, Suroeste; SI, San Ignacio; PC, Punta Canoas; BV, Bahía Vizcaíno. 61
- 13 Prueba de Mantel. a) distancia genética del ADN mitocondrial y b) Distancia genética del ADN nuclear..... 63

Lista de tablas

Tabla	Página
1 Caracterización de 22 microsatélites polimórficos en <i>Z. exasperata</i>	15
2 Características de los genes mitocondriales de <i>Z. exasperata</i>	18
3 Tamaño y contenido de Guanina-Citosina de genomas mitocondriales de 35 especies de batoideos.....	23
4 Localidades de muestreo del pez guitarra del género <i>Zapteryx</i> spp.....	27
5 Cebadores mitocondriales y nucleares utilizados para amplificación.....	29
6 Variabilidad y distancia genética (%) de genes mitocondriales y nucleares de los peces guitarra del género <i>Zapteryx</i>	31
7 Localidades de muestreo de tejido muscular de <i>Z. exasperata</i>	45
8 Lista de cebadores utilizados para la amplificación de loci mitocondriales y nucleares.....	46
9 Diversidad genética de <i>Z. exasperata</i> del ADN mitocondrial (CAT - ND2, RC y RNC) y para el gen nuclear RAG1.....	51
10 Diversidad genética poblacional para el gen RAG1.....	52
11 Variabilidad genética de <i>Z. exasperata</i> en siete localidades.....	54
12 Análisis de varianza molecular (AMOVA) en siete localidades del norte del Pacífico mexicano para <i>Z. exasperata</i> basados en tres genes del ADN mitocondrial concatenados, un gen nuclear y 13 microsatélites.	57
13 Comparaciones pareadas de Φ_{ST-CAT} de ADNmt (encima de la diagonal) y R_{ST} de microsatélites (debajo de la diagonal) de <i>Z. exasperata</i>	57
14 Valores de F_{ST} pareados del ADN mitocondrial concatenado y de los microsatélites.....	62
15 Valores de la prueba de sesgo en la dispersión de los sexos de <i>Z. exasperata</i> basados en marcadores biparentales, microsatélites.	63
16 Características de 12 camadas de <i>Z. exasperata</i> y el número mínimo de padres que las engendraron.....	75
17 Probabilidad de detectar paternidad múltiple basada en la frecuencia alélica y el sesgo en el éxito reproductivo	76

Lista de anexos

Anexo		Página
A	Frecuencias alélicas de cada locus en cada población	96
B	Sitios variables de la región control (RC) para el género <i>Zapteryx</i> en el Pacífico mexicano (los sitios fijos están sombreados)	97
C	Sitios variables del gen NADH deshidrogenasa subunidad 2 (ND2) para el género <i>Zapteryx</i> en el Pacífico mexicano (los sitios fijos están sombreados)	98
D	Sitios variables de la región remanente de duplicación no codificante (RNC) para el género <i>Zapteryx</i> del Pacífico Mexicano (los sitios fijos están sombreados)	99
E	Sitios variables del gen RAG1 para el género <i>Zapteryx</i>	102
F	Tamaño alélico de 12 camadas de <i>Z. exasperata</i> (la madre de cada camada está sombreada)	103
G	Frecuencia alélica global de 7 microsatélites utilizados para la detección de paternidad múltiple de <i>Z. exasperata</i> (PIC, índice de contenido polimórfico)	105

Capítulo 1. Introducción general

El estudio del comportamiento reproductivo se centra en los eventos y acciones que están directamente involucrados en el proceso por el cual un organismo genera al menos un descendiente. Incluye varias áreas de investigación que tratan de entender el sesgo en la proporción de sexos de la descendencia, el parasitismo de los nidos, el cuidado parental, el cortejo, los sistemas de apareamiento y la filopatría (Emlen y Oring, 1977). Recientemente, los marcadores moleculares se han utilizado para estudiar las conductas reproductivas particularmente en especies donde la observación directa es difícil o imposible de llevar a cabo (Freeland et al., 2011).

Un marcador molecular es un fragmento de ADN, ARN o proteína que está asociado a una ubicación determinada dentro del genoma. El ADN mitocondrial es haploide (cada mitocondria posee múltiples copias de un mismo cromosoma circular), no se recombina y se hereda matrilinealmente en la mayoría de las especies (a excepción de algunos moluscos) y típicamente se presenta en estado clonal como una sola secuencia o haplotipo por individuo (homoplasmia). Debido a estas características y a que posee regiones con bajas y altas tasas evolutivas, el ADN mitocondrial es útil para estudiar procesos macroevolutivos, como la reconstrucción filogenética y microevolutivos, como la diferenciación poblacional. El ADN nuclear a diferencia del ADN mitocondrial presenta recombinación y tiene información genética de ambos padres, dado que es de herencia biparental. Los microsatélites son secuencias de ADN en las que un fragmento (de uno a seis pares de bases) se repiten de manera consecutiva, se encuentran en regiones codificantes y no codificantes de los genomas eucariotas, son altamente polimórficos, se segregan de manera mendeliana, son codominantes y se piensa que la mayoría son selectivamente neutros, por dichas características han sido fundamentalmente utilizados para estudios de estructura poblacional y parentesco (Rentería, 2007).

1.1 Sistemas de apareamiento y filopatría

Los análisis de paternidad permiten corroborar o determinar el sistema de apareamiento de una especie, a partir de la información genética que se obtiene de la camada de una hembra (Parker et al., 1998; Freeland et al., 2011). Una especie monógama se denomina cuando en un ciclo reproductivo un individuo se aparea exclusivamente con su pareja, mientras que una especie polígama un individuo puede tener varias parejas en la misma época reproductiva. Por ejemplo, en un sistema de

apareamiento poliándrico la hembra se aparee con varios machos en la misma temporada de reproducción (Emlen y Oring, 1977). La paternidad múltiple derivada del comportamiento poliándrico puede tener ciertas ventajas adaptativas tales como incrementar la probabilidad de compatibilidad genética, “seleccionar los mejores genes” y elevar la diversidad genética de la camada; de esta manera, la hembra aumenta la probabilidad de que al menos uno hijo de la camada sobreviva a las condiciones ambientales (Zeh y Zeh, 1997; DiBattista et al., 2008). A nivel poblacional, la paternidad múltiple puede reducir el tamaño efectivo poblacional y la diversidad genética, cuando existe una mayor variación en el éxito reproductivo de los machos, debido a que no todos contribuyen con el mismo número de crías (Karl, 2008). Como consecuencia de la reducción en el tamaño efectivo poblacional, aumentan tanto la deriva génica, como la probabilidad de que las poblaciones se diferencien.

La paternidad múltiple ha sido descrita en diferentes taxones, por ejemplo, el análisis de 70 nidos la tortuga caguama (*Careta careta*), en Melbourne Beach, Florida, reveló que 22 nidos fueron fecundados por más de un padre, incluso seis de estos fueron engendrados por más de dos. Moore y Ball Jr. (2002) argumentan que la paternidad múltiple de esta especie tiene ventajas sobre la población. Si la proporción de sexos está sesgada, las hembras pueden aparearse con el primer macho que encuentren para garantizar la fecundación, pero pueden aumentar la fertilización e incluso evitar la incompatibilidad genética apareándose con otros machos, además de que la diversidad genética de la camada se eleva. Sin embargo, en el pez vivíparo *Heterandria formosa* la paternidad múltiple tiene tanto costos como beneficios para la población. Además de evitar la incompatibilidad genética, las hembras que se aparean con más de un macho aumentan la probabilidad de fertilización. No obstante, los individuos de una camada con paternidad múltiple tardan más tiempo en alcanzar la madurez sexual en comparación con las crías de una camada engendrada por solo un padre lo que implica un costo de la poliandria (Ala-Honkola et al., 2011).

En los elasmobranquios la poliandria se ha estudiado en varias especies. Los batoideos *Raja clavata* y *Aetobatus narinari* presentan paternidad múltiple; por su parte, *R. clavata* es el elasmobranquio más promiscuo, puesto que todas las camadas analizadas presentaban más de un padre (Chevolot et al., 2007; Janse et al., 2013). En los tiburones este fenómeno ha sido más investigado en comparación con los batoideos (únicamente dos estudios). Sin embargo, no se saben los beneficios que tienen las hembras al aparearse con más de un macho. Se ha propuesto que la poliandria reduce la aptitud de la hembra, puesto que la copula es agresiva, los machos sujetan a las hembras con la boca ocasionándoles mordidas, heridas, hematomas, infecciones en la cavidad vaginal, lo que les ocasiona una pérdida de energía (DiBattista et al., 2008; Byrne y Avise, 2012). En el tiburón limón, *Negaprion brevirostris*, no se

encontraron beneficios en la descendencia, puesto que las camadas poliándricas no tuvieron una mayor supervivencia ni diversidad genética al compararlas con camadas monoándricas (DiBattista et al., 2008).

La filopatría se define como la tendencia de un individuo a permanecer o regresar a su área de nacimiento o localidad adoptada (Greenwood, 1980). Existen dos tipos de filopatría, la natal y la reproductiva. La filopatría natal se refiere a la tendencia de un individuo de permanecer o volver al lugar exacto de nacimiento para reproducirse o desovar. Este es el caso de los salmónidos del Pacífico (*Oncorhynchus* spp.) que nacen en un río determinado, migran al océano hasta alcanzar su madurez sexual y posteriormente ambos sexos regresan al lugar donde nacieron para reproducirse (Dittman y Quinn, 1996). Este comportamiento también ha sido recientemente encontrado en condriictios, seis hembras del tiburón limón regresaron a parir (14 – 17) al mismo lugar donde nacieron en Bimini, Bahamas (Feldheim et al., 2014).

La filopatría reproductiva se refiere al retorno de un animal al sitio de previa reproducción para intentar reproducirse nuevamente (Hueter et al., 2005). Puede ser que uno de los dos sexos sea más filopátrico que el otro. Por ejemplo, la filopatría reproductiva femenina es el comportamiento que involucra la utilización de una misma área de crianza o reproducción en épocas reproductivas consecutivas por parte de las hembras (Greenwood, 1980; Tillett et al., 2012b). Una especie con una distribución continua, pero que se segrega geográficamente para reproducirse, puede tener grupos reproductivos genéticamente diferenciados (Chesser, 1991). Si las hembras utilizan la misma área de crianza, pero se aparean con machos que visitan varias áreas de crianza, los marcadores nucleares permanecerán homogéneos entre regiones, mientras que los marcadores mitocondriales divergirán entre dichas áreas (Hueter et al., 2005; Portnoy y Heist, 2012).

Las hembras del cachalote *Physeter macrocephalus* son filopátricas y regresan a las cuencas oceánicas del Atlántico norte en la época reproductiva. Se encontró diferenciación genética en el ADN mitocondrial entre el Golfo de México, el Oeste del Atlántico Norte, el Mar Mediterráneo y el Mar del Norte, pero este patrón no se encontró con ADN nuclear, sugiriendo que los machos son responsables del flujo genético a escala oceánica entre los grupos sociales diferenciados matrilinealmente (Engelhaupt et al., 2009). En tiburones costeros este comportamiento también se ha descrito (ver Chapman et al., 2015); por ejemplo, *Galeocerdo cuvier* presenta diferenciación poblacional en el Atlántico Occidental con el ADN mitocondrial, pero no con el ADN nuclear. Una posible explicación a este patrón es que las hembras presentan filopatría reproductiva mientras que los machos se dispersan libremente por la cuenca

oceánica manteniendo el flujo genético (Bernard et al., 2016). No obstante, este comportamiento reproductivo no se ha investigado en batoideos (Flowers et al., 2016).

1.2 Estructura y conectividad poblacional

El conocimiento de la estructura genética poblacional permite identificar unidades reproductivamente aisladas e inferir los procesos responsables de los patrones de la diferenciación genética. Con ello es posible entender los procesos microevolutivos y aplicar dicho conocimiento al manejo de los recursos explotados. La diferenciación genética entre poblaciones puede deberse a la presencia de barreras físicas y biológicas y es el resultado de la interacción de varios procesos evolutivos como la mutación, la selección natural, la deriva génica y el flujo genético (Hellberg et al., 2002).

Tanto el flujo genético como el tamaño efectivo poblacional, son variables determinantes de los patrones de variación genética de las poblaciones (Hellberg et al., 2002; Dudgeon et al., 2012). Cuando el flujo genético entre las poblaciones es alto, éstas evolucionan juntas, a menos que sea contrarrestado por selección natural. Mientras que si el flujo genético es muy bajo, las poblaciones comienzan a divergir por efectos de la deriva génica y se aíslan reproductivamente generando linajes evolutivamente independientes (Hellberg et al., 2002). De manera general, cuando el flujo genético y el tamaño efectivo poblacional son pequeños, existen altas tasas de reclutamiento local, las poblaciones son cerradas y genéticamente diferenciadas. Por el contrario, cuando el flujo genético y el tamaño efectivo poblacional son altos, las poblaciones son abiertas y genéticamente homogéneas. Entre estos modelos extremos, las poblaciones pueden mostrar patrones de diferenciación intermedios, como el modelo de aislamiento por distancia, en el cual, entre más alejadas se encuentran las poblaciones más diferentes son (Hellberg et al., 2002).

Las especies pelágicas de elasmobranquios que presentan una alta movilidad y una amplia distribución, pueden migrar a través de cuencas oceánicas mediante el movimiento activo de sus juveniles y adultos. Estos movimientos han dado como resultado que individuos que habitan diferentes cuencas oceánicas no presenten una diferenciación poblacional, como es el caso del tiburón ballena *Rhincodon typus*, que habita en las cuencas del Pacífico e Índico (Castro et al., 2007). Por consiguiente, estas especies presentan una baja heterogeneidad genética en comparación con las especies de poca movilidad y sedentarias como el tiburón cebra *Stegotoma fasciatum* (Dudgeon et al., 2009). Las probabilidades de que ocurra un aislamiento reproductivo y como consecuencia, se produzca una especiación, es más

común en especies pequeñas, bentónicas, de poca movilidad y sedentarias (Duncan et al., 2006). Sin embargo, no todas las especies de elasmobranquios, se apegan a este patrón. Hay especies de gran tamaño y activas que presentan una heterogeneidad genética entre cuencas oceánicas, indicando que el océano abierto es una barrera física que impide la conectividad de las poblaciones, como en el tiburón martillo *Sphyrna lewini* que presenta diferenciación genética en la cuenca del Pacífico (Duncan et al. 2006).

Para utilizar eficazmente la información genética en la conservación de las especies se han utilizados dos términos. La Unidad Evolutivamente Significativa (ESU por sus siglas en inglés) que se define como el grupo de organismos o poblaciones que son recíprocamente monofiléticos en su ADNmt y que muestran una divergencia significativa en la frecuencia alélica en los loci nucleares. Y las Unidades de Manejo (MUs por sus siglas en inglés) son poblaciones con divergencia significativa de las frecuencias de los alelos en los loci nucleares o mitocondriales, independientemente del carácter distintivo filogenético de los alelos. Las ESU representan un componente importante del legado evolutivo de la especie, puesto que incorpora la necesidad de conservar su potencial evolutivo a largo plazo. Dicho legado está representado por la variabilidad genética intraespecífica. Mientras que las MUs se centran más en la estructura actual de la población, las frecuencias de los alelos y los problemas de gestión a corto plazo (Moritz, 1994).

1.3 Biología y distribución de *Zapteryx exasperata*

La guitarra rayada *Zapteryx exasperata* pertenece al grupo de rayas comúnmente conocidas como guitarras, calificativo que se le otorga por la forma de su cuerpo. El género *Zapteryx* proviene del griego y hace referencia a las aletas dorsales largas; *exasperata* es procedente del latín y significa rugoso o grueso por las numerosas espinas estrelladas que forman una fila en la mitad dorsal (Ebert, 2003).

La guitarra rayada se caracteriza por tener el disco rómbico más largo que ancho; el hocico tiene una longitud moderada y en la punta es romo; la cola es gruesa con un pliegue lateral estrecho y es más corta que el disco; ojos grandes y espiráculos pequeños situados en el dorso de la cabeza; la válvula nasal es amplia y se extiende entre las fosas nasales; la boca es amplia pero corta; los dientes son pequeños y carecen de filo; el lóbulo inferior de la aleta caudal se distingue claramente; y la primera aleta dorsal se origina más cerca de la base de las aletas pélvicas que del origen de la aleta caudal. La coloración dorsal es de tonalidades café arenoso y gris oscuro con varias manchas negras a manera de franjas transversales, en el borde posterior de las aletas pectorales se presentan manchas oscuras, la parte

delantera de la cabeza es principalmente negra y su espalda media está cubierta por una fila de espinas estrelladas gruesas e irregulares de diferentes tamaños (Jordan y Evermann, 1896; McEachran y Notarbartolo-Di-Sciara, 1995; Ebert, 2003).

Las guitarras rayadas que habitan la costa del Pacífico de Baja California (CPBC) son genéticamente diferentes de las de Sonora (Golfo de California) y el flujo genético matrilineal entre estas poblaciones es limitado (Castillo-Páez et al., 2014). Cada población tiene características intrínsecas, los individuos de Sonora son más pequeños que los de la CPBC (Castillo-Páez et al., 2014). Los machos de Sonora comienzan a madurar a los 50 cm de longitud total (LT) y son sexualmente maduros a los 68 cm de LT. Los machos de la CPBC son sexualmente maduros a los 69 cm de LT, pero no se sabe la talla a la que comienzan a madurar. Las hembras de la CPBC maduran a los 77 cm de LT, mientras que las de Sonora a los 64 cm de LT.

En las guitarras rayadas de la población de Sonora, la ovulación, cópula y fecundación ocurren inmediatamente después del parto, por lo que el ciclo ovárico y el periodo de gestación ocurren simultáneamente. Sin embargo, en la CPBC el ciclo ovárico y la gestación no coinciden. *Z. exasperata* presenta un par de órganos reproductores funcionales, las hembras un par de ovarios y úteros mientras que los machos un par de testículos. El modo de reproducción es vivíparo aplacentario con saco vitelino, pueden tener entre 2 y 13 crías por camada sin sesgo en la proporción de sexos. Las hembras son más grandes que los machos de una misma edad (Villavicencio-Garayzar, 1995; Blanco-Parra et al., 2009a).

En Sonora, la guitarra rayada es un depredador bentopelágico costero con hábitos de forrajeo nocturnos. Los machos y las hembras tienen dietas similares. Los juveniles se alimentan principalmente de pequeños crustáceos de la familia Penaeidae, mientras que los adultos se alimentan preferencialmente de peces demersales con una gran predominancia de *Porichthys margaritatus*, lo que indica un cambio en la dieta ontogenético (Blanco-Parra et al., 2012).

Los estudios de distribución sugieren que puede haber una segregación espacial por sexo, puesto que se han encontrado hembras o machos en congregaciones en aguas poco profundas de bahías y lagunas costeras de la CPBC (Bahía Almejas) en primavera e inicios de verano (Villavicencio-Garayzar, 1995; Ebert, 2003; Ramirez-Amaro et al., 2013). Sin embargo, en el Golfo de California (Sonora) no se han encontrado dichas agregaciones (Blanco-Parra et al., 2009a). La especie se encuentra con frecuencia en zonas cálidas y templadas con una cierta preferencia a arrecifes rocosos someros, pozas litorales y

esporádicamente en fondos arenosos, desde la zona del intermareal hasta 69 m de profundidad, pero se encuentra con más frecuencia entre 2.5 y 10 m de profundidad (Ebert, 2003).

No se conoce con certeza la distribución geográfica de la guitarra rayada. McEachran y Notarbartolo-Di-Sciara (1995) indican que se encuentra a lo largo del Pacífico Centro Oriental desde el sur de Estados Unidos hasta Perú. No obstante, Ebert (2003) pone en duda esta distribución e indica que posiblemente al sur de Mazatlán una especie hermana, *Z. xyster*, es confundida con *Z. exasperata*; por lo tanto, postula que *Z. exasperata* se distribuye desde el sur de California hasta Mazatlán y *Z. xyster* desde Mazatlán hasta Perú, siendo esta última una especie más tropical (Castro-Aguirre et al., 2011). Según Ebert (2003), las especies se diferencian principalmente por la coloración dorsal, ya que *Z. xyster* presenta cuatro ocelos amarillos, mientras que *Z. exasperata* carece de ellos.

1.4 Justificación

Zapteryx exasperata presenta una alta mortalidad por pesca en el norte del Pacífico mexicano. Por ejemplo, en el estado de Sonora es una de las especies más abundantes capturada en la pesquería artesanal de rayas o como fauna acompañante en la pesca de camarón. (Blanco-Parra et al., 2009b). En la CPBC la guitarra rayada es un componente importante en la pesquería artesanal tendiendo a ser capturada en grandes cantidades (principalmente en Laguna Manuela Cartamil et al., 2011; Ramirez-Amaro et al., 2013). La investigación en esta especie es escasa y por ello en la lista roja de especies amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza está catalogada como una especie con datos insuficientes (Bizzarro y Kyne, 2015).

La confusión taxonómica dentro del género *Zapteryx* en el Pacífico Oriental ha impedido esclarecer la delimitación de las especies, lo cual es indispensable para definir con claridad los rasgos de la historia de vida, las características ecológicas y el intervalo de distribución de *Z. exasperata*. La delimitación de las especies es importante en el contexto de procesos y mecanismos evolutivos, además de ser de relevancia para el manejo pesquero sostenible y la conservación de la biodiversidad (Mendonça et al., 2011).

Es necesario establecer los patrones de estructura poblacional y flujo genético de *Z. exasperata* para identificar unidades biológicas intraespecíficas genéticamente diferenciadas, así como para entender los procesos microevolutivos tales como la especiación. Al identificar dichas unidades se deben de tratar

cada una como una unidad evolutiva independiente para fines de manejo pesquero (Moritz, 1994), dado que presentan características intrínsecas diferentes y la conservación a largo plazo depende de que se conserve el legado genético de las especies (Lesica y Allendorf, 1995).

Conocer los comportamientos reproductivos, como el sistema de apareamiento y la filopatría reproductiva femenina, no solo es necesario para caracterizar la historia de vida y biología reproductiva de *Z. exasperata*, sino que además es de gran importancia para comprender su dinámica poblacional y su relación con la distribución de la diversidad genética. Además, esta información es elemental para la conservación y el manejo pesquero dado que su conocimiento permite definir áreas prioritarias para la conservación, así como tomar medidas precautorias para evitar perturbaciones ambientales o antropogénicas en los sitios de fidelidad o áreas de crianza esenciales para las poblaciones.

1.5 Pregunta de investigación

Básicamente este trabajo surge de la pregunta de si ¿los comportamientos reproductivos tales como la filopatría reproductiva femenina y la paternidad múltiple juegan un papel en la distribución de la variabilidad genética de *Z. exasperata* en el norte del Pacífico mexicano?

1.6 Hipótesis

1. Los peces guitarras del género *Zapteryx* del Pacífico mexicano que presentan ocelos amarillos en el dorso, pertenecen a la especie *Z. xyster* y organismos que carecen de ellos son de la especie *Z. exasperata*.
2. *Z. exasperata* tiene filopatría reproductiva femenina la cual contribuye con la heterogeneidad genética que la especie presenta en el norte del Pacífico mexicano.
3. La guitarra rayada tiene paternidad múltiple la cual favorece la diferenciación poblacional que presenta la especie en el norte del Pacífico mexicano.
4. A mayor distancia geográfica, mayor es la diferenciación genética entre dos poblaciones de *Z. exasperata* en norte del Pacífico mexicano.

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo general

Evaluar la existencia de filopatría reproductiva femenina y el sistema de apareamiento de *Z. exasperata* a través de los patrones de diversidad y diferenciación genética mediante el uso de marcadores nucleares y mitocondriales.

1.7.2. Objetivos específicos

1. Identificar, aislar y caracterizar marcadores moleculares polimórficos en *Z. exasperata*.
2. Evaluar el intervalo de distribución de *Z. exasperata* establecido para el Pacífico mexicano.
3. Estimar el grado de diferenciación genética y la magnitud y dirección del flujo genético entre localidades del Pacífico mexicano.
4. Establecer si *Z. exasperata* presenta evidencias de filopatría reproductiva femenina.
5. Determinar la frecuencia de paternidad múltiple.

Para contestar la pregunta principal de esta tesis, lo primero que se hizo fue identificar una serie de marcadores moleculares polimórficos de diferente forma de herencia (Objetivo 1), secuencias del ADNmt (Castillo-Páez et al., 2016) y microsatélites del ADN nuclear (Castillo-Páez et al., 2017a), puesto que no existen marcadores para la especie (ver capítulo 2). Una vez identificados los marcadores moleculares se utilizaron para ayudar a esclarecer las incertidumbres taxonómicas de la especie (Objetivo 2; capítulo 3; Castillo-Páez et al., 2017b). Y con los marcadores moleculares polimórficos e identificada la especie, contestamos la pregunta de si la filopatría reproductiva femenina (Objetivos 3 y 4, capítulo 4) y la paternidad múltiple (Objetivo 5, capítulo 5) actúan como barreras biológicas para la distribución de la variabilidad genética.

Capítulo 2. Caracterización del genoma mitocondrial y loci microsatelitales en *Zapteryx exasperata* a través de la secuenciación de siguiente generación

2.1 Introducción

Zapteryx exasperata es comúnmente conocida como la guitarra rayada. Este batoideo demersal se distribuye desde el sur de California hasta Perú, incluyendo el Golfo de California (GC; McEachran y Notarbartolo-Di-Sciara, 1995; Ebert, 2003). La guitarra rayada es un componente importante en la pesca artesanal de elasmobranquios en norte del Pacífico Mexicano. En Laguna Manuela, Baja California, es el segundo elasmobranquio capturado incidentalmente con la red agallera (Cartamil et al., 2011), mientras que en el estado de Sonora es una especie comercialmente importante en la pesquería artesanal de rayas (Blanco-Parra et al., 2009b). La información acerca de su biología y ecología es escasa, además los recursos genéticos son pocos (Castillo-Páez et al., 2014); en consecuencia, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza en la Lista Roja de Especies Amenazadas la cataloga como con “Datos Insuficientes” (Bizzarro y Kyne, 2015). Los análisis poblacionales han mostrado una fuerte diferenciación con el ADN mitocondrial entre las rayas guitarras del GC y las de la costa del Pacífico de Baja California (CPBC; Castillo-Páez et al., 2014). Sin embargo, no hay información genética nuclear disponible por la falta de marcadores moleculares (MM) útiles como los microsatélites.

Actualmente, el desarrollo de MM puede realizarse rápidamente y a bajo costo para la mayoría de las especies utilizando la secuenciación de siguiente generación (NGS, por sus siglas en inglés; Gardner et al., 2011). Esta tecnología no solo permite la identificación de loci nucleares potencialmente polimórficos sino que, además y en algunos casos permite la secuenciación del genoma mitocondrial (mitogenoma). La disponibilidad del mitogenoma y microsatélites puede ser útil en estudios de sistemática molecular, filogeografía, diferenciación genética, patrones de dispersión sexual, genética de la conservación, entre otros (Alam et al., 2014). En el presente trabajo se realizó un experimento de secuenciación genómica en la guitarra rayada mediante la NGS para: i) ensamblar y anotar el mitogenoma de *Z. exasperata* y ii) aislar y caracterizar un conjunto de microsatélites. La disponibilidad de los MM de diferente forma de herencia (es decir uniparental y biparental) permitirá alcanzar los objetivos propuestos así como contestar las preguntas científicas planteadas en esta tesis doctoral.

2.2 Metodología

2.2.1 Obtención del material biológico

Para la NGS se colectó un individuo de *Z. exasperata* en la pesquería artesanal de Bahía de Sebastián Vizcaíno (latitud 28°42' y longitud 114°08') en la CPBC. La raya se transportó en hielo seco para que evitar la degradación del ADN y mantenerla fresca hasta procesarla en el laboratorio. Para evaluar el nivel de polimorfismo de los microsátélites se colectaron 23 individuos en el Estero El Soldado (latitud 27°95' y longitud 110°96') estado de Sonora, en el GC. Las muestras fueron congeladas y posteriormente preservadas en etanol 95 %.

2.2.2 Extracción de ADN genómico

Para extraer el ADN genómico se utilizaron dos protocolos. La NGS requiere de ADN de alta calidad, por esta razón se extrajo con el kit *DNeasy Blood y Tissue Kit* (QIAGEN, Hilden, Germany) siguiendo el protocolo del fabricante. La extracción para evaluar el nivel de polimorfismo se realizó haciendo una digestión con *proteínasa K* seguido de un protocolo de precipitación salina con cloruro de litio (Gemmell y Akiyama, 1996). La cantidad del ADN se obtuvo mediante fluorescencia usando el *Qubit 2.0 fluorometer* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y la calidad se observó en geles de agarosa al 1.5 %.

2.2.3 NGS y ensamble *de novo*

Se envió a secuenciar ADN genómico de excelente calidad (50 μ l a una concentración de 484.9 ng/ μ l). Las bibliotecas de ADN y la NGS fueron hechas por el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO, Irapuato, México). Las bibliotecas fueron elaboradas usando *TruSeq Nano™*. La NGS fue realizada en la plataforma de Illumina *HiSeq 2500* en el formato de paired-end (2x100; permite la secuenciación de los dos extremos de la secuencia) usando 1/12 parte de línea.

Una vez obtenidas las secuencias lo primero que se realizó fue un control de calidad mediante los programas FastQC 0.10.1 (Babraham Institute, Cambridge, UK; Andrews, 2011) y CLC Genomic Workbench 7.0.3 (CLC Bio, Boston, MA; Knudsen et al., 2008). Las características que se evaluaron en las secuencias fueron: el porcentaje de Guanina y Citosina, el contenido de bases ambiguas, así como la sobrerrepresentación de las secuencias (indicando que la librería genómica esta sesgada o contaminada). Además, se realizó un análisis por base en el que se evaluó la contribución de cada nucleótido, la posición de las bases ambiguas, la sobrerrepresentación de los nucleótidos, entre otros. Posteriormente

se limpiaron las secuencias eliminando las bases de baja calidad, las bases ambiguas, las secuencias de mala calidad o las secuencias que presentaban muchas bases ambiguas. Para esto se utilizó el programa CLC Genomic Workbench 7.0.3 (CLC Bio, Boston, MA; Knudsen et al., 2008).

Una vez limpiadas las secuencias y seleccionadas aquellas que cumplían con las características de excelente calidad se procedió a hacer un ensamble *de novo*. Este consistió en agrupar las secuencias como si se tratara de un rompecabezas, de tal manera que se formó un agrupamiento al cual se le denomina *contig*. *Contig* viene de la palabra contiguo y según el National Human Genome Research Institute se define como la cadena de superposiciones de las secuencias de ADN que reconstruye una secuencia consenso, es decir la secuencia más probable de ADN original de un cromosoma o región de un genoma (<http://www.genome.gov/Glossary/index.cfm?id=39>). La cantidad de secuencias que se superponen en un *contig* se le conoce como profundidad, la cual es una característica importante para tener en cuenta al momento de diseñar los cebadores, esto se realizó en el programa CLC Genomics Workbench (Knudsen et al., 2008).

2.2.4 Identificación, diseño y selección de microsatélites candidatos

Se realizó una búsqueda de los motivos repetitivos en todos los *contigs* obtenidos del ensamble *de novo*. Esto se hizo en el programa Msatcommander (Faircloth, 2008) teniendo en cuenta los siguientes criterios: únicamente se buscaron microsatélites perfectos; con motivos de repetición di-, tri- y tetranucleótidos; y con un número mínimo de repeticiones de ocho, seis y cuatro respectivamente. En este mismo programa se diseñaron los cebadores para amplificar los microsatélites detectados. Se tomaron en cuenta los siguientes parámetros: que el tamaño esperado del amplicón fuera entre 150 y 450 pares de bases (pb); el tamaño del cebador entre 18 y 22 nucleótidos; la temperatura de anillamiento entre 52 y 60°C, con óptima de 55°C; y el contenido de Guanina-Citosina entre 35 y 70 %. Una vez identificados los microsatélites y diseñados los cebadores se procedió a escoger 107 loci candidatos. Se tomó en cuenta de que la profundidad de los *contigs* hubiera sido de al menos dos secuencias pareadas y que estas no presentaran muchas inserciones (inclusión de bases) o deleciones (pérdida de bases) o sustituciones (cambio de una base por otra). Una vez seleccionados los cebadores se enviaron a sintetizar, en el extremo 5' del cebador "forward" se adicionó una secuencia o cola constituida por el cebador universal M13, la cual consiste 18 nucleótidos que permiten la incorporación del fluoróforo, que es indispensable para poder observar en el electroferograma el tamaño de los alelos (Schuelke, 2000).

2.2.5 Amplificación y genotipificación de los microsatélites candidatos

La amplificación de los microsatélites fue realizada mediante dos protocolos. i) En la mayoría de los loci se utilizó las condiciones químicas propuestas en el método Schuelke (2000) y el perfil de termociclado descrito por Martínez et al. (2011). Estos protocolos son bastante eficientes porque en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se logró amplificar los alelos con el fluoróforo. ii) En los loci que no se tenía éxito con el anterior método, se amplificaron con un protocolo que involucra dos PCRs, la primera PCR consistía en la amplificación de los alelos utilizando los cebadores específicos y en la segunda PCR la incorporación del fluoróforo utilizando como cebador “forward” el M13 con el fluoróforo. Las condiciones de las dos PCR eran similares simplemente cambian la temperatura de anillamiento.

Cada reacción de la PCR era de 12.5 μ l la cual estaba compuesta de 200 μ M de dNTPs; amortiguador de PCR 1 X (Tris 10 mM, KCl 50 mM y 2 MgCl₂ mM); 0.5 μ M de cada cebador y 0.15 U de Taq DNA-Pol y 20 ng de ADN patrón. El perfil de termociclado fue: un periodo inicial de 10 min a 95°C seguidos por; 30 ciclos de: 60 s a 94°C, 30 s a la temperatura optima de anillamiento en el primer PCR y en la segunda PCR 53°C y 2 min a 72°C; seguidos por una elongación final de 30 min a 72°C. La calidad y cantidad de los productos de la PCR se verificó en geles de agarosa al 1.5 %. Los productos de PCR se mezclaron y posteriormente se genotipificaron en un secuenciador automático ABI 3130xl o 3730 siguiendo el protocolo del fabricante. Para cada locus, se determinaron los tamaños alélicos en el programa GeneMarker v 2.4.0 (Softgenetics, State College, PA, USA); el número de alelos, la heterocigosidad observada (H_o) y la heterocigosidad esperada (H_e) se calcularon en Arlequín 3.5.2.2 (Excoffier y Lischer, 2010). La desviación del equilibrio Hardy-Weinberg (HWE) y el desequilibrio de ligamiento fueron probados en GENEPOP 4.13 (Rousset, 2008). El contenido de información polimórfica (PIC) fue calculado en Microsatellite Tools (Park, 2001). Todas las secuencias fueron publicadas en la base de datos GeneBank.

2.2.6 Anotación del genoma mitocondrial

La secuencia consenso más larga obtenida en uno de los *contigs* del ensamble *de novo* coincidió con el genoma mitocondrial de la especie. Este *contig* tenía en total 24,536 secuencias con una profundidad media de 141.65 secuencias. La identificación y posición de cada uno de los genes se realizó mediante programas específicos que anotan el genoma mitocondrial por homología con otros vertebrados. Los programas DOGMA (Wyman et al., 2004) y MITOS (Bernt et al., 2013) fueron utilizados para localizar los ARN ribosomales, los ARN de transferencia y los genes que codifican para proteínas. Además se

utilizaron los genomas mitocondriales de otros batoideos de la misma familia que se encontraban en la base de datos del GenBank, *Rhinobatos schlegelli* (NC_023951; Chen et al., 2016) y *R. hynnicephalus* (NC_022841; Chen et al., 2015) para hacer una comparación por homología de cada uno de los genes y encontrar el origen de replicación. El programa TANDEM REPEATS FINDER (Benson, 1999) se utilizó para la detección de repeticiones en tándem en regiones que no codifican para proteínas. El genoma fue publicado en la base de datos del GeneBank.

2.3 Resultados

2.3.1 La diversidad alélica en la guitarra rayada es extremadamente baja

El ensamblaje *de novo* produjo 1,221 *contigs* que contenían microsatélites, pero solo en 426 (35 %) se pudo diseñar cebadores, ya sea porque el microsatélite se encontraba en algún extremo del *contig*, o porque a los lados del microsatélite no había una región conservada. La mayoría de los loci fueron los dinucleótidos (73 %, n=311), seguido de los tetranucleótidos (20 %, n=87) y los trinucleótidos (7 %, n=28). El número de unidades repetidas osciló entre cuatro y 47, la mayoría de los loci tenían un número pequeño de unidades repetidas. Se escogieron 107 loci para probar su polimorfismo, de los cuales 62 no produjeron genotipos reproducibles en 10 muestras. De los que produjeron genotipos reproducibles, 23 fueron monomórficos y 22 polimórficos. Se encontró una diversidad alélica extremadamente baja en los loci polimórficos, el número de alelos por locus osciló entre dos y seis (Tabla 1), con una media de 2.77. La media de la H_o y la H_e fue de 0.49 y 0.42 respectivamente. Se detectaron desviaciones significativas del HWE en tres loci (ZAEX2-02, ZAEX3-19 y ZAEX4-02) después de la corrección por pruebas múltiples de Bonferroni, esto fue debido al exceso de heterocigotos. No se detectó ningún par de loci ligados.

Tabla 1: Caracterización de 22 microsatélites polimórficos en *Z. exasperata*.

Locus	Secuencias de cebadores (5'-3')	Motivo	Rango de tamaño (pb)	T _a (°C)	NA/n	Ho	He	PIC	GenBank # acceso
ZAEX2-02	GTAGATCGTCGCTTCTGAC GGCGGAAGAGGAGATTG	AG ₍₈₎	337 – 343	*	3/21	0.952	0.533	0.408	KY073368
ZAEX2-12	TTCCACACCTTGATCTATCG TACTCAACTACCGCACTTAC	AG ₍₈₎	342 – 344	58	2/19	0.316	0.398	0.313	KY073369
ZAEX2-13	GGAAATTCTGTGTATGCCTG TCATCAAGCACACATTTACG	AG ₍₈₎	269 – 273	55	3/20	0.550	0.445	0.390	KY073370
ZAEX2-14	ACAGAGAGGGAATTGTGATG TGAAGACGTGGATTAAGAGG	AG ₍₈₎	211 – 221	52	3/20	0.600	0.445	0.359	KY073371
ZAEX2-18	ATCATTAAACGTGTGCATGG CTCAAAGAATCGAAGCTGAC	AG ₍₁₀₎	162 – 164	55	2/18	0.444	0.457	0.346	KY073372
ZAEX2-19	CAATTGTCAGTGCTGTATCC TTCACCAGTCAGAGATTCTC	AG ₍₈₎	175 – 179	58	3/19	0.368	0.323	0.288	KY073373
ZAEX2-29	CGCTGTCACACCTAAATTCAG CAGTCTTTCGGTATATCTGC	AC ₍₁₄₎	266 – 270	*	3/23	0.304	0.273	0.248	KY073374
ZAEX3-09	AGTGGTCCTAATTACAGCAG AATAAGACCAACTGTTCCG	ATC ₍₈₎	173 – 182	*	4/22	0.636	0.594	0.491	KY073375
ZAEX3-16	AAAGCCGGTTTGACTTATTC ATTGCCTTTGTGAGCTTATG	AGC ₍₆₎	140 – 143	53	2/21	0.333	0.284	0.239	KY073376
ZAEX3-19	TAGCAGACATAATACCGAGC GAGAGCGAGTTTCCTTAATG	AAC ₍₆₎	332 – 336	*	3/23	1.000	0.532	0.406	KY073377
ZAEX3-22	TCTGATCATCTCTTGTGGTG CTTACAAGTGCAACTGTCTC	ATC ₍₇₎	243 – 249	*	3/23	0.130	0.204	0.189	KY073378
ZAEX3-26	AGATTTAGCATACCGTCCTC AGACTGTCTGGAACCTTAGTG	AGG ₍₇₎	160 – 172	*	3/22	0.272	0.312	0.270	KY073379
ZAEX4-02	TATCATTAGAGCGGTGTCAG CTCATCTAGATTCCAGCGTC	AAAT ₍₅₎	227 – 231	*	2/23	0.913	0.507	0.373	KY073380
ZAEX4-05	GAGATTGCGGATTTACTTCC ACACAGACAGGTAGACAG	ACAG ₍₄₎	239 – 274	*	3/23	0.739	0.503	0.390	KY073381

T_a, temperatura de anillamiento; *, Perfil de termociclado utilizado por Martínez (2011); NA, número de alelos; n, número de individuos genotipados; Ho, heterocigosidad observada; He, Heterocigosidad esperada; PIC, contenido de información de polimorfismo.

Tabla 1: Continuación. Caracterización de 22 microsatélites polimórficos en *Z. exasperata*.

Locus	Secuencias de cebadores (5'-3')	Motivo	Rango de tamaño (pb)	T _a (°C)	NA/n	Ho	He	PIC	GenBank # acceso
ZAEX4-11	AACTGGTGAATCTCAAGGAC ACCAGGTTGTGTAAGAGG	AAAT ₍₇₎	318 – 334	*	6/20	0.700	0.759	0.699	KY073382
ZAEX4-12	GGTGGACAGGAAAGTGTG GCTCCATTGTGACTAATTG	AATG ₍₄₎	191 – 199	51	2/21	0.571	0.511	0.374	KY073383
ZAEX4-15	GTTCTCATTGTCATCTGTG ACAAGGTTCAAACAAAGACC	AAAG ₍₄₎	130 – 134	59	2/21	0.429	0.345	0.28	KY073384
ZAEX4-20	CAAGCGCCGAGTAATGAC GGATGAATCTGATGCCAATC	AACC ₍₅₎	337 – 345	*	3/23	0.391	0.426	0.346	KY073385
ZAEX4-22	TTGCCATTGTTGTCATTAAG GCCACCCTTATCATTCTTTG	ACTA ₍₅₎	232 – 236	*	2/21	0.190	0.176	0.157	KY073386
ZAEX4-39	CTCTGATTCTTTCTGCAGTG AAAGTGAAGTGTGATGAAGG	AAAT ₍₄₎	321 - 232	*	2/21	0.238	0.470	0.353	KY073387
ZAEX4-41	GAATTGGAGAGACATACTGAC AATCCTTGTCTCTGCAAC	ACAG ₍₄₎	195 – 199	*	3/23	0.609	0.463	0.368	KY073388
ZAEX4-42	ACTGTTTAAAAGTTTGCTGG CAACTTACCTTGCACTTACC	AAGG ₍₄₎	218 – 222	*	2/22	0.182	0.169	0.152	KY073389

2.3.2 El mitogenoma de la guitarra rayada presenta una segunda región no codificante

La ubicación de los genes del mitogenoma fue similar a la encontrada en otros elasmobranquios, entre los genes codificadores, el *ND5* fue el más largo (1,836 pb) y el *ATP8* fue el más corto (168 pb; Tabla 2). El *COXI* fue el único gen codificador que tiene un codón de inicio (GTG) diferente. Los genes *COXII*, *ND3* y *ND4* presentaron el codón de parada incompleto (T). Al igual que otros mitogenomas de vertebrados, el *ATP8* y *ATP6* se sobreponen por 10 nucleótidos; el *ND4* y *ND4L* por siete nucleótidos mientras el *ND5* y *ND6* por cuatro nucleótidos (Figura 1). El tamaño de los ARNt (ARN transferencia) osciló entre 66 pb (cisteína) a 75 pb (copia leucina 1). Se encontró una segunda región no codificante (538 pb) entre los ARNt Thr y Pro, ésta presentó cuatro repeticiones en tándem cada una de 100 pb (Figura 2); se corroboró la secuencia de ésta región mediante la secuenciación Sanger. La región de control presentó un tamaño de 1,096 pb y también tenía un conjunto de repeticiones en tándem.

Tabla 2: Características de los genes mitocondriales de *Z. exasperata*.

Loci	Posición		Longitud (pb)	Codón		Hebra *
	Desde	Hasta		Inicio	Parada	
<i>tRNA-Phe</i>	1	69	69			H
<i>12s-rRNA</i>	70	1031	962			H
<i>tRNA-Val</i>	1032	1103	72			H
<i>16S-rRNA</i>	1104	2787	1,684			H
<i>tRNA-Leu¹</i>	2788	2862	75			H
<i>ND1</i>	2863	3837	975	ATG	TAA	H
<i>tRNA-Ile</i>	3839	3908	70			H
<i>tRNA-Gln</i>	3908	3979	72			L
<i>tRNA-Met</i>	3979	4047	69			H
<i>ND2</i>	4048	5094	1,047	ATG	TAA	H
<i>tRNA-Trp</i>	5094	5162	69			H
<i>tRNA-Ala</i>	5167	5235	69			L
<i>tRNA-Asn</i>	5236	5308	73			L
<i>Origen de replicación</i>	5309	5342	34			-
<i>tRNA-Cys</i>	5343	5408	66			L
<i>tRNA-Tyr</i>	5412	5480	69			L
<i>COXI</i>	5482	7038	1,557	GTG	TAA	H
<i>tRNA-Ser¹</i>	7039	7109	71			L
<i>tRNA-Asp</i>	7110	7179	70			H
<i>COXII</i>	7201	7891	691	ATG	T--	H
<i>tRNA-Lys</i>	7892	7964	73			H
<i>ATP8</i>	7966	8133	168	ATG	TAA	H
<i>ATP6</i>	8124	8807	684	ATG	TAA	H
<i>COXIII</i>	8810	9595	786	ATG	TAA	H
<i>tRNA-Gly</i>	9597	9666	70			H
<i>ND3</i>	9667	10015	349	ATG	T--	H
<i>tRNA-Arg</i>	10016	10086	71			H
<i>ND4L</i>	10087	10383	297	ATG	TAA	H
<i>ND4</i>	10377	11757	1,381	ATG	T--	H
<i>tRNA-His</i>	11758	11826	69			H
<i>tRNA-Ser²</i>	11827	11893	67			H
<i>tRNA-Leu²</i>	11894	11965	72			H
<i>ND5</i>	11966	13801	1,836	ATG	TAA	H
<i>ND6</i>	13798	14316	519	ATG	TAA	L
<i>tRNA-Glu</i>	14318	14386	69			L
<i>Cytb</i>	14390	15532	1,143	ATG	TAG	H
<i>tRNA-Thr</i>	15534	15607	74			H
<i>Región no codificante</i>	15608	16145	538			-
<i>tRNA-Pro</i>	16146	16214	69			L
Región control	16215	17310	1,096			-

*H y L se refieren a hebra pesada y ligera.

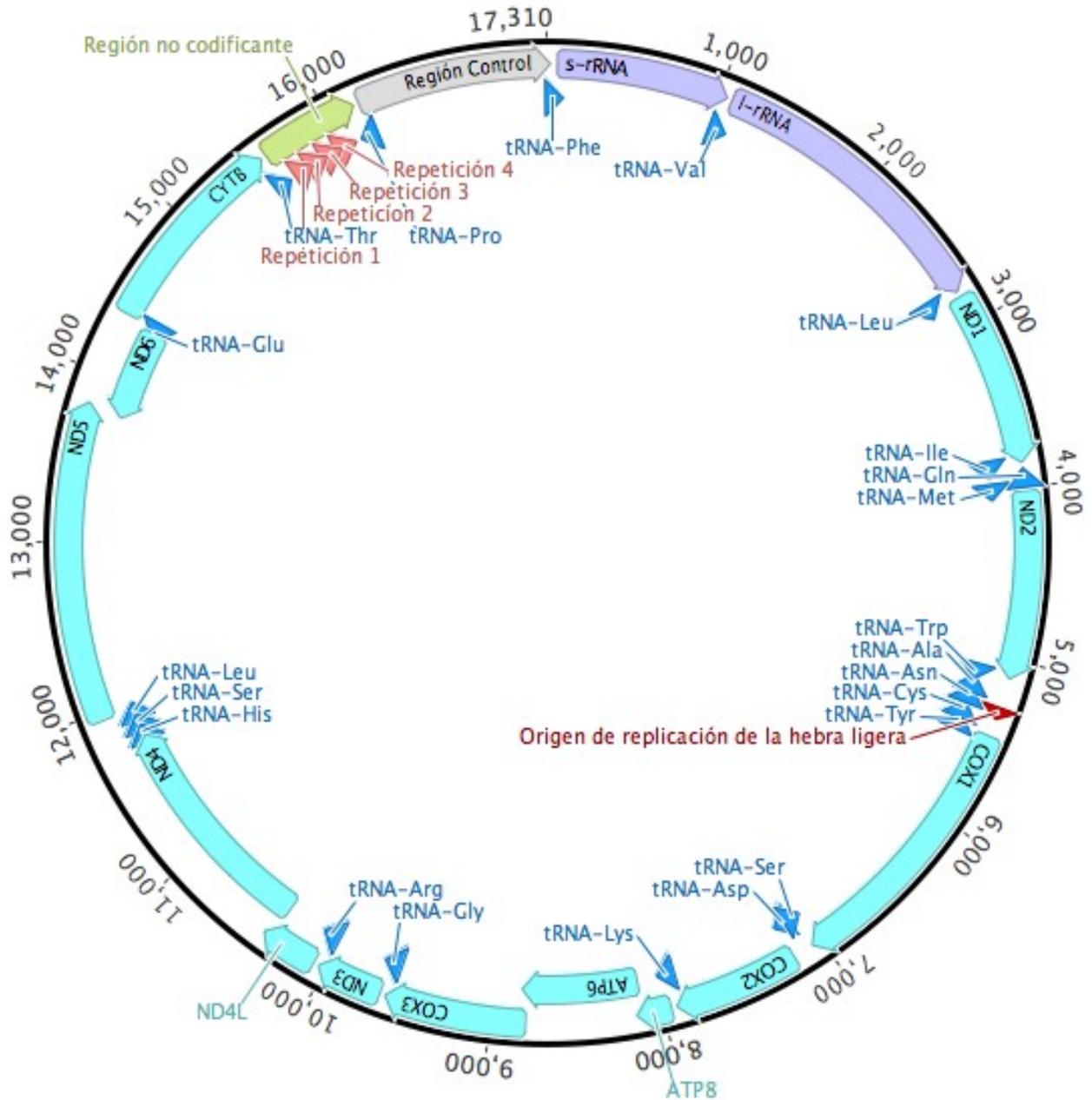


Figura 1: Representación circular de la organización del mitogenoma de *Z. exasperata*. Los colores representan los diferentes tipos de genes. El sentido de las flechas indican la orientación de los genes y la ubicación de las flechas (arriba o abajo) depende de la hebra en donde se encuentra el gen ya sea en la pesada o ligera.

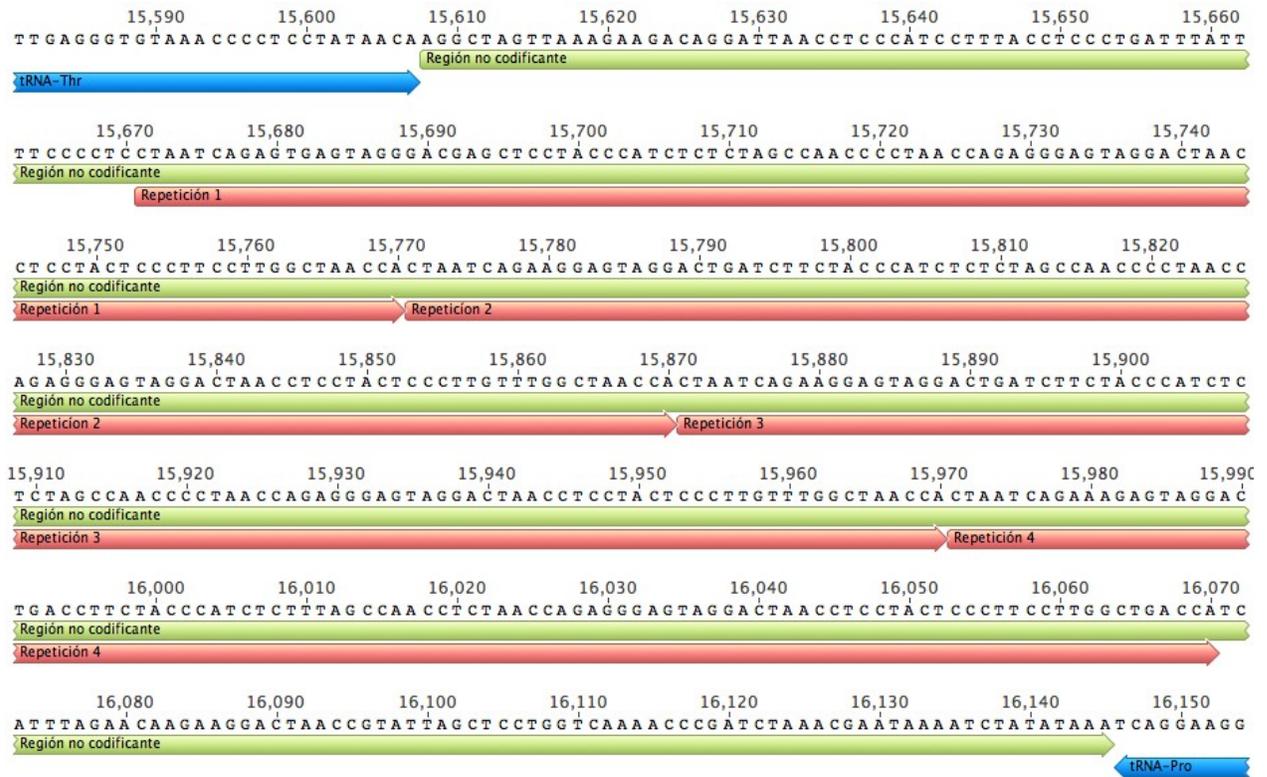


Figura 2: Ubicación de las cuatro repeticiones en tándem encontradas en la segunda región no codificante en el mitogenoma de *Z. exasperata*. Los números indican la posición de la base en relación a todo el genoma.

2.4 Discusión

2.4.1 La diversidad alélica en la guitarra rayada

Se detectó una diversidad extremadamente baja en la caracterización de los loci microsatélites en una población natural de *Z. exasperata*. La mayoría de los microsatélites detectados presentaron un número de repeticiones bajo; por ejemplo, en los tetranucleótidos el 83 % de los microsatélites a los que se les diseño cebadores tenían únicamente cuatro repeticiones. Esto es relevante porque menos unidades de repetición reflejan una tasa de mutación baja. De igual manera, se encontró la misma cantidad de loci monomórficos y polimórficos, puede ser que los loci monomórficos encontrados en la población de muestreo sean polimórficos en otras poblaciones de *Z. exasperata* o en especies congéneres como *Z. xyster*.

En los loci polimórficos se encontró que la mayoría de ellos presentaban dos o tres alelos y la H_o baja a moderada. Parece ser que el ADN nuclear de batoideos tiene tasas de mutación bajas, puesto que algunas especies presentan menos de diez alelos por locus y bajos niveles de heterocigosidad, como los

encontrados en *Aetobatus flagellum* (4.1 alelos en promedio, 0.480 de H_e ; Sellas et al., 2011) y *Potamotrygon motoro* (3.5 alelos en promedio y 0.369 de H_o y 0.377 de H_e ; Cruz et al., 2013).

Un estudio previo reveló para la misma población de Sonora que la diversidad haplotípica mitocondrial era baja ($ND2 h=0.29$; Castillo-Páez et al., 2014) y en el presente estudio se encontró diversidad nuclear baja. Puede ser que la baja diversidad del genoma que muestra esta población natural sea reflejo de: i) alta emigración y baja tasa de inmigración, tal vez esta población exparte más individuos a otras poblaciones de las que recibe, pero no hay estudios de movimientos o migración que lo corroboren. ii) El nivel de homocigosidad alto podría ser el resultado de un apareamiento de individuos estrechamente relacionados genéticamente, la endogamia puede ocurrir en poblaciones cerradas, con baja conectividad o comportamiento reproductivo filopátrico que es común en tiburones (Chapman et al., 2015; Flowers et al., 2016). iii) Los cuellos de botella son una reducción en el tamaño de la población, producido por eventos ambientales o humanos (sobrepesca) que causan un aumento en la deriva génica, y a su vez ocasiona una reducción en la abundancia de alelos raros y la disminución en el acervo genético. No se conoce si las poblaciones de *Z. exasperata* han experimentado un colapso, pero un análisis de las pesquerías a la misma población determinó que es un componente importante en la pesca artesanal de rayas (Blanco-Parra et al., 2009b). iv) Los elasmobranquios, en comparación con otros vertebrados, tienen una tasa relativamente baja de evolución del ADN mitocondrial (Martínez et al., 2011) y puede ser que el ADN nuclear también tenga bajas tasas de mutación. v) El bajo número de alelos por locus y el hecho de que la mayoría de los loci estén en HWE (algunos con exceso de H_o), sugieren que la población de es históricamente pequeña o que la especie tiene una baja tasa de mutación. Las poblaciones naturales con diversidad genética baja y con sobreexplotación son prioridades para la conservación y manejo debido a que son vulnerables a la extinción.

2.4.2 El mitogenoma de la guitarra rayada es similar a otros elasmobranquios

La organización del mitogenoma es similar a la reportada para otros elasmobranquios (Alam et al., 2014). El mitogenoma está compuesto por 13 genes que codifican para proteínas, dos ARN ribosomales, 22 ARNt y una región control. La única discrepancia es la presencia de una segunda región no codificante, ubicada entre los ARNt Thr y Pro y que presenta repeticiones en tándem. Sin embargo, en ninguna especie de batoideo se ha hallado una región con características parecidas. No obstante, en *Amblyraja radiata* (Rasmussen y Arnason, 1999) se encuentra un ARNt adicional putativo de 72 nucleótidos en la misma posición. En el tiburón *Mitsukurina owstoni* (NC_011825.1) se encontró una región similar de

1,060 nucleótidos con cinco repeticiones. Entre los ARNt Thr y Pro que se encuentran aledaños a la región control, al parecer existe una mayor probabilidad de que se presenten inserciones, dado que en tres especies de elasmobranquios de 120 analizadas es la única posición de todo el mitogenoma que se encuentra alterada y esto posiblemente sea por la cercanía a la región control. Esta región no codificante puede ser útil en estudios de estructura poblacional de la guitarra rayada, puesto que no está sujeta a selección y porque dichas repeticiones usualmente son bastante polimórficas y exhiben variación en el número de copias entre individuos (Buroker et al., 1990).

El tamaño del mitogenoma varía entre las especies de batoideos (Tabla 3), la mantarraya *Mobula eregoodootenkee* (NC_025954.1) tiene 15,716 pb mientras que *Aetobatus flagellum* (NC_022837.1) 20,201 pb, el tamaño del mitogenoma de *Z. exasperata* (17,310 pb) se encuentra cerca del promedio de los mitogenomas para 35 especies de rayas. Sin embargo, es mayor al promedio (16,891 pb) de las especies del orden rajiformes al cual pertenece. La variación en el tamaño de los mitogenomas posiblemente se deba a la presencia de la duplicación genética que dio origen a la segunda región no codificante y a la presencia de las repeticiones en tándem de la región control, como ya se ha encontrado en otros elasmobranquios (Poortvliet y Hoarau, 2013).

Tabla 3: Tamaño y contenido de Guanina-Citosina de genomas mitocondriales de 35 especies de batoides.

Orden*	Especie	Tamaño del genoma (pb)	G-C %	GenBank # acceso
Myliobatiformes	<i>Aetobatus flagellum</i>	20,201	40.9	NC_022837.1
Myliobatiformes	<i>Dasyatis akajei</i>	17,658	40.4	NC_021132.1
Myliobatiformes	<i>Dasyatis bennetti</i>	17,668	40.2	NC_02352.2
Myliobatiformes	<i>Dasyatis zugei</i>	18,264	36.6	NC_019643.1
Myliobatiformes	<i>Gymnura poecilura</i>	17,874	45.1	NC_024102.1
Myliobatiformes	<i>Himantura gerrardi</i>	17,685	41.9	NC_026208.1
Myliobatiformes	<i>Himantura granulata</i>	17,657	39.1	NC_023525.1
Myliobatiformes	<i>Himantura microphthalma</i>	17,636	39.6	NC_026285.1
Myliobatiformes	<i>Mobula eregoodootenkee</i>	15,716	41.2	NC_025954.1
Myliobatiformes	<i>Mobula japanica</i>	18,880	37.5	NC_018784.1
Myliobatiformes	<i>Neotrygon kuhlii</i>	18,039	39.5	NC_021767.1
Myliobatiformes	<i>Pastinachus atrus</i>	18,162	38.8	NC_023808.1
Myliobatiformes	<i>Plesiobatis daviesi</i>	17,514	41.9	NC_007230.1
Myliobatiformes	<i>Pteroplatytrygon violacea</i>	17,665	40.6	NC_024570.1
Myliobatiformes	<i>Potamotrygon motoro</i>	17,448	43.3	NC_023116.1
Myliobatiformes	<i>Taeniura lymma</i>	17,652	40.9	NC_026210.1
Myliobatiformes	<i>Taeniura meyeri</i>	17,638	41.6	NC_019641.1
Rajiformes	<i>Amblyraja radiata</i>	16,783	40.3	NC_000893.1
Rajiformes	<i>Anoxypristis cuspidata</i>	17,243	38.6	NC_026307.1
Rajiformes	<i>Atlantoraja castelnaui</i>	16,750	37.1	NC_025942.1
Rajiformes	<i>Dipturus kwangtungensis</i>	16,912	41.6	NC_023505.2
Rajiformes	<i>Dipturus trachyderma</i>	16,907	41.6	NC_027521.1
Rajiformes	<i>Hongoe koreana</i>	16,905	42.2	NC_021963.1
Rajiformes	<i>Leucoraja erinacea</i>	16,724	40.3	NC_016429.1
Rajiformes	<i>Okamejei kenojei</i>	16,972	42.4	NC_007173.1
Rajiformes	<i>Pavoraja nitida</i>	16,760	35.7	NC_024599.1
Rajiformes	<i>Raja pulchra</i>	16,907	42.3	NC_025498.1
Rajiformes	<i>Raja rhina</i>	16,910	41.4	NC_021964.1
Rajiformes	<i>Rhinobatos hynnicephalus</i>	16,776	40.3	NC_022841.1
Rajiformes	<i>Rhinobatos schlegelli</i>	16,780	39.6	NC_023951.1
Rajiformes	<i>Zapteryx exasperata</i>	17,310	37.5	NC_024937.1
Rajiformes	<i>Zearaja chilensis</i>	16,909	41.1	NC_023944.1
Torpediniformes	<i>Narcine entemedor</i>	17,081	33.9	NC_025512.1

C-C % porcentaje de Guanina y Citosina.

El porcentaje de Guanina-Citosina está por debajo del promedio encontrado para otros batoides e incluso para el mismo orden es uno de los más bajos (el promedio para Myliobatiformes es de 40.53 y para Rajiformes de 40.05); se sabe que la estabilidad de la doble hélice del ADN depende de dicho porcentaje puesto que los pares de Guanina-Citosina involucran tres enlaces de hidrogeno haciendo a la doble hélice más resistente a la desnaturalización. La similitud de los genes entre los miembros de la familia Rhinobatidae (*R. schlegelii*, *R. hynnicephalus* y *Z. exasperata*) osciló entre el 80.8 % (ND3) al 97.1 % (ARNt-met y ARNt-trp). Sin embargo, la similitud de genes codificadores de proteínas varió de 80.8 % (ND3) a 87.5 % (COIII) indicando que alrededor del 80 % de los nucleótidos poseen la misma información genética.

2.5 Publicaciones

Este capítulo de la tesis ha sido publicado en los siguientes artículos científicos:

Castillo-Páez, A., M. A. del Río-Portilla, E. Oñate-González y A. Rocha-Olivares. 2016. The mitochondrial genome of the banded guitarfish, *Zapteryx exasperata* (Jordan and Gilbert, 1880), possesses a non-coding duplication remnant region. *Mitochondrial DNA Part A: DNA mapping, sequencing, and analysis* 27 (3): 1668-1670. DOI: 10.3109/19401736.2014.958721

Castillo-Páez, A., A. Rocha-Olivares, C. I. Bisbal Pardo, D. Zhu, D. Zhu, H. Itoh, H. Fukumori, J. Koseki, J. C. Garza, J. Urabe, L. V. Yefeng, M. Maki, M. A. Del Rio-Portilla, S. Chiba, W. Makino, W. Wang, W. Song, X. Chai, Y. Kano, Y. Wang, Y. Wang y Z. Hu. 2017. Microsatellite records for volume 9, issue 1. *Conservation Genetics Resources* 9 (1): 165-171. DOI: 10.1007/s12686-017-0689-1 (Extremely low allelic diversity of microsatellite markers in the banded guitarfish (*Zapteryx exasperata*))

Capítulo 3. Patrones morfológicos, moleculares y biogeográficos del género *Zapteryx* (pez guitarra) del Pacífico mexicano

3.1 Introducción

La identificación correcta a nivel de especie es necesaria no solo para atribuir apropiadamente los rasgos ecológicos y la historia de vida de dichas especies, sino también para el manejo pesquero sostenible y la conservación de la biodiversidad. La delimitación de las especies tradicionalmente implica el análisis de sus caracteres morfológicos, los cuales se pueden sobreponer y no ser lo suficientemente robustos e informativos, causando clasificaciones inadecuadas y confusiones taxonómicas (Mendonça et al., 2011; Arlyza et al., 2013). Este problema es particularmente importante en especies con estrategias de vida de selección k (es decir; con la tasa de crecimiento lenta, la maduración sexual tardía y la fecundidad baja); para las cuales, las delimitaciones erróneas de las especies aumentan la vulnerabilidad a la sobreexplotación (Arlyza et al., 2013) como ocurre en la mayoría de los elasmobranquios.

Entre los condriictios, la familia Rajidae tienen una alta diversidad de especies, pero la morfología es conservada dificultando así la delimitación de sus especies (Ebert y Compagno, 2007). Por ejemplo, *Himantura uarnak* es un complejo de especies y los miembros de este grupo a menudo han sido confundidos debido a la similitud de los caracteres entre los taxones, como la forma del disco y el patrón de coloración dorsal (Arlyza et al., 2013). En ese estudio, los caracteres morfológicos de diagnóstico no se han encontrado o no son útiles, dando lugar a la unión de dos o más especies. Los marcadores moleculares proporcionan herramientas potentes y alternativas para la corroboración de los límites de las especies descritas así como para la estimación de las relaciones evolutivas entre las poblaciones (Ovenden et al., 2010).

La adopción de métodos moleculares en elasmobranquios permite aclarar aspectos tales como las relaciones sistemáticas y filogenéticas, así como los patrones biogeográficos (Dudgeon et al., 2012). Por ejemplo, las dos especies de cazones del Atlántico occidental (*Rhizoprionodon terraenovae* y *R. porosus*) muestran pocos caracteres morfológicos de diagnóstico diferenciándose por un número superpuesto de vértebras; en consecuencia, el estatus taxonómico permanece incierto. En ese estudio, el nivel de divergencia interespecífica del ADN mitocondrial (ADNmt) fue mayor que el intraespecífico y la monofilia recíproca de los linajes de ADNmt reflejó independencia genética y la distinción como especies diferentes (Mendonça et al., 2011). Por otra parte, los peces guitarra *Trygonorrhina melaleuca* y *T. dumerilii* se clasificaron como especies diferentes, pero las secuencias de ADNmt y ADN nuclear (ADNn)

revelaron que *T. melaleuca* es una forma rara de *T. dumerilii* con un patrón de la coloración distintivo. Estas confusiones tienen consecuencias en la gestión y conservación de dichos organismos, ya que *T. melaleuca* ha sido catalogada como una especie en peligro de extinción en la Lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza, cuando de hecho no parece ser una especie válida sino un sinónimo de *T. dumerilli* (Donnellan et al., 2015).

Se han descrito tres especies del pez guitarra para el género *Zapteryx*. La especie *Z. brevirostris* (Müller y Henle, 1841) está restringida en el Atlántico suroeste, desde el sur de Brasil hasta la costa de Argentina y Uruguay (Wosnick y Freire, 2013). La guitarra rayada *Z. exasperata* (Jordan y Gilbert, 1880), se encuentra desde el sur de California hasta Perú (McEachran y Notarbartolo-Di-Sciara, 1995; Robertson y Allen, 2002); y la raya ocelada, *Z. xyster* Jordan y Evermann 1896, cuya distribución se extiende desde Mazatlán, México, hasta Perú (Robertson y Allen, 2002). Ebert (2003) cuestiona si *Z. exasperata* se encuentra al sur de Mazatlán, basándose en la identificación morfológica de los organismos de estas latitudes. El consenso actual es que la distribución de ambas especies está mal definida como resultado de la incertidumbre taxonómica y de los errores en la identificación históricos (Casper et al., 2009; Bizzarro y Kyne, 2015).

La distinción morfológica entre las especies del Pacífico se basa en pocos caracteres diagnósticos. i) Tienen la coloración similar. Sin embargo, lo que más se destaca es que *Z. xyster* presenta varias manchas redondas amarillas semejantes a una pupila, cada mancha está rodeada de una pigmentación negruzca; estas manchas están distribuidas de tal forma que existe una a cada lado de la longitud anterior pectoral; una segunda en la aleta pectoral cerca del ángulo posterior; una tercera a la mitad de la línea lateral y la línea media de la espalda; y varias manchas desvanecidas sobre la parte anterior de la espalda. ii) El disco es ligeramente más largo que ancho en *Z. exasperata*, pero más ancho que largo en *Z. xyster*. iii) *Z. xyster* tiene toda la superficie inferior cubierta de una fina piel granulada (Jordan y Evermann, 1896).

Este estudio contribuye a resolver la problemática de la identificación y delimitación de las especies del género *Zapteryx* en el Pacífico mexicano. Se adoptó un enfoque molecular filogenético que analiza la variación genética en los loci mitocondriales y nucleares de los peces colectados a lo largo de la costa del Pacífico mexicano. Los resultados revelan una falta de distinción genética entre las rayas identificadas como *Z. exasperata* y *Z. xyster* en esta región geográfica, así como la presencia de un linaje especie-específico divergente en las muestras más sureñas procedentes de Oaxaca. La presencia de un organismo en Oaxaca identificado molecularmente (únicamente con ADNmt) como *Z. exasperata* sugiere

que ambos linajes se superponen geográficamente. En general, nuestros hallazgos genéticos ponen en duda la validez sistemática de los caracteres morfológicos utilizados para distinguir entre *Z. exasperata* y *Z. xyster*, que parecen ser plásticos entre los organismos que comparten haplotipos en el norte (es decir, predominantemente los identificados como *Z. exasperata*). Sin embargo, también se apoya la existencia de divergencia genética entre los organismos del sur, muy probablemente ese linaje corresponde a *Z. xyster*. Se sugiere una revisión exhaustiva de la variación morfológica y genética del género *Zapteryx* en el Pacífico oriental para comprender completamente su complejo patrón de diversificación.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1 Muestreo

Se recolectaron 59 muestras del género *Zapteryx* en 14 localidades a lo largo del Pacífico mexicano (Tabla 4). En la Costa del Pacífico de Baja California (CPBC) fueron muestreados 16 especímenes, en el Golfo de California (GC) 37 y en Oaxaca seis (Tabla 4). Las muestras fueron conservadas en etanol (95 %) a temperatura ambiente hasta su procesamiento en el laboratorio.

Tabla 4: Localidades de muestreo del pez guitarra del género *Zapteryx* spp.

Región	Localidades	N	W	n	Año de colecta	Identificación morfológica	Tipo de tejido	
CPBC	1	Puerto San Carlos	29°63'	115°48'	2	2011	<i>Z. exasperata</i>	Musculo
		Punta Canoas	29°42'	115°12'	4	2011	<i>Z. exasperata</i>	Musculo
	2	Punta Santa María	28°94'	114°51'	1	2011	<i>Z. exasperata</i>	Musculo
		Laguna Manuela	28°42'	114°08'	3	2011	<i>Z. exasperata</i>	Musculo
	3	San Ignacio	26°38'	113°18'	3	2011	<i>Z. exasperata</i>	Musculo
		Bahía Magdalena	24°29'	112°36'	3	2015	<i>Z. exasperata</i>	Musculo
GC	4	San Felipe	31°01'	114°83'	4	2002	<i>Z. exasperata</i>	Hígado
		Bahía los Ángeles	28°95'	113°56'	1	2002	<i>Z. exasperata</i>	Musculo
	5	Mulegé	26°53'	111°58'	3	2015	<i>Z. exasperata</i>	Musculo
		Bahía de la Paz	24°15'	110°31'	3	2002	<i>Z. exasperata</i>	Musculo
	6	Bahía Kino	28°82'	111°94'	2	2004	<i>Z. exasperata</i>	Musculo
		Estero del Soldado	27°95'	110°96'	3	2004	<i>Z. exasperata</i>	Musculo
	7	Sinaloa	25°79' 23°58'	109°35' 106°74'	21	2015	<i>Z. xyster</i>	Musculo
PC	8	Oaxaca	16°53'	96°24'	5	2002	<i>Zapteryx</i> sp.	Hígado
					1	2013	<i>Z. xyster</i> *	Musculo

N, latitud; W, longitud; n, número de individuos colectados; CPBC, Costa del Pacífico de Baja California; GC, Golfo de California; PC, Pacífico Central; * Muestra con ADN degradado.

3.2.2 Extracción de ADN genómico

El ADN genómico total fue extraído de aproximadamente 100 mg de tejido muscular o hígado, este fue finamente cortado y digerido con *proteínasa K* seguido de un protocolo de purificación con sales usando cloruro de litio (Gemmell y Akiyama, 1996). Para el hígado fue utilizado el kit PureLink Genomic DNA Mini (Invitrogen, Life Technologies) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La calidad de los productos de extracción fue verificada con electroforesis en gel de agarosa (1.5 %) y la cantidad fue estimada por espectrofotometría con un NanoDrop *Lite* (Thermo Scientific). El ADN fue almacenado en una solución amortiguador (TE 1x pH 8.0 a -20°C) para su posterior uso en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

3.2.3 Amplificación y secuenciación

Se analizaron tres genes mitocondriales (la NADH deshidrogenasa subunidad 2 [ND2], la región no codificante que se repite en tándem [RNC] y la región de control [RC]) y uno nuclear (Gen activador de la recombinación subunidad 1, RAG1). La RNC fue identificada a partir de la secuenciación de todo el genoma mitocondrial de *Z. exasperata* (Castillo-Páez et al., 2016). Las PCRs fueron llevadas a cabo en 12.5 de μ l de reacción con las siguientes concentraciones: 200 μ M de dNTPs, amortiguador de PCR 1X (100 mM de Tris HCl a 8.3 de pH, 500 mM de KCl, 15 mM de $MgCl_2$ y 0.01 % de gelatina), 0.5 μ M de cada cebador (lista de cebadores en Tabla 5), 0.5 U de *Taq* ADN polimerasa (BioLabs), 0.3 mg/ml de BSA (BioLabs) y 20 ng de ADN molde. El ciclo de termociclado consistió en: 10 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a la temperatura de hibridación específica para cada par de cebadores (ND2 a 60°C, RC a 62°C, RNC a 53°C y RAG1 a 68°C) y 60 s a 72°C, una etapa de extensión final de 20 min a 72°C. Los productos de PCR fueron verificados en electroforesis en gel de agarosa (1.5 %) y fueron purificados usando el QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) o ExoSAP-IT para la limpieza de PCR (Affymetrix) de acuerdo con el protocolo del fabricante antes de ser secuenciados mediante Big Dye Terminator 3.1 en un secuenciador de DNA ABI 3730xl (Applied Biosystems).

Tabla 5: Cebadores mitocondriales y nucleares utilizados para amplificación.

locus/Cebador	Secuencia (5'-3')	Referencia
Mitocondrial		
ND2		
ND2Met47	TTTTGGGCCCATACC	(Sandoval-Castillo y Rocha-Olivares, 2011)
ND2Trp18	GCTTTGAAGGCTTTTGGT	
RC		
ZECR-L	GGTCAGATTAACATATAATGTATATAGCC	(Castillo-Páez et al., 2014)
ZECR-H	GTGTCTCCGTGGTCCAAC	
RNC		
Cytb-1040	GGN CAA CCM GTY GAA CAA CC	(Sandoval-Castillo et al., 2004)
ZENCR-H	GTA TAC ATT AGG AGT GGG GC	Diseñado para este estudio*
Nuclear – RAG1		
ZERAG1-L	TGCTGGCAYTGAGAGCTGGR	Diseñado para este estudio*
ZERAG1-H	RCAAAGTGGRTTGCAGCACAWC	

*Cebadores fueron diseñados en Geneious Pro 4.8.5 (Biomatters Ltd; www.geneious.com).

3.2.4 Análisis de secuencias

La edición de las secuencias fue realizada usando CodonCode Aligner 3.7.1, (Codon Code Corporation, Dedham, MA, EUA). Los haplotipos fueron identificados considerando los indels (incluyendo los de RNC) como quinto carácter utilizando DnaSP 5 (Librado y Rozas, 2009). La alineación de las secuencias fue llevada a cabo en MUSCLE basado en la agrupación de UPGMA implementada en MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013) y verificada manualmente. La divergencia genética se calculó utilizando PAUP* 4 (Swofford, 2002) usando el modelo de evolución molecular que mejor se ajustó a las secuencias, este fue identificado en jModelTest 2.1.7 (Darriba et al., 2012).

3.2.5 Análisis filogenéticos

La inferencia bayesiana fue utilizada para estimar las relaciones filogenéticas implementadas en MrBayes 3.2 sin considerar los indels (Ronquist y Huelsenbeck, 2003). Se ejecutaron cuatro cadenas simultáneamente con 200,000 generaciones, como modelo de sustitución fue usado GTR-T. Para dibujar las filogenias fue usado FigTree 1.4.2 (Rambaut y Drummond, 2007).

3.3 Resultados

3.3.1 Identificación morfológica

Se detectaron tres morfotipos en el área de estudio (Tabla 4; Figura 3). Las cinco muestras de Oaxaca no correspondieron con las descripciones morfológicas de cualquier *Zapteryx* spp., puesto que mostraron un disco más largo que ancho característico de *Z. exasperata*, seis ocelos amarillos y negruzcos en el dorso y un prominente hocico puntiagudo características de *Z. xyster*.

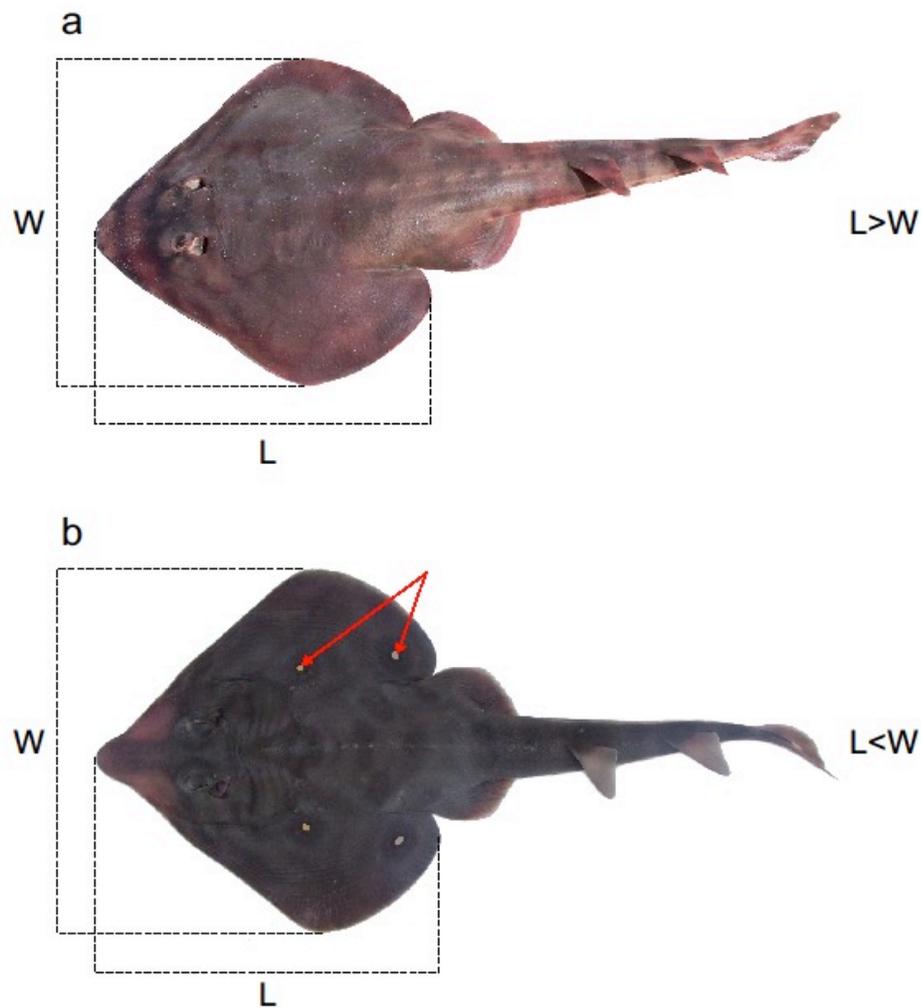


Figura 3: Morfotipos de los peces guitarras del género *Zapteryx*. a) *Z. exasperata* del Estero del Soldado, Sonora y b) *Z. xyster* de Sinaloa. Nótese la presencia de ocelos en la superficie dorsal de *Z. xyster* (flechas rojas). L, longitud del disco; W, ancho del disco. Un tercer morfotipo se encontró en muestras de Oaxaca (n = 5), pero no hay registro fotográfico disponible (ver texto para más detalles).

3.3.2 Patrones de variación genética

Los alineamientos múltiples de cada gen tuvieron las siguientes longitudes: el ND2 fue de 984 pares de bases (pb), la RC de 605 pb, la RNC de 624 pb y el gen nuclear RAG1 de 552 pb. La RNC mostró tres o cuatro motivos de repetición en tándem (100 pb de longitud cada motivo), por lo que los haplotipos individuales variaron entre los 520 y 622 pb de longitud. La RNC fue el gen mitocondrial más polimórfico, presentó un gran número de sitios variables e informativos para parsimonia. La RC fue el gen más conservado, presentó solo unas pocas mutaciones que definen los cinco haplotipos. Los genes concatenados del ADNmt produjeron 33 haplotipos entre los 58 individuos analizados (Tabla 6), de los cuales 16 fueron privados. Algunas secuencias del RAG1 poseían hasta cuatro posiciones heterocigóticas de un total de ocho sitios variables los cuales definieron nueve alelos (Tabla 6).

Tabla 6: Variabilidad y distancia genética (%) de genes mitocondriales y nucleares de los peces guitarra del género *Zapteryx*.

Locus	V	Pi	h/a	Modelo de sustitución	Distancia genética entre		
					Haplotipos del norte ⁺	Haplotipos del sur ⁺	Haplotipos del norte y del sur
Mitocondrial							
ND2	28	22	10	HKY*	0.10 - 0.41	0.31	1.97 - 2.50
RC	13	0	5	HKY*	<0.001 - 0.33	0.00	1.85 - 2.02
RNC	52	40	25	TPM1uf+I **	0.16 - 2.56	1.50	4.89 - 6.58
CAT	93	77	33	TVM+I +G**	0.05 - 0.72	0.55	2.83 - 3.27
Nuclear				Distancia genética entre localidades			
RAG1	8	2	9	HKY	0.181 a 0.731		

ND2, NADH subunidad 2; RC, región de control; RNC, región no codificante; CAT, concatenado; RAG1, gen activador de la recombinación 1; V, sitio variable; Pi, sitio informativo para parsimonia; h, haplotipos; a, alelos; * Criterio de información Akaike (AIC) ** Criterio de información Akaike corregido (AICc); + Los haplotipos del norte se refieren a todos los haplotipos, excepto los privados de Oaxaca, que se denominan haplotipos del sur.

3.3.3 Evidencia de plasticidad fenotípica

Todos los individuos de Sinaloa fueron identificados morfológicamente como *Z. xyster* (Tabla 4; Figura 3b); no obstante, estos peces compartieron haplotipos principalmente en los loci ND2 y RC con individuos identificados como *Z. exasperata* de otras localidades del GC y la CPBC, tan al norte como San Felipe y Puerto San Carlos respectivamente. De igual manera, para el locus RNC, los individuos de Sinaloa compartieron haplotipos con las rayas de Mulegé (localidad 5; Figura 4). Igualmente en el gen nuclear RAG1, casi todos los individuos de Sinaloa tuvieron alelos en común con los organismos de *Z. exasperata* (Figura 4). Esto sugirió que los individuos de la CPBC, el GC y Sinaloa fueron genéticamente

indistinguibles, según los marcadores del ADNmt y del ADNn analizados en el presente estudio. Sin embargo, manifestaron atributos fenotípicos distintos. Lo mismo ocurrió con un espécimen identificado como *Z. xyster* de Oaxaca, pero por la mala calidad del ADN no se pudo obtener las secuencias completas de todos los genes, las secuencias parciales de la RC, ND2 y RAG1 permitieron comparar con los haplotipos obtenidos para *Z. exasperata* en el GC (Anexo B al E), extendiendo la distribución de este linaje mucho más al sur de Mazatlán, Sinaloa.

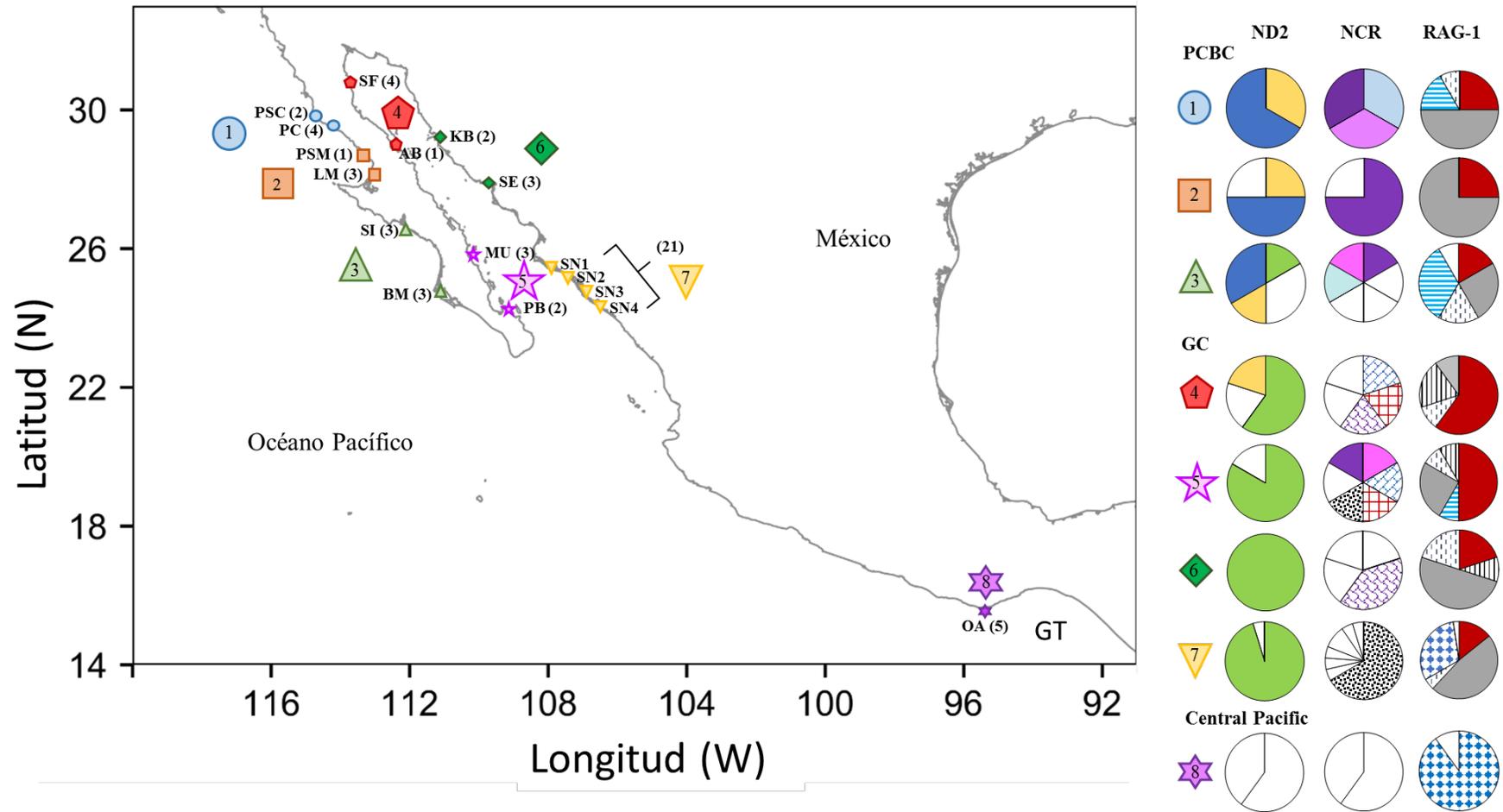


Figura 4: Frecuencia de los haplotipos (ND2, RNC) y alelos (RAG1) en el pez guitarra del género *Zapteryx* del Pacífico Mexicano. (En paréntesis el tamaño de la muestra; PSC, Puerto San Carlos; PC, Punta Canoas; PSM, Punta Santa María; LM, Laguna Manuela; SI, San Ignacio; BM, Bahía Magdalena; SF, San Felipe; AB, Bahía los Ángeles; MU, Mulegé, LP, La Paz; BK, Bahía Kino; ES, Estero El Soldado; SN, Sinaloa; OA, Oaxaca; PCBC, Costa Pacífica de Baja California; GC, Golfo de California; CP, Pacífico Central; GT, Golfo de Tehuantepec).

3.3.4 Más de un linaje de *Zapteryx* en el Pacífico mexicano

A pesar de que la mayoría de los peces guitarra analizados mostraron una diferenciación con el ADNmt, los cinco individuos de Oaxaca identificados como *Zapteryx* sp. tuvieron haplotipos privados y divergentes (Anexo B RC: ZAPCR-1, Anexo C ND2: ZAPND2-1 y ZAPND2 -2; Anexo D RNC: ZAPNCR-1 y ZAPNCR-2). Estos haplotipos, a los que se hace referencia de aquí en adelante como haplotipos "sureños" en oposición a los haplotipos "norteños", fueron muy divergentes y poseen caracteres fijos (Anexo B al D) a pesar del pequeño tamaño de la muestra. Específicamente, la divergencia entre los haplotipos "norteños" o entre los haplotipos "sureños" varió entre <0.001 y 2.56 %, mientras que las divergencias entre los haplotipos "norteños" y "sureños" eran considerablemente mayores, de 1.85 a 6.58 % (Tabla 6). Además, las reconstrucciones filogenéticas bayesianas de los genes del ADNmt separados y concatenados apoyaron firmemente (98 % bootstrap) la monofilia recíproca de los linajes "norteño" y "sureño" (ZAPCAT-1 y 2, Figura 5), lo que sugiere un aislamiento reproductivo prolongado de estos linajes matrilineales. No se encontró un patrón de divergencia genética o monofilia recíproca en el marcador nuclear, ya que los nueve alelos del RAG1 estuvieron poco diferenciados (divergencia de 0.18 - 0.73 %; Tabla 6). Sin embargo, un patrón geográfico surgió de la distribución alélica. De los dos alelos encontrados en *Zapteryx* sp. de Oaxaca, uno era privado y el segundo (encontrado en cuatro de cinco peces) solo se compartió con organismos de la localidad más cercana a la muestra (Sinaloa) y ausente más al norte (Figura 4). La filogenia bayesiana del RAG1 reveló un patrón filogeográfico con una politomia basal para la mayoría de los alelos norteños (Figura 6) y un clado monofilético bien soportado que agrupa los alelos "sureños" de Sinaloa y los de Oaxaca (ZAPRAG1 1, 2 y 3).

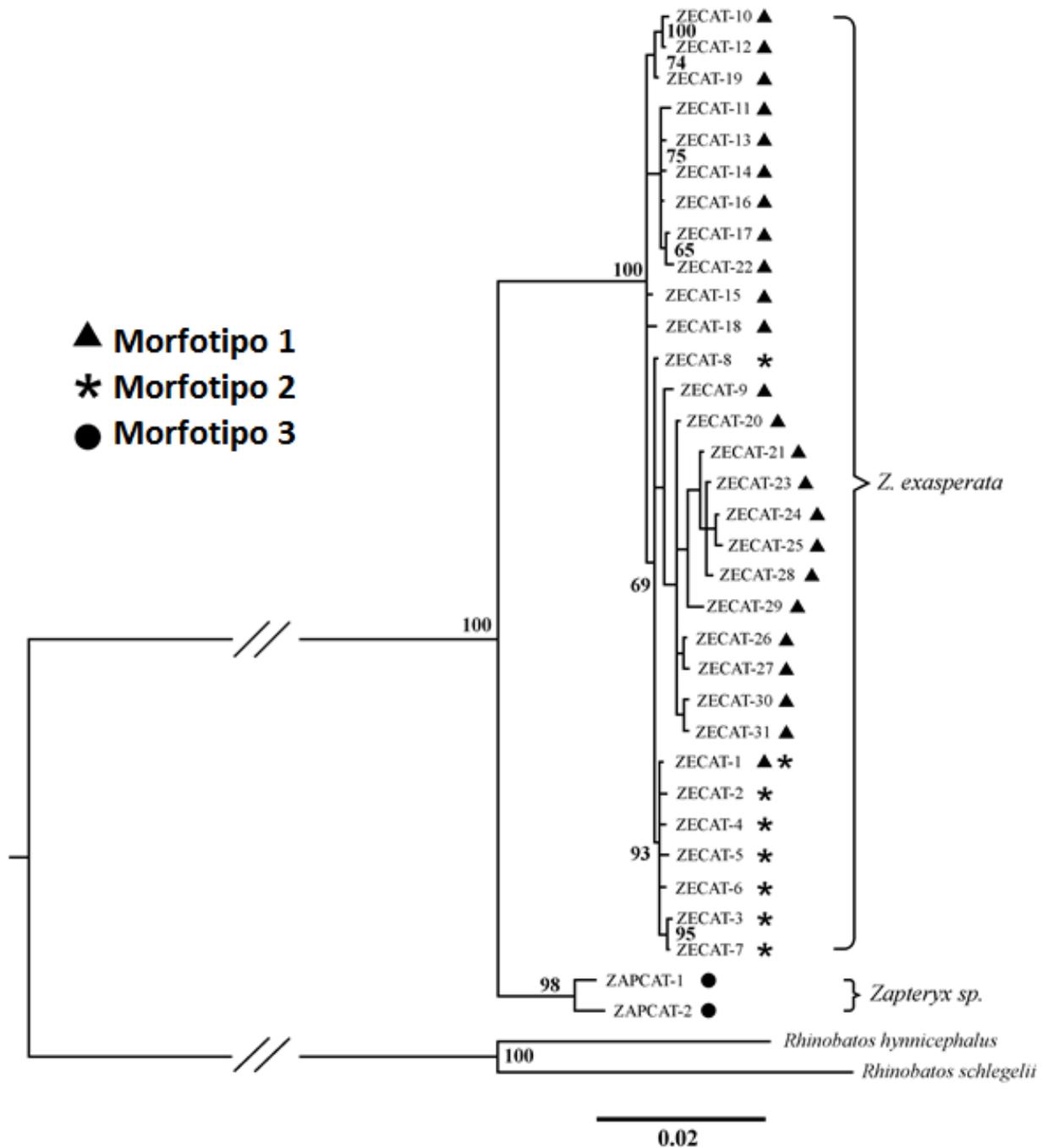


Figura 5: Reconstrucción filogenética bayesiana de genes mitocondriales concatenados (ND2, RC y RNC) de los peces guitarra del género *Zapteryx* del Pacífico mexicano. Los nodos son soportados con probabilidades posteriores. Morfotipos: 1 sin ocelos dorsales, 2 con ocelos dorsales, 3 nuevo morfotipo no descritos con manchas dorsales y el disco más largo que ancho.

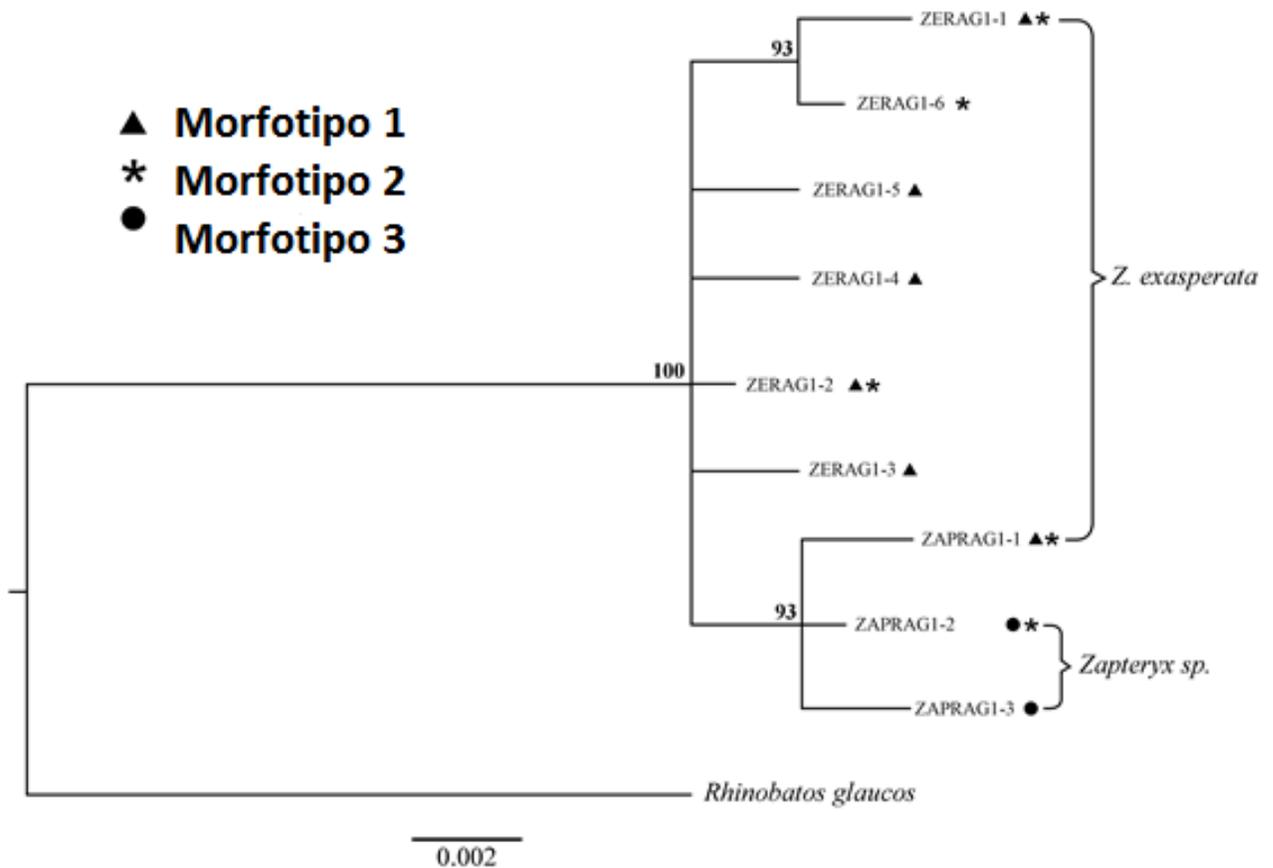


Figura 6: Reconstrucción filogenética bayesiana de alelos RAG1 de los peces guitarra del género *Zapteryx* del Pacífico mexicano. Los nodos son soportados con probabilidades posteriores. Morfotipos: 1 sin ocelos dorsales, 2 con ocelos dorsales, 3 nuevo morfotipo no descritos con manchas dorsales y el disco más largo que ancho.

3.4 Discusión

Se encontró que las especies del género *Zapteryx* en el Pacífico mexicano no están bien caracterizadas morfológicamente. La confusión en la identificación de las especies y las demarcaciones geográficas de la guitarra rayada *Z. exasperata* y de la raya ocelada *Z. xyster* son inconsistentes. En primer lugar, el hallazgo de que el carácter de identificación más conspicuo (es decir, los ocelos dorsales) parece ser plástico dentro de un grupo de peces que se reproducen, en lugar de ser un carácter diagnóstico fijo de un linaje independiente. En segundo lugar, se encontró evidencia de un grupo de peces “sureño” no descrito y morfológicamente distinto que posee un linaje mitocondrial divergente y distinto al de los peces “norteños” y que muestra una fuerte señal filogeográfica con el ADNn. Estos hallazgos corroboran la existencia de dos especies de *Zapteryx* en el Pacífico mexicano (*Z. exasperata* y *Z. xyster*) y sugieren que *Z. xyster* tal y como se describe actualmente, puede confundirse con algunas poblaciones de *Z. exasperata* (ver Capítulo 4).

3.4.1 Polimorfismo de color en *Zapteryx exasperata*

Todos los individuos identificados morfológicamente como *Z. xyster* son genéticamente indistinguibles de *Z. exasperata* con los genes mitocondriales (n=3) y el nuclear (n=1). No se encontró evidencia de divergencia o diferenciación genética entre estos dos grupos de peces morfológicamente distintos. Este patrón se ha detectado en otros batoideos. Las especies *T. dumerilii* y *T. melaleuca* se cree que son diferentes, pero el examen morfológico y el análisis de ADNmt y ADNn indicó que *T. melaleuca* fue una variante de color raro de *T. dumerilii*. En *T. melaleuca* se presentan áreas no pigmentadas en la superficie dorsal y la pigmentación normal del iris, esta condición leucística se le atribuyó a mutaciones de varios genes (Donnellan et al., 2015). La coloración y la textura de la piel diferencian a *Raja maderensis* de *R. clavata*. Sin embargo, la falta de distinción genética entre ellos indica que son la misma especie. Es posible que la especie nominal *R. maderensis* represente una población divergente de *R. clavata* (Ball et al., 2016).

Las aberraciones de color no son inusuales en los batoideos, alrededor de 19 especies muestran albinismo o leucismo (Bigman et al., 2016). La rareza de estos patrones de pigmentación se debe a la baja abundancia en que ocurren en la naturaleza en lugar de ser una desventaja fenotípica para el organismo (Sandoval-Castillo et al., 2006). Sin embargo, la variación de color presente en *Z. exasperata* no corresponde a ninguna de estas condiciones genéticas. No hay pérdida completa, incompleta, imperfecta o parcial de los pigmentos, únicamente es diferente patrón de coloración. La diferencia más notoria en la coloración entre los morfotipos de *Zapteryx* es la presencia de manchas amarillentas en la superficie dorsal. A pesar de que su presencia parece geográficamente restringida a las poblaciones del sur, la pregunta de cuáles condiciones específicas, ya sean internas (fisiológicas, ontológicas) o externas (físicas, químicas, ecológicas), son responsables de dicha coloración se mantiene abierta.

En el pasado, las diferentes etapas de la historia de vida (juveniles vs. adultos) han sido erróneamente clasificadas como especies diferentes en varios animales, porque los taxónomos suelen ignorar los cambios ontogénicos en la coloración (Booth, 1990). En algunas especies de batoideos, como *Himantura* spp., los juveniles presentan un patrón de coloración distinto al de los adultos (Arlyza et al., 2013). Aunque los diferentes morfotipos encontrados en este estudio pudieron atribuirse a la diferenciación ontogenética, la muestra de Sinaloa (organismos con ocelos) contenía individuos juveniles (40 %) y adultos (60 %) ambos con el mismo morfotipo. Se desconoce si los juveniles de *Zapteryx* de las poblaciones del sur poseen ocelos dorsales, principalmente debido a la falta de muestras. Sin embargo, se ha muestreado extensamente adultos de *Zapteryx* de las poblaciones del norte (en la CPBC y el GC) y

no ha habido registro de la presencia de ocelos. Esto apoya la idea de plasticidad fenotípica o la adaptación asociada a las condiciones ambientales en lugar de que se deba a los cambios ontogenéticos.

La presencia de caracteres sexuales secundarios es frecuente en los tiburones y batoideos. Por ejemplo, los machos de *Squatina guggenheim* tienen unas espinas pequeñas cerca de las puntas de las aletas pectorales (Colonello et al., 2007) y los machos de *Dasyatis sabina* tienen un dimorfismo sexual en la dentadura (Kajiura y Tricas, 1996). No obstante, los ocelos dorsales en *Zapteryx* se encontraron tanto en los machos (40 %) como en las hembras (60 %) en la muestra de Sinaloa.

Es probable que los morfotipos alternativos de la coloración que *Zapteryx* muestra sean las adaptaciones a los diferentes hábitats. Los ambientes heterogéneos pueden actuar como fuerzas selectivas divergentes, ya sea directamente sobre la coloración o indirectamente sobre los rasgos genéticamente correlacionados (Hubbard et al., 2010; Maan y Sefc, 2013). Por ejemplo, las coloraciones alternativas pueden ser discretas en los diferentes hábitats, la coloración podría estar asociada con el forrajeo (Cheney, 2013) o las estrategias anti-depredadores (Wishingrad et al., 2014). Del mismo modo, las diferencias de coloración se han correlacionado con los gradientes térmicos y la eficiencia de termorregulación (Clusella Trullas et al., 2007). La convergencia de coloración entre los linajes que experimentan condiciones ambientales similares ha sido reportada en varios taxones (Manceau et al., 2010). La convergencia de coloración aparente entre los linajes del sur de *Z. exasperata* y *Z. xyster* sugiere que este rasgo evolucionó bajo selección natural asociada con regiones tropicales. La confirmación de la importancia adaptativa de los morfotipos en *Zapteryx* requiere diferentes enfoques moleculares (por ejemplo, ddRADseq o RNAseq) de los utilizados aquí en conjunto con enfoques oceanográficos y ecológicos (por ejemplo, análisis de paisaje marino).

3.4.2 Linajes genéticos de *Zapteryx* en el Pacífico mexicano

La presencia de linajes crípticos no descritos no solo subestima la diversidad de los elasmobranquios, sino que también plantea un reto para la conservación y el manejo de la biodiversidad marina. Se detectaron dos linajes genéticos en el género *Zapteryx* en el Pacífico mexicano, que coinciden con el número de las especies descritas hasta ahora. Sin embargo, las distinciones fenotípicas no coinciden con los linajes genéticos. Algunos individuos de Oaxaca provisoriamente nombrados como *Zapteryx* sp., son morfológicamente diferentes y su ADNmt es altamente divergente. Además, sus haplotipos son privados y forman un clado recíprocamente monofilético. La existencia de estos haplotipos privados, divergentes

y recíprocamente monofiléticos sugiere fuertemente la existencia de un aislamiento reproductivo a largo plazo consistente con las especies diferentes. La variación nuclear (gen RAG1) es congruente con la señal del ADNmt, a pesar de que los alelos no son recíprocamente monofiléticos, esto último probablemente por la clasificación incompleta de linajes.

Linajes evolutivos diferentes y morfológicamente crípticos han sido encontrados en especies de batoideos en el Pacífico mexicano. En *Pseudobatos productus* las frecuencias haplotípicas difirieron entre los peces del GC y la CPBC formando dos linajes divergentes (2.47 % de divergencia de RC; Sandoval-Castillo et al., 2004). El mismo escenario de divergencia profunda del ADNmt se encontró en *Rhinoptera steindachneri*, en el que un haplotipo predominó en el GC y otro se encontró fijo en la CPBC. La divergencia genética entre regiones fue alta (10.03 % ND2) y los linajes del GC y la CPBC fueron recíprocamente monofiléticos (Sandoval-Castillo y Rocha-Olivares, 2011).

Para *Zapteryx*, la división principal entre los linajes “norteños” y “sureños” aparentemente se produce cerca del Golfo de Tehuantepec (Figura 4). El norte del Pacífico mexicano todo el año está influenciado por las aguas frías de la Corriente de California y por lo tanto se considera la frontera entre el Pacífico mexicano tropical y subtropical (Wilkinson et al., 2009). Se cree que este límite térmico reduce el flujo de genes entre las poblaciones marinas (por ejemplo López et al., 2010). Sin embargo, una porción significativa de la ictiofauna tropical de la provincia de Panamá se extiende hasta la boca del GC (Briggs y Bowen, 2012), lo que sugiere que esta barrera térmica es permeable y posiblemente insuficiente para aislar los linajes de *Zapteryx* en el Pacífico mexicano. Los cambios climáticos en el pasado, podrían haber provocado la diversificación de *Zapteryx*. Los ciclos glaciales del Pleistoceno causaron alteraciones significativas en los ecosistemas marinos (Hewitt, 2000), algunos de los cuales promovieron la diversificación del linaje en varios organismos marinos (Ludt y Rocha, 2015). Se ha sugerido que el GC pudo haber fungido como un refugio cálido para los elasmobranquios (Sandoval-Castillo y Beheregaray, 2015) y otra fauna marina (Jacobs et al., 2004) durante las glaciaciones. Por lo tanto, es posible que el nivel del mar y los cambios de temperatura durante el último período glacial hayan podido aislar los dos linajes *Zapteryx*, uno en el GC (*Z. exasperata*) y otro en el Pacífico ecuatorial oriental (*Z. xyster*). La distancia geográfica también limita el flujo de genes en las especies bentónicas sedentarias, el aislamiento genético entre los linajes “norteño” y “sureño” también puede haber sido mediado por la gran distancia geográfica entre ellos, según se ha informado en otros elasmobranquios con historias de vida similares (Lewallen et al., 2007; Borsa et al., 2012).

Los diferentes patrones observados en los genes del ADNmt y del ADNn pueden estar relacionados con diferencias en su evolución molecular y el sesgo en la dispersión de los sexos. La menor tasa de mutación del gen nuclear RAG1 en comparación con los loci mitocondriales (ND2, RC y NCR), se refleja en la mayor diversidad de los genes del ADNmt. Esto está relacionado con las tasas de evolución animal inherentemente diferentes del ADNmt y del ADNn y la hipervariabilidad de las regiones no codificantes del ADNmt. Además, las diferencias en el tamaño del genoma, la selección, la recombinación y la ligación influyen en la evolución molecular de los genes nucleares heredados biparentalmente (diploides) y los genes mitocondriales heredados matrilinealmente (haploides). De particular importancia es su tamaño efectivo de la población, que es cuatro veces más grande en los genes nucleares que en los mitocondriales, lo que hace que estos últimos sean más susceptibles a la deriva genética aleatoria, a la fijación de haplotipos entre poblaciones aisladas y a que la clasificación de linajes sea más rápida (Palumbi et al., 2001; Sclavi y Herrick, 2013). Esto es importante en la distinción norte-sur entre los linajes específicos que no han alcanzado la monofilia recíproca debido a la clasificación incompleta de los linajes. Un patrón de fuerte diferenciación genética mitocondrial pero no nuclear, también puede ser producido por la dispersión mediada por machos. La fuerte diferenciación mitocondrial evidenciada en el ADNmt de *Z. exasperata* entre la CPBC y el GC fue previamente documentada por Castillo-Páez et al. (2014) y corroborado con datos adicionales en este estudio (Figura 4). Esta señal genética sugiere la presencia de filopatría reproductiva femenina, como la documenta en varios peces cartilagosos (Dudgeon et al., 2012). Por otra parte, la ausencia de diferenciación genética entre la CPBC y el GC revelada por los datos nucleares del RAG1 obedece a la baja tasa de evolución de este marcador o sugiere dispersión sesgada de los machos. Sin embargo, se requieren datos adicionales de marcadores nucleares de evolución más rápida (como los microsatélites) para comprobar hipótesis.

3.4.3 Implicaciones taxonómicas

Se encontró tres escalas de variabilidad en el género *Zapteryx* en el Pacífico mexicano: genética, fenotípica y latitudinal. Sin embargo, esta variación contradice el conocimiento actual de su clasificación, la sistemática y la biogeografía. Se ha descubierto que: i) el carácter diagnóstico más conspicuo que define a *Z. xyster* (es decir, los ocelos dorsales) no es exclusivo; puesto que, es un carácter polimórfico del extenso linaje filogenético “norteño” atribuible también a *Z. exasperata*. Por lo tanto, un análisis morfológico profundo es necesario para determinar las características fenotípicas diagnósticas de *Z. xyster*. ii) Se puede encontrar a *Z. exasperata* tan al sur como Oaxaca y a *Z. xyster* tan al norte como Oaxaca. Sin embargo, esto necesita corroboración adicional debido al número limitado de muestras del

Pacífico mexicano central. iii) Al menos dos linajes independientes especies específicos identificados con el ADNmt ocurren en el Pacífico mexicano, el linaje “norteño” corresponde a *Z. exasperata* y el “sureño” puede corresponder a *Z. xyster*. iv) La coloración y los patrones genéticos observados en los peces de Sinaloa (localidad 7) son consistentes con la posible hibridación entre las hembras de *Z. exasperata* del GC y los machos de *Z. xyster* del sur, de tal manera que únicamente el ADNn tiene introgresión en esta zona de contacto.

En conclusión, un mal conocimiento de los patrones de variación morfológica y genética es la principal confusión taxonómica, así como la delimitación de especies y la demarcación geográfica de los intervalos de distribución de las especies en el género *Zapteryx* en el Pacífico oriental. Mientras que este estudio proporciona un paso significativo hacia la comprensión de esta paradoja en la región, los resultados apuntan a la necesidad de más investigación relacionada con este tema. Especialmente aumentando el esfuerzo de muestreo al sur de Sinaloa y muestras entre Sinaloa y Oaxaca ayudarían a descubrir la posible presencia del aislamiento por distancia. Se hizo un esfuerzo para recolectar peces guitarra en el centro y sur del Pacífico mexicano. Sin embargo, no se obtuvieron muestras debido a la baja abundancia de *Zapteryx* en esa región. La ampliación geográfica del muestreo en Centroamérica también puede esclarecer el patrón de variación del linaje “sureño” de los peces guitarra.

3.5 Publicaciones

Este capítulo de la tesis ha sido publicado en el siguiente artículo científico:

Castillo-Páez A, Sandoval-Castillo J, Corro-Espinosa D, Tovar-Ávila J, Blanco-Parra, María-del-Pilar, Saavedra-Sotelo N C, Sosa-Nishizaki O, Galván-Magaña y Rocha-Olivares A. (2017) Cutting through the Gordian knot: Unravelling morphological, molecular and biogeographical patterns in the genus *Zapteryx* (guitarfish) from the Mexican Pacific. ICES Journal of Marine Science online first. DOI: 10.1093/icesjms/fsx021

Capítulo 4. Patrones complejos de estructura poblacional de la guitarra rayada *Zapteryx exasperata* en el norte del Pacífico mexicano

4.1 Introducción

El grado de diferenciación y la conectividad entre poblaciones son procesos de relevancia biológica y ecológica que se deben conocer a fondo, especialmente en especies amenazadas, con importancia comercial o capturadas incidentalmente (Bernard et al., 2016). En el caso de los organismos marinos sujetos a explotación, es necesario determinar los patrones de la variabilidad genética de una especie en su intervalo de distribución, con el propósito de identificar unidades básicas de pesca y manejo (Laikre et al., 2005).

La estructura poblacional puede ocurrir por la selección natural o la limitación del flujo genético. La selección natural es una fuerza evolutiva que puede hacer que localidades se diferencien; por ejemplo, si los organismos se dispersan libremente entre localidades y se aparean con individuos de localidades diferentes a la que nacieron, puede ser que su descendencia no sea exitosa y no sobreviva como los descendientes de los padres locales; por consiguiente, las localidades comenzarán divergir dado que solo sobreviven los organismos “mejor adaptados” para las condiciones de donde nacieron. La reducción del flujo genético ya sea porque se restringe la dispersión de los individuos o por la tendencia de los individuos de regresar al lugar o región donde nacieron también afecta la distribución de la variabilidad genética haciéndola diferente entre localidades. A mayor flujo de genes, la diversidad genética es homogénea en el intervalo de distribución, pero a menor flujo genético ocurre lo contrario, las poblaciones se pueden diferenciar. El nivel de conectividad puede influir en la persistencia de las poblaciones, en el mantenimiento de la diversidad genética de la especie, así como en la dinámica poblacional (Laikre et al., 2005; Bernard et al., 2016).

Se han descrito diferentes barreras biológicas, oceanográficas y físicas que limitan el flujo genético en elasmobranquios. El comportamiento es una barrera biológica que puede reducir la conectividad poblacional y en elasmobranquios se han encontrado evidencias de filopatría, ya sea natal o regional o bien que un sexo sea más filopátrico que el otro (Chapman et al., 2015; Flowers et al., 2016). La fuerte estructura genética con el ADN mitocondrial (ADNmt) que presenta *Pristis pristis* en Australia puede deberse a que las hembras adultas regresan al mismo río donde nacieron para parir (filopatría natal) y no a otra área de parto accesible (Feutry et al., 2015). La especie de raya *Aetobatus narinari* presenta débil, pero significativa, estructura poblacional entre el sur del Golfo de México y la Florida, tanto con

marcadores moleculares del ADNmt y microsatélites, sugiriendo que los machos y las hembras presentan cierto grado de filopatría regional (Sellas et al., 2015). Los valores altos de F_{ST} del ADNmt y los valores bajos de F'_{ST} de los microsatélites indican que la dispersión de los sexos es asimétrica en el tiburón tigre *Galeocerdo cuvier*. En las cuencas oceánicas del Atlántico Occidental y del Indo Pacífico (pero no entré estas), se encontró evidencia de que los machos son los que más se dispersan, puesto que se encontraron valores de F_{ST} del ADNmt, heredado matrilinealmente, uno o dos órdenes de magnitud mayores que los de F'_{ST} de los microsatélites, heredados biparentalmente (Bernard et al., 2016). Sin embargo, este fenómeno solo se ha detectado en los tiburones y no en los batoideos posiblemente por los escasos estudios (Chapman et al., 2015; Flowers et al., 2016).

Las barreras físicas también juegan un papel fundamental en la conectividad poblacional. La batimetría puede ser un factor importante para la dispersión en especies con hábitos bentónicos y costeros. En las rayas *Raja polystigma* (Frodella et al., 2016), *Urobatis halleri* (Plank et al., 2010) y *Dasyatis brevicaudata* (Le Port y Lavery, 2012) la diferenciación poblacional ocurre entre las poblaciones cuyos hábitats están interrumpidos por aguas oceánicas profundas. La distancia geográfica entre poblaciones puede afectar adversamente al flujo de genes. Entre más alejadas se encuentren las poblaciones mayor será su aislamiento y diferenciación genética. Este fenómeno se ha detectado en las poblaciones *D. brevicaudata* (Le Port y Lavery, 2012) y *Raja clavata* (Chevolot et al., 2006b). Algunas especies se segregan por los diferentes patrones en el uso de su hábitat. En el norte de Europa, *Dipturus batis* presenta dos clados monofiléticos con las genes del ADNmt y del ADN nuclear (ADNn); la distribución de dichos clados está relacionada con los gradientes de temperatura, el clado “norteño” está asociado a aguas más frías y el “sureño” a aguas más cálidas (Griffiths et al., 2011b).

La guitarra rayada, *Zapteryx exasperata* es un batoideo bentónico de aguas someras (McEachran y Notarbartolo-Di-Sciara, 1995; Ebert, 2003) con importancia comercial en el norte del Pacífico mexicano (NPM) principalmente en la costa este del Golfo de California (GC; Blanco-Parra et al., 2009b). Se conoce muy poco acerca de su historia de vida, por ello está catalogada por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza en la Lista Roja de Especies Amenazadas como con “Datos Insuficientes” (Bizzarro y Kyne, 2015). El intervalo de distribución aún está en debate debido a las confusiones taxonómicas, al aparecer se encuentra desde el sur de California hasta Perú (McEachran y Notarbartolo-Di-Sciara, 1995; Robertson y Allen, 2002). Recientemente se ha encontrado que los individuos identificados morfológicamente como *Z. xyster* son genéticamente iguales a los individuos de *Z. exasperata*. Sin embargo, queda la pregunta de si dichos individuos provienen de una población diferente (Castillo-Páez et al., 2017b; Capítulo 3). En el NPM se ha encontrado una fuerte diferenciación

poblacional y limitado flujo genético (una o dos hembras cada tres generaciones) principalmente entre los individuos de Sonora y los de la costa del Pacífico de Baja California (CPBC) utilizando ADNmt, concordando con las diferencias morfológicas y los contrastantes patrones de reproducción entre los individuos del GC y la CPBC (Blanco-Parra et al., 2009a; b; Castillo-Páez et al., 2014).

Considerado la evidencia de filopatría en varias especies de batoideos (Flowers et al., 2016), la características sedentarias de su historia de vida y los patrones de estructura poblacional que *Z. exasperata* presenta en el NPM, se planteó si el bajo flujo genético de *Z. exasperata* corresponde i) a algún tipo de filopatría regional o ii) a un sesgo en la dispersión de los sexos o ii) al aislamiento por distancia. Para ello, en este capítulo: 1) se analizan los patrones de diferenciación poblacional de *Z. exasperata* en el NPM utilizando datos multilocus de dos tipos de marcadores moleculares, uno tipo consiste en tres loci mitocondriales de herencia materna y el otro en 13 loci microsatelitales y un gen nuclear de herencia biparental, 2) se estima el flujo genético a dos escalas temporales histórico y contemporáneo, 3) se evalúa el sesgo en la dispersión de los sexos y 4) el aislamiento por distancia.

4.2 Metodología

4.2.1 Muestreo

Se colectó tejido muscular (a excepción de San Felipe donde se colectó hígado) de 262 individuos de *Z. exasperata* a lo largo de la costa del NPM; desde Puerto San Carlos en la CPBC hasta el norte del estado de Sinaloa en el GC (Tabla 7). La mayoría de los tejidos procedían del desembarco de la pesca artesanal a excepción de Sinaloa, que provenían de la fauna de acompañamiento de arrastres de camarón. Todas las muestras fueron preservadas en etanol no desnaturalizado al 95 %.

Tabla 7: Localidades de muestreo de tejido muscular de *Z. exasperata*.

	Localidad	Lugar de muestreo	N°	W°	n	Año de colecta
1	Punta Canoas (PC)	Puerto San Carlos	29°63'	115°48'	6	2011
		Punta Canoas	29°42'	115°12'	28	2011
2	Bahía Vizcaíno (BV)	Punta Santa María	28°94'	114°51'	1	2011
		Laguna Manuela	28°42'	114°08'	72	2011
3	San Ignacio (SI)	San Ignacio	26°38'	113°18'	14	2011
		Bahía Magdalena	24°29'	112°36'	13	2015
4	Noroeste del Golfo de California (NG)	San Felipe	31°01'	114°83'	12	2002
		Bahía de los Ángeles	28°95'	113°56'	1	2002
5	Suroeste del Golfo de California (SG)	Mulegé	26°53'	111°58'	39	2015
		Bahía de la Paz	24°15'	110°31'	8	2002
6	Sonora (SO)	Bahía Kino	28°82'	111°94'	6	2004
		Estero del Soldado	27°95'	110°96'	31	2004
7	Sinaloa (SN)	Sinaloa	25°79'	109°35'	31	2015
			23°58'	106°74'		

4.2.2 Extracción de ADN genómico y amplificación de genes de interés

Se extrajo el ADN genómico mediante la digestión del tejido muscular utilizando *proteínasa K* y precipitando el ADN siguiendo el protocolo de cloruro de litio descrito por Gemmell y Akiyama (1996), la calidad y cantidad del ADN fue evaluada mediante geles de agarosa al 1.5 % y por espectrofotometría con el NanoDrop™ Lite (Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA, USA).

De un subgrupo de muestras (n=101) que abarcaban todas las localidades muestreadas se amplificaron tres loci mitocondriales; un gen codificante la NADH deshidrogenasa subunidad 2 (ND2) y dos regiones no codificantes, la región control (RC) y una región repetitiva en tándem (RNC; Castillo-Páez et al., 2016; Capítulo 2). De igual manera de un subgrupo de muestras (n=64) se amplificó el gen nuclear activador de la recombinación 1 (RAG1). Estos genes fueron amplificados siguiendo el protocolo utilizado por Castillo-Páez et al. (2017b; Capítulo 3). Los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se verificaron en un gel de agarosa al 1.5 % y posteriormente fueron purificados usando QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) o ExoSAP-IT for PCR clean-up (Affymetrix) siguiendo el protocolo del fabricante, los productos limpios fueron secuenciadas usando Big Dye Terminator 3.1 chemistry en un ABI 3730xl DNA Sequencer (Applied Biosystems). En todas las muestras (n=262) se amplificaron 13 loci microsatelitales diseñados para la especie (Tabla 8; Capítulo 2; Castillo-Páez et al., 2017a) siguiendo los protocolos de Schuelke (2000) y Martínez et al. (2011).

Tabla 8: Lista de cebadores utilizados para la amplificación de loci mitocondriales y nucleares.

Locus/Primer	Secuencia (5'-3')	Referencia	
Mitocondrial			
ND₂			
ND2Met47	TTTTGGGCCCATACC	(Sandoval-Castillo y Rocha-Olivares, 2011)	
ND2Trp18	GCTTTGAAGGCTTTTGGT		
RC			
ZECR-L	GGTCAGATTAACATATAATGTATATAGCC	(Castillo-Páez et al., 2014)	
ZECR-H	GTGTCTCCGTGGTCCAAC		
RNC			
Cytb-1040	GGN CAA CCM GTY GAA CAA CC	(Sandoval-Castillo et al., 2004)	
ZENCR-H	GTA TAC ATT AGG AGT GGG GC	Capítulo 3 (Castillo-Páez et al., 2017b)	
Nuclear			
RAG1			
ZERAG1-L	TGCTGGCAYTGAGAGCTGGR	Capítulo 3 (Castillo-Páez et al., 2017b)	
ZERAG1-H	RCAAAGTGGRITGCAGCACAWC		
Microsatélites			
ZAEX2-29F	CGCTGTCACACCTAAATTCAG	Capítulo 2 (Castillo-Páez et al., 2017a)	
ZAEX2-29R	CAGTCTTTCGGTATATCTGC		
ZAEX3-09F	AGTGGTCCTAATTACAGCAG		
ZAEX3-09R	AATAAGACCAACTGTTTCCG		
ZAEX3-19F	TAGCAGACATAATACCGAGC		
ZAEX3-19R	GAGAGCGAGTTTCCTTAATG		
ZAEX3-22F	TCTGATCATCTCTTGTGGTG		
ZAEX3-22R	CTTACAAGTGCAACTGTCTC		
ZAEX3-26F	AGATTTAGCATACCGTCCTC		
ZAEX3-26R	AGACTGTCTGGAAGTTAGTG		
ZAEX4-02F	TATCATTAGAGCGGTGTCAG		
ZAEX4-02R	CTCATCTAGATTCAGCGTC		
ZAEX4-05F	GAGATTGCGGATTTACTTCC		
ZAEX4-05R	ACACAGACAGGTAGACAG		
ZAEX4-20F	CAAGCGCCGAGTAATGAC		
ZAEX4-20R	GGATGAATCTGATGCCAATC		
ZAEX4-22F	TTGCCATTGTTGTCATTAAG		
ZAEX4-22R	GCCACCCTTATCATTCTTTG		
ZAEX4-39F	CTCTGATTCTTCTGCAGTG		
ZAEX4-39R	AAAGTGAAGTGTGATGAAGG		
ZAEX4-41F	GAATTGGAGAGACATACTGAC		
ZAEX4-41R	AATCCTTGTTTCTCTGCAAC		
ZAEX4-42F	ACTGTTTAAAAGTTTGCTGG		
ZAEX4-42R	CAACTTACCTTGCACTTACC		
ZAEX3-10F	CAAGGTTTATTACACAAGGG		Diseñados para este capítulo
ZAEX3-10R	GTTGAGGAAATGGAATCTCTC		

4.2.3 Caracterización de la diversidad en genes mitocondriales y nucleares

Las secuencias fueron revisadas, analizadas y editadas en el programa CodonCode Aligner 3.7.1 (Codon Code Corporation, Dedham, MA, USA). Para el alineamiento de las secuencias se utilizó MUSCLE basado

en el agrupamiento de UPGMA implementado en MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013), la RNC se alineó manualmente. Los sitios variables e informativos para parsimonia fueron detectados en MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013). La distinción de haplotipos se realizó considerando los indels como quinto carácter mediante DnaSP 5 (Librado y Rozas, 2009). Con este mismo programa se detectaron los alelos del gen RAG1 usando el método bayesiano de PHASE con 100 iteraciones. El número de haplotipos, la diversidad haplotípica y nucleotídica (Tamura y Nei) fueron calculados en Arlequín 3.5.2.2 (Excoffier y Lischer, 2010).

Los genotipos microsatelitales fueron detectados usando GeneMarker 2.4.0 (Softgenetics LC, State College, PA). El número de alelos, la heterocigosidad observada (H_o) y la heterocigosidad esperada (H_e) y el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) fueron calculados en Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier y Lischer, 2010). La prueba de ligamiento (LD) entre pares de loci se realizó en GENEPOP 4.1.3 (Rousset, 2008). A la significancia de pruebas múltiples del HWE y la LD se le aplicó la corrección secuencial de Bonferroni (Rice, 1989). El índice de endogamia (F_{is}) fue calculado en Fstat 2.9.3.2 (Goudet, 2002) y la presencia de alelos nulos se detectó mediante MicroChecker 2.2.3 (Van-Oosterhout et al., 2004). Para aumentar el tamaño de muestra se agruparon las localidades cercanas (Tabla 7).

4.2.4 Estructura y flujo genético poblacional

Para determinar el grado de diferenciación genética se calculó una matriz de distancias interhaplotípicas en el programa PAUP* 4 (Swofford, 2002) usando el modelo de sustitución nucleotídica que mejor se ajustó a las secuencias calculado en jModelTest 2.0.2 (Posada, 2008), TPM3uf+I para el ADNmt concatenado y HKY para la RAG1, mediante el método de ajuste el BIC puesto que presentó la mayor probabilidad y menor número de parámetros en comparación con la AICc. La estructura genética se analizó mediante un AMOVA estándar (Standard AMOVA computations–haplotypic format) para los loci mitocondriales y mediante el locus por locus AMOVA para los microsatélites, los dos con 10,000 réplicas. Los valores pareados de diferenciación poblacional (Φ_{st} y R_{ST}) fueron estimados en Arlequín 3.5.2.2 (Excoffier y Lischer, 2010) con 10,000 réplicas y el nivel de significancia ajustado mediante la corrección secuencial de Bonferroni (Rice, 1989). El número de poblaciones discretas fue determinado mediante un análisis bayesiano de agrupamiento en el programa Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Se consideraron hasta 7 posibles poblaciones (K 1-7), el número de repeticiones en cada valor K fue 10. Para las simulaciones fueron consideradas 1,000 iteraciones para el periodo de calentamiento y 10,000 para el MCMC después del calentamiento, fue usado el modelo de mezcla sin tener en cuenta las localidades

y la frecuencia alélica se consideró independiente. De la probabilidad de pertenencia de cada individuo a una agrupación determinada fue obtenida una gráfica de barras en el mismo programa. El número de poblaciones fue determinado utilizando el método de Evanno et al. (2005) implementado en el programa Structure Harvester 0.6.94 (Earl y VonHoldt, 2012).

La magnitud del flujo genético histórico entre poblaciones fue estimado mediante simulación bayesiana usando el programa Migrate-n 3.3.2 (Beerli y Felsenstein, 2001). Las simulaciones fueron realizadas teniendo en cuenta los siguientes parámetros: el modelo de mutación para de los microsatélites fue movimiento Browniano mientras que para las secuencias de ADNmt fue Felsenstein (F84), para los dos marcadores se utilizó una cadena larga (tres repeticiones únicamente para las secuencias) con 200,000 genealogías muestreadas en incrementos de 50 genealogías (se muestreo una genealogía cada 50 simuladas), 1,000 réplicas para el calentamiento y un esquema de calefacción estática con cuatro cadenas simultaneas a 4 temperaturas (1., 1.5, 3 y 100). El número de migrantes efectivo por generación se determinó multiplicando la moda del estimador del tamaño poblacional (Θ) por el estimador de la tasa de migración (M).

4.2.5 Patrones filogeográficos

Se realizó una reconstrucción filogenética intraespecífica del ADNmt concatenado utilizando la indiferencia bayesiana implementada en MrBayes 3.2 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003). Se corrieron cuatro cadenas simultáneamente con 1,000,000 de generaciones, usando el GTR-T como modelo de sustitución, los indels no fueron considerados y *Z. xystrer* fue utilizada como grupo externo. Adicionalmente se realizó una red haplotípica de parsimonia estadística (TCS; Clement et al., 2002) implementada en PopART (Leigh y Bryant, 2015). Las relaciones filogenéticas y las diferencias genéticas entre las localidades muestreadas también se analizaron con los microsatélites, para ello fue construido un árbol del vecino más cercano (Neighbor-joining, NJ) mediante el programa TreeFit 1.2 (Kalinowski, 2009) usando distancias genéticas de Nei 1987 (Da) con 10,000 remuestreos. Para visualizar los árboles filogenéticos fue usado FigTree 1.4.2 (Rambaut y Drummond, 2007).

4.2.6 Sesgo en la dispersión de los sexos

Para evaluar si existen diferencias en la dispersión de machos y hembras fueron utilizados dos métodos. El primero mediante la comparación de la magnitud de la diferenciación genética poblacional teniendo

en cuenta los marcadores de herencia uniparental (ADNmt concatenada) y biparental (microsatélites) entre las localidades muestreadas (Prugnolle y de Meeus, 2002). El F_{ST} fue calculado teniendo en cuenta las frecuencias haplotípicas ($n=101$) en Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier y Lischer, 2010) y para hacer más robusta la comparación entre los estimadores fueron estandarizadas las medidas de diferenciación genética de los microsatélites (F'_{ST} , $n=262$) en RecodeData 0.1 (Meirmans, 2006) en Fstat 2.9.3.2 (Goudet, 2002). La prueba Kruskal-Wallis Rank sum (implementada en R 3.1.0) fue utilizada para comparar entre dos marcadores moleculares (métricas). El otro método toma en cuenta únicamente los marcadores de herencia biparental comparando los estadísticos entre ambos sexos ($n_H=80$, $n_M=64$, hembras y machos respectivamente) entre las localidades muestreadas. Para cada sexo fue determinado el F_{ST} así como la media y la variancia del Índice de Asignación (mAIC y vAIC respectivamente) en Fstat 2.9.3.2 (Goudet, 2002). La significancia estadística para la diferenciación genética en los dos métodos fue obtenida después de 10,000 permutaciones.

4.2.7 Aislamiento por distancia

Para determinar el efecto de la distancia geográfica sobre la diferenciación genética (Θ_{ST} y R_{ST}) y fue realizada una prueba de Mantel implementada en Isolation By Distance Web service 3.23 (Jensen et al., 2005). Las distancias geográficas fueron estimadas en línea recta a lo largo de la costa en kilómetros usando Google Earth.

4.3 Resultados

4.3.1 Heterogeneidad en la distribución de variabilidad del ADN mitocondrial

La longitud de la secuencia consenso de la RC fue de 605 pb y este locus fue el menos polimórfico, se detectaron únicamente cuatro haplotipos, el más abundante está presente en todas las localidades, mientras que el segundo más abundante es exclusivo para las localidades del GC; el tercer haplotipo menos frecuente se compartió exclusivamente en las localidades del sur de la Península, entre Bahía Magdalena y La Paz. La longitud del gen ND2 fue de 984 pb y mostró un poco más diversidad en comparación con la RC. Se detectaron 13 haplotipos de los cuales cuatro fueron compartidos, el haplotipo 1 (marcado con rojo) es el más abundante y presente en la mayoría de las localidades a excepción de Bahía Vizcaíno (Figura 7, ND2). Sin embargo, este es considerablemente más frecuente en las localidades del GC. Los haplotipos de colores fríos se comparten principalmente en las localidades de la CPBC. La longitud de las secuencias de la RNC fueron entre 520 a 621 pb, esta diferencia se debe a que

presentó un minisatélite de 100 nucleótidos que se repite en tándem tres o cuatro veces (ver Capítulo 2; Castillo-Páez et al., 2016). Este loci fue el más polimórfico y se detectaron 33 haplotipos, de los cuales nueve se compartieron. La distribución haplotípica muestra un patrón interesante en la que los haplotipos se comparten con las localidades más cercanas, (Figura 7, RNC). Los haplotipos de colores fríos se comparten principalmente entre las localidades de la CPBC y del sur de la costa oeste del GC, mientras que los haplotipos de color cálido en las localidades del GC. El haplotipo 9 (codificado con verde oscuro) está presente mayormente en Sinaloa (Localidad 7) y Mulegé (Localidad 4).

De la concatenación y alineamiento de los tres genes mitocondriales se obtuvo una secuencia consenso de 2,211 pares de bases (pb); las secuencias individuales variaron entre 2,108 y 2,210 pb. Se hallaron 43 sitios variables y 26 sitios informativos para parsimonia. Se identificaron 50 haplotipos distintos entre los individuos analizados (n=101), la mayoría (82 %) fueron haplotipos privados y únicamente se compartieron 9 (18 %) entre localidades. Algunos haplotipos son exclusivos para las regiones. La distribución geográfica de los haplotipos se codificó con colores fríos para aquellos de las localidades de la región de la CPBC y con colores cálidos para la región del GC (Figura 7, CAT). Sinaloa comparte un único haplotipo con las localidades del sur de la Península y se codificó de color verde.

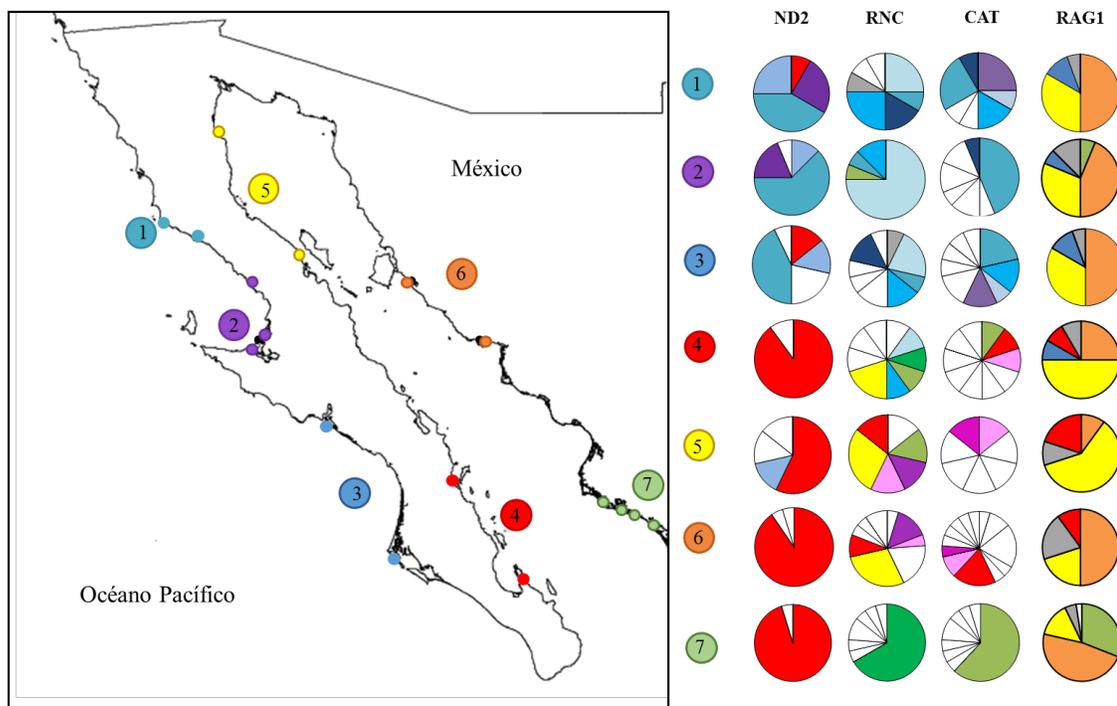


Figura 7: Distribución haplotípica de loci mitocondriales (ND2, RNC y CAT - concatenación de ND2, RC y RNC) y del gen nuclear RAG1 de *Z. exasperata*. El color blanco representa haplotipos privados para la localidad. Datos individuales de RC no se muestran.

La diversidad haplotípica (concatenada) en toda el área de estudio fue moderada a alta mientras que la diversidad nucleotídica fue baja y correlacionada positivamente con la diversidad haplotípica (correlación de Spearman's $r_s = 0.8482$; Tabla 9). Sinaloa es la localidad con la diversidad haplotípica y nucleotídica más baja (Sinaloa, $h = 0.6238$, $\pi = 0.0004$) mientras que las localidades del oeste del GC presentan las diversidades más altas.

Tabla 9: Diversidad genética de *Z. exasperata* del ADN mitocondrial (CAT - ND2, RC y RNC) y para el gen nuclear RAG1.

Localidad	ADNmt CAT				RAG1			
	n	A	$h \pm SD$	$\pi \pm SD$	n	A	Ho	He
PC	12	7	0.89 ± 0.06	0.0029 ± 0.0017	9	4	0.33	0.66
BV	16	7	0.80 ± 0.09	0.0018 ± 0.0011	8	5	0.50	0.73
SI	14	9	0.93 ± 0.04	0.0034 ± 0.0018	10	5	0.70	0.74
SG	10	10	1.00 ± 0.04	0.0032 ± 0.0019	6	5	0.50	0.73
NG	7	7	1.00 ± 0.08	0.0031 ± 0.0019	5	4	0.80	0.64
SO	21	13	0.93 ± 0.03	0.0023 ± 0.0013	5	4	0.60	0.73
SN	21	8	0.62 ± 0.12	0.0004 ± 0.0003	21	5	0.62	0.67
Total	101	50	0.96 ± 0.01	0.0033 ± 0.0017	64	8	0.58	0.73

n, tamaño de muestra; A, número de haplotipos o alelos; h , diversidad haplotípica; π , diversidad nucleotídica; Ho, heterocigosidad observada; He, heterocigosidad esperada; PC, Punta Canoas; BV, Bahía Vizcaíno; SI, San Ignacio; NG, Noroeste del Golfo de California; SG, Suroeste del Golfo de California; SO, Sonora; SN, Sinaloa.

4.3.2 Baja variabilidad genética en el ADN nuclear

RAG1: En elasmobranquios este gen es poco usado en estudios poblacionales debido a su bajo nivel de polimorfismo, a pesar de ello en el presente estudio se decidió utilizarlo y fue variable. Las secuencias tuvieron una longitud de 552 pb y fueron detectados cuatro sitios variables y tres informativos para parsimonia. Se identificaron ocho alelos, tres fueron compartidos en todas las localidades (Figura 7), el alelo 7 (marcado con rojo) estuvo presente únicamente en las localidades del GC a excepción de Sinaloa, mientras que el alelo 4 (marcado con azul) se presentó principalmente en las localidades de la CPBC y el sur oeste del GC. El alelo 1 (identificado con verde) se presentó en una localidad de la CPBC (Bahía Vizcaíno) y en mayor frecuencia en Sinaloa. La Ho varió más que la He (Tabla 9). Punta Canoas presentó la Ho más baja, mientras que noroeste del GC la más alta. La He es similar en todas las localidades. Cuando se analizaron las localidades agrupándolas de acuerdo a las cuatro poblaciones detectadas se obtuvo que todas las poblaciones se ajustaban a los supuestos de HWE antes y después de la corrección de Bonferroni (Tabla 10).

Tabla 10: Diversidad genética poblacional para el gen RAG1

Población	n	A	Ho	He	ρ HWE
CPBC	27	6	0.5185	0.7058	0.0692
COGC	11	5	0.6364	0.6710	0.8294
SO	5	4	0.6000	0.7333	0.3662
SN	21	5	0.6190	0.6706	0.5665

n, tamaño de muestra; A, número de haplotipos; CPBC, Costa del Pacífico de Baja California; COGC, Costa Oeste Golfo de California; SO, Sonora; SN, Sinaloa; ρ HWE, probabilidad de la prueba de ajuste al equilibrio de Hardy-Weinberg.

Microsatélites: La diversidad alélica en toda el área de estudio fue extremadamente baja. El máximo número de alelos por locus fue seis. La mayoría de los individuos para los loci ZAEX3-19 y ZAEX4-02 fueron heterocigotos por consiguiente presentaron valores elevados de H_o , valores negativos en el índice F_{is} y no se ajustaron a los supuestos del HWE en casi todas las localidades. La mayoría de los individuos del locus ZAEX3-22 fueron homocigotos, la H_o en la mayoría de las localidades fue baja y menor a la H_e , presentando valores positivos de F_{is} indicando déficit de heterocigotos en algunas localidades y en seis localidades no presentó desviación de HWE. De manera particular ZAEX3-10, ZAEX 4-22 y ZAEX4-42 presentaron valores bajos de H_o y H_e y estuvieron en HWE en la mayoría de las localidades (Tabla 11). De manera global, cuando se analiza cada microsatélite sin tener en cuenta las localidades, únicamente 3 (ZAEX3-09, ZAEX4-20 Y ZAEX4-12) loci se ajustan a los supuestos de HWE antes y después de las correcciones múltiples. Los loci ZAEX4-39, ZAEX4-42 y ZAEX3-26 presentaron alelos nulos y puede ser una de las razones de la desviación a los supuestos del HWE.

A nivel de localidad, el número de alelos varió muy poco presentando promedios entre 2.538 (San Ignacio) y 3.077 (Bahía Vizcaíno; Tabla 11). Las rayas del Noroeste del GC fueron homocigotas para dos loci mientras que las de Sonora y Sinaloa para un locus. En todas las localidades se presentaron alelos comunes de todos los loci. Bahía Vizcaíno, el Noroeste del GC, el Suroeste del GC y Sonora presentaron alelos exclusivos con baja frecuencia (<5 %) en uno o dos loci. De igual manera, Sinaloa presentó uno alelo exclusivo en tres loci pero la frecuencia de estos varió de baja a moderada (8.06 a 35.71 %, Anexo A). La distribución de las frecuencias alélicas varió muy poco a lo largo del área de estudio a excepción de Sinaloa, en donde la frecuencia alélica de seis loci (ZAEX2-29, ZAEX4-05, ZAEX4-41, ZAEX3-10, ZAEX3-19 y ZAEX4-39) varió notablemente (Anexo A). Las heterocigosidades variaron de bajas a moderadas, en promedio las H_o fueron mayores a las H_e , la probabilidad de encontrar un individuo heterocigoto fue menor o igual a 0.5 y en todas las localidades se detectó un déficit de heterocigotos (Tabla 11), a

excepción de Sinaloa aunque el valor estaba muy cercano a cero. La única localidad que se encontró en HWE fue el noroeste del GC. Sinaloa fue la única localidad que presentó alelos nulos en los loci 4-39 y 4-42 y puede ser la razón por la cual estos loci no se ajustan a los supuestos de HWE. Sin embargo, no cambiaron los patrones de estructuración ni de conectividad encontrados. No se encontraron pares de loci ligados antes ni después de las correcciones múltiples. Cuando se analizaron los datos de acuerdo a las cuatro poblaciones encontradas (una en la Costa del Pacífico de Baja California, otra en Costa Oeste Golfo de California, una más en Sonora, y la última en Sinaloa) ninguna se ajustó a los supuestos de HWE ni antes y ni después de la corrección de Bonferroni.

Tabla 11: Variabilidad genética de *Z. exasperata* en siete localidades.

Localidad	Parámetro	ZAEX2-29	ZAEX3-09	ZAEX3-22	ZAEX3-26	ZAEX4-05	ZAEX4-41	ZAEX3-10
PC	n	34	33	34	33	33	33	34
	A	3	4	3	3	4	2	2
	F _{is}	-0.1930	0.0320	0.4880	0.2090	-0.2650	-0.6410	-0.0650
	Ho	0.4412	0.5758	0.0588	0.3030	0.6667	0.7879	0.1471
	He	0.3709	0.5944	0.1141	0.3818	0.5291	0.4849	0.1383
	pHWE	0.5289	0.0773	0.0319	0.1126	0.5369	0.0002	1.0000
BV	n	65	69	71	69	71	65	71
	A	3	4	3	5	4	2	3
	F _{is}	-0.1840	0.0930	0.1310	0.0490	-0.3280	-0.6000	-0.0100
	Ho	0.4000	0.5217	0.1268	0.3768	0.7183	0.7539	0.0423
	He	0.3383	0.5749	0.1457	0.3963	0.5423	0.4734	0.0419
	pHWE	0.3549	0.3152	0.0126	0.4028	0.0001	0.0000	1.0000
SI	n	26	25	27	27	25	27	27
	A	3	4	3	2	4	2	2
	F _{is}	-0.4380	-0.2600	0.7900	0.0030	-0.2900	-0.5200	0.0000
	Ho	0.6923	0.7600	0.0370	0.4074	0.7200	0.7407	0.0370
	He	0.4857	0.6065	0.1740	0.4088	0.5616	0.4919	0.0370
	pHWE	0.0499	0.5370	0.0010	1.0000	0.6133	0.0139	1.0000
NG	n	11	13	12	12	12	12	13
	A	3	4	2	2	4	2	1
	F _{is}	-0.1270	0.2080	-0.0480	-0.1000	-0.4970	-0.2220	-
	Ho	0.3636	0.5385	0.1667	0.2500	0.8333	0.4167	-
	He	0.3247	0.6738	0.1594	0.2283	0.5688	0.3442	-
	pHWE	1.0000	0.2932	1.0000	1.0000	0.1347	1.0000	-
SG	n	44	37	47	47	43	45	44
	A	3	5	2	4	4	3	2
	F _{is}	-0.2870	-0.0280	-0.0110	0.1130	-0.3880	-0.6390	0.0000
	Ho	0.5000	0.6757	0.0425	0.3404	0.7907	0.8667	0.0227
	He	0.3898	0.6575	0.0421	0.3832	0.5724	0.5326	0.0227
	pHWE	0.1418	0.0032	1.0000	0.0026	0.0083	0.0000	1.0000
SO	n	37	36	37	36	37	37	37
	A	3	5	3	3	3	3	1
	F _{is}	-0.1570	-0.0630	0.3010	-0.0190	-0.6200	-0.2260	-
	Ho	0.3784	0.6389	0.1081	0.3333	0.8108	0.5405	-
	He	0.3277	0.6013	0.1540	0.3271	0.5046	0.4424	-
	pHWE	1.0000	0.6346	0.0213	1.0000	0.0006	0.1016	-
SN	n	25	30	31	28	29	29	31
	A	3	3	2	2	4	3	4
	F _{is}	-0.5860	-0.0340	0.0000	0.2390	-0.0820	0.0590	0.1180
	Ho	0.8800	0.5667	0.0323	0.3571	0.7586	0.2069	0.6129
	He	0.5616	0.5486	0.0323	0.4675	0.7024	0.2196	0.6933
	pHWE	0.0006	0.2587	1.0000	0.2404	0.2101	0.1184	0.2344

n, tamaño de muestra; A, número de alelos; F_{is}, coeficiente de endogamia; Ho, heterocigosidad observada; He, heterocigosidad esperada; pHWE, probabilidad de la prueba de ajuste al equilibrio de Hardy-Weinberg valores en negritas representan la significancia después de la corrección de Bonferroni ($\alpha = 0.05$); CPBC, Costa del Pacífico de Baja California; PC, Punta Canoas; BV, Bahía Vizcaíno; SI, San Ignacio; GC, Golfo de California; NG, Noroeste del Golfo de California; SG, Suroeste del Golfo de California; SO, Sonora; SN, Sinaloa; (-), no disponible.

Tabla 11: Continuación. Variabilidad genética de *Z. exasperata* en siete localidades.

Localidad	Parámetro	ZAEX3-19	ZAEX4-02	ZAEX4-20	ZAEX4-22	ZAEX4-39	ZAEX4-42	Promedio
PC	n	33	34	33	34	33	28	33
	A	3	2	4	2	2	2	2.7692
	F _{is}	-0.5630	-1.0000	0.0280	-0.0310	0.0500	-0.1490	-0.2310
	Ho	0.7576	1.0000	0.5455	0.0882	0.4545	0.2857	0.4702
	He	0.4890	0.5075	0.5608	0.0856	0.4779	0.2494	0.3834
	ρ HWE	0.0005	0.0000	0.8304	1.0000	1.0000	1.0000	<0.0001
BV	n	68	71	70	71	49	60	66.928
	A	3	2	4	2	3	2	3.077
	F _{is}	-0.6450	-1.0000	-0.0900	-0.0530	0.1230	-0.0260	-0.2660
	Ho	0.8529	1.0000	0.6571	0.1127	0.4082	0.0668	0.4644
	He	0.5211	0.5035	0.6031	0.1071	0.4648	0.0645	0.3675
	ρ HWE	0.0000	0.0000	0.2605	1.0000	0.6846	1.0000	<0.0001
SI	n	27	26	27	27	26	24	26.231
	A	2	2	3	2	2	2	2.538
	F _{is}	-1.0000	-1.0000	-0.0830	-0.0200	0.0180	-0.0700	-0.3370
	Ho	1.0000	1.0000	0.5557	0.0741	0.5000	0.1667	0.5147
	He	0.5094	0.5098	0.5136	0.0727	0.5091	0.1560	0.3874
	ρ HWE	0.0000	0.0000	0.5380	1.0000	1.0000	1.0000	<0.0001
NG	n	12	13	10	13	8	11	11.6365
	A	2	2	4	2	2	1	2.6360
	F _{is}	-0.6920	-0.8460	-0.2130	-0.0910	-0.4000	-	-0.3050
	Ho	0.8333	0.9231	0.6000	0.2301	0.6250	-	0.5255
	He	0.5073	0.5169	0.5000	0.2123	0.4583	-	0.4086
	ρ HWE	0.0630	0.0055	1.0000	1.0000	0.4871	-	0.3590
SG	n	44	41	45	45	41	38	43.1540
	A	3	2	3	2	2	2	2.8460
	F _{is}	-0.8310	-1.0000	-0.2680	-0.3540	0.3240	-0.0420	-0.3300
	Ho	0.9318	1.0000	0.6222	0.5333	0.3415	0.1053	0.5209
	He	0.5139	0.5062	0.4921	0.3955	0.5035	0.1011	0.3933
	ρ HWE	0.0000	0.0000	0.0053	0.0201	0.0577	1.0000	<0.0001
SO	n	37	37	37	35	35	35	36.3350
	A	3	2	3	2	2	2	2.8330
	F _{is}	-0.9470	-0.8950	0.0310	-0.0970	0.2610	-0.0630	-0.2730
	Ho	1.0000	0.9459	0.4595	0.2000	0.3714	0.1429	0.4942
	He	0.5202	0.5054	0.4739	0.1826	0.5006	0.1346	0.3895
	ρ HWE	0.0000	0.0000	1.0000	1.0000	0.1718	1.0000	<0.0001
SN	n	31	27	30	24	25	16	27.6670
	A	4	2	3	1	3	2	2.9170
	F _{is}	-0.3410	-0.8570	0.2370	-	0.5520	0.8820	0.0020
	Ho	0.8710	0.9259	0.3000	-	0.2400	0.0625	0.4845
	He	0.6531	0.5066	0.3915	-	0.5298	0.5141	0.4850
	ρ HWE	0.0309	0.0001	0.0193	-	0.0037	0.0004	<0.0001

4.3.3 Patrones de diferenciación poblacional de *Z. exasperata* en el Norte del Pacífico mexicano

Se detectó diferenciación poblacional entre las muestras de la guitarra rayada del NPM con los tres marcadores moleculares, así como un moderado a alto porcentaje de variación dentro de las localidades (Tabla 12). Tanto el ADNmt como los genes nucleares mostraron estructura genética significativa (ADNmt: $\Phi_{ST-CAT} = 0.38$ $P < 0.0001$; ADNn: $\Phi_{ST-RAG1} = 0.07$, $P = 0.0064$; $R_{ST-Microsatélites} = 0.11$, $P < 0.0001$). Las comparaciones pareadas tanto del ADNmt como de los microsatélites indican que Sinaloa fue la única localidad que se diferenció de todas las otras localidades. Se encontraron elevados y significativos valores de Φ_{ST} y R_{ST} pareados de Sinaloa versus el resto de las localidades (Tabla 13). El análisis bayesiano de agrupamiento (clúster analysis) arrojó que los datos se ajustan mejor a la existencia de dos grupos genéticos en equilibrio ($K=2$). En conformidad con esto, todos los peces de Sinaloa pertenecieron a un clúster independiente (rojo en Figura 8) mientras que el resto de las muestras (salvo un posible migrante) forman un segundo clúster (verdes en Figura 8). El gen RAG1 mostró congruencia a pesar de que la única comparación significativa fue entre Sinaloa y el Noroeste del GC ($\Phi_{ST} = 0.2589$, $P = 0.001$).

El resto de las localidades mostraron un patrón complejo e interesante. Se detectaron diferencias poblacionales con el ADNmt pero no con los genes nucleares. De manera general, las comparaciones entre localidades cercanas presentaron valores de Φ_{ST} bajos y no significativos, mientras que aquellas de localidades más alejadas arrojaron valores elevados y significativos (Tabla 13). Sonora mostró un alto grado de diferenciación con la mayoría de las localidades, con excepción de la localidad más cercana (Sonora vs Noroeste del GC) de la que no se diferenció. Las localidades de la costa oeste del GC podrían considerarse como una zona de transición, entre ellas no hubo diferenciación y entre localidades cercanas a estas tampoco. Las tres localidades de la CPBC no mostraron diferencias significativas entre ellas.

Tabla 12: Análisis de varianza molecular (AMOVA) en siete localidades del norte del Pacífico mexicano para *Z. exasperata* basados en tres genes del ADN mitocondrial concatenados, un gen nuclear y 13 microsatélites.

Loci	Fuente de variación	GL	% de variación	Φ_{ST}/R_{ST}	p-valor
ADNmt	Entre localidades	6	38.28		
	Dentro de las localidades	94	61.72		
	Total	100		0.38	<0.0001
Microsatélites	Entre localidades	6	11.46		
	Dentro de las localidades	517	88.54		
	Total	523		0.11	<0.0001
RAG1	Entre localidades	6	6.83		
	Dentro de las localidades	121	93.17		
	Total	127		0.07	0.0064

GL, grados de libertad.

Tabla 13: Comparaciones pareadas de Φ_{ST-CAT} de ADNmt (encima de la diagonal) y R_{ST} de microsatélites (debajo de la diagonal) de *Z. exasperata*.

Localidad	PC	BV	SI	SG	NG	SO	SN
PC		0.0097	0.0000	0.1929	0.3313	0.4645	0.5621
BV	0.0026		0.0162	0.3799	0.4941	0.5714	0.6854
SI	0.0139	0.0172		0.1456	0.2568	0.3887	0.4903
SG	0.0088	0.0169	0.0000		0.0441	0.1877	0.4181
NG	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000		0.0000	0.6177
SO	0.0066	0.0182	0.0006	0.0000	0.0000		0.5804
SN	0.3344	0.3056	0.3027	0.2923	0.3401	0.3067	

Valores significativos después de la corrección de Bonferroni en negritas ($p < 0.05$); PC, Punta Canoas; BV, Bahía Vizcaíno; SI, San Ignacio; NG, Noroeste del Golfo de California; SG, Suroeste del Golfo de California; SO, Sonora; SN, Sinaloa.

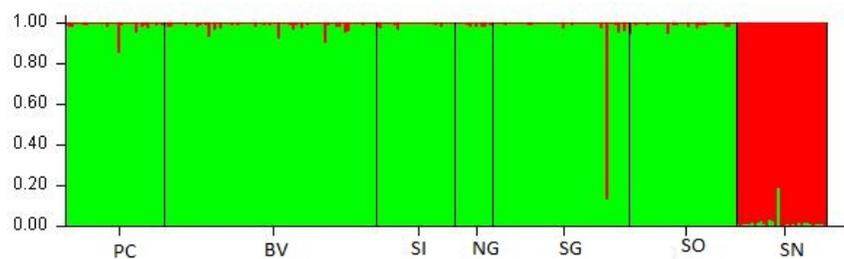


Figura 8: Asignación individual a cada población ($K=2$) asumiendo una frecuencia alélica independiente, PC, Punta Canoas; BV, Bahía Vizcaíno; SI, San Ignacio; NG, Noroeste del Golfo de California; SG, Suroeste del Golfo de California; SO, Sonora; SN, Sinaloa.

4.3.4 Conectividad poblacional de *Z. exasperata* en el Norte del Pacífico mexicano

El flujo genético histórico fue considerablemente más alto con los microsátelites que con el ADNmt (secuencias concatenadas, Figura 9). Considerando el ADNmt, las hembras de *Z. exasperata* mostraron un nivel de aislamiento significativo y, por consiguiente, una baja conectividad. En la mayoría de los casos, se requirieron al menos cuatro generaciones para que una hembra migrante llegará a otra localidad. Sin embargo, algo interesante ocurrió en las localidades de la costa oeste del GC, la intensidad del flujo genético fue alto en comparación con otras localidades, en donde recibieron entre 4 y 48 hembras migrantes por generación del resto de localidades. Las estimaciones del flujo genético con los microsátelites mostró un patrón diferente, migraron entre 3.5 y 32 individuos. Sin embargo, cabe resaltar que el flujo hacia las localidades de la CPBC fue el más bajo.

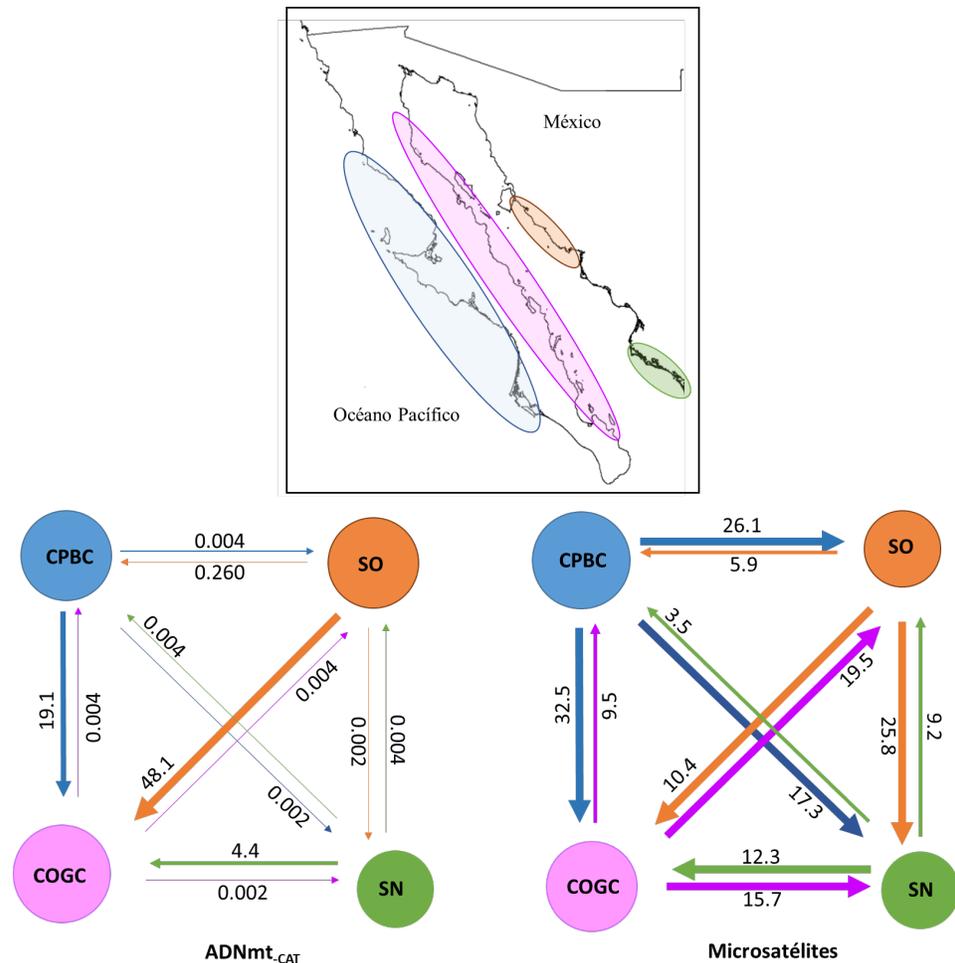


Figura 9: Flujo genético histórico de *Z. exasperata* estimado a partir de marcadores moleculares. CPBC, Costa del Pacífico de Baja California; COGC, Costa Oeste Golfo de California; SO, Sonora; SN, Sinaloa; ADNmt_{CAT}, concatenación de tres genes mitocondriales ND2, RC y RNC. Las flechas indican la dirección del flujo genético son proporcionales al número de migrantes por generación (N_m). El tamaño de los círculos es proporcional al estimador del tamaño efectivo poblacional (θ).

4.3.5 Patrones filogeográficos de *Z. exasperata* en el Norte del Pacífico mexicano

Se encontró una delimitación filogeográfica clara y consistente con ambos tipos de marcador molecular. Si bien el árbol filogenético del ADNmt no se resolvió del todo, se lograron formar dos clados moderadamente soportados (>50 % bootstrap, Figura 10 a y b). El clado *a* agrupa la mayoría de los haplotipos de las localidades del GC (Noroeste del GC, Suroeste del GC y Sonora), mientras que el clado *b* todos los haplotipos de Sinaloa y la mayoría de los haplotipos de las localidades de CPBC. Dentro del clado *b* se formaron dos subclados que separaron la mayoría de los haplotipos de Sinaloa de los de las otras localidades. Esto sugiere que los individuos de Sinaloa y CPBC están más cercanamente relacionados filogenéticamente entre sí que con los individuos del GC. En la red haplotípica del ADNmt se observó el mismo patrón filogeográfico. Todos los haplotipos de Sinaloa estaban conectados entre sí (Figura 11b).

De igual manera, la mayoría de los haplotipos de Sonora están conectados con haplotipos de las localidades del Noroeste del GC y del Suroeste del GC conformando un grupo de haplotipos del GC (Figura 11c). Gran parte de los haplotipos de las localidades de CPBC estaban conectados entre sí (Figura 11a). Los individuos de Suroeste del GC están presentes en todas las agrupaciones o clados. Las relaciones filogeográficas de los microsatélites mostraron un patrón similar, las localidades de la CPBC (PC, BV y SI) se encontraron cercanas y conectadas entre sí. Lo mismo ocurrió con las localidades del GC (SO, NG y SG). Cabe resaltar que el suroeste del GC se conectó con las localidades de la CPBC (Figura 12). Sinaloa fue la localidad que presentó la mayor distancia genética. Sin embargo, se conectó con las localidades de la CPBC similar a lo encontrado con el ADNmt.

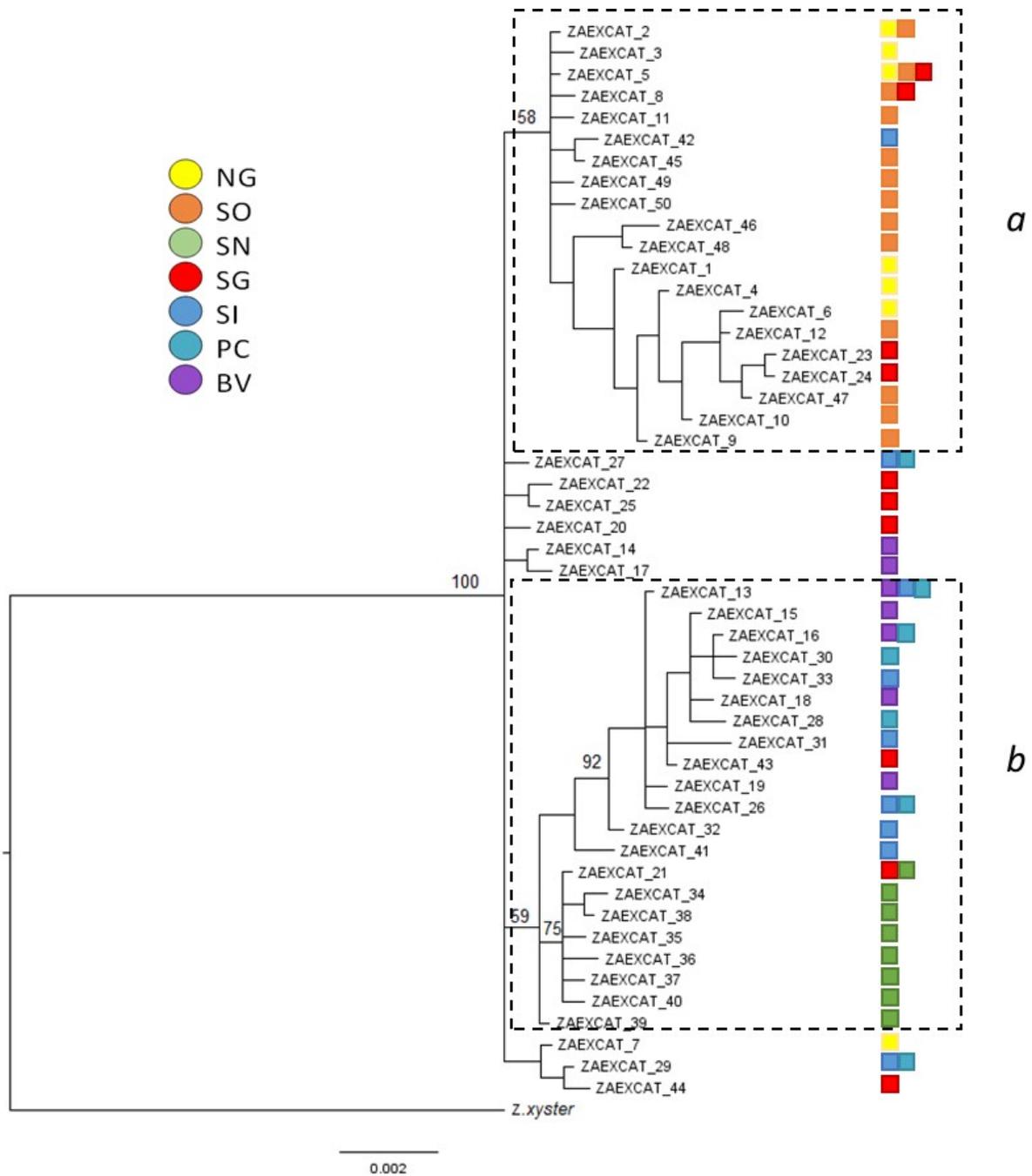


Figura 10: Árbol filogenético bayesiano enraizado de los cincuenta haplotipos generados de la concatenación de tres genes mitocondriales. NG, Noroeste del Golfo de California; SO, Sonora; SN, Sinaloa; SG, Suroeste; SI, San Ignacio; PC, Punta Canoas; BV, Bahía Vizcaíno.

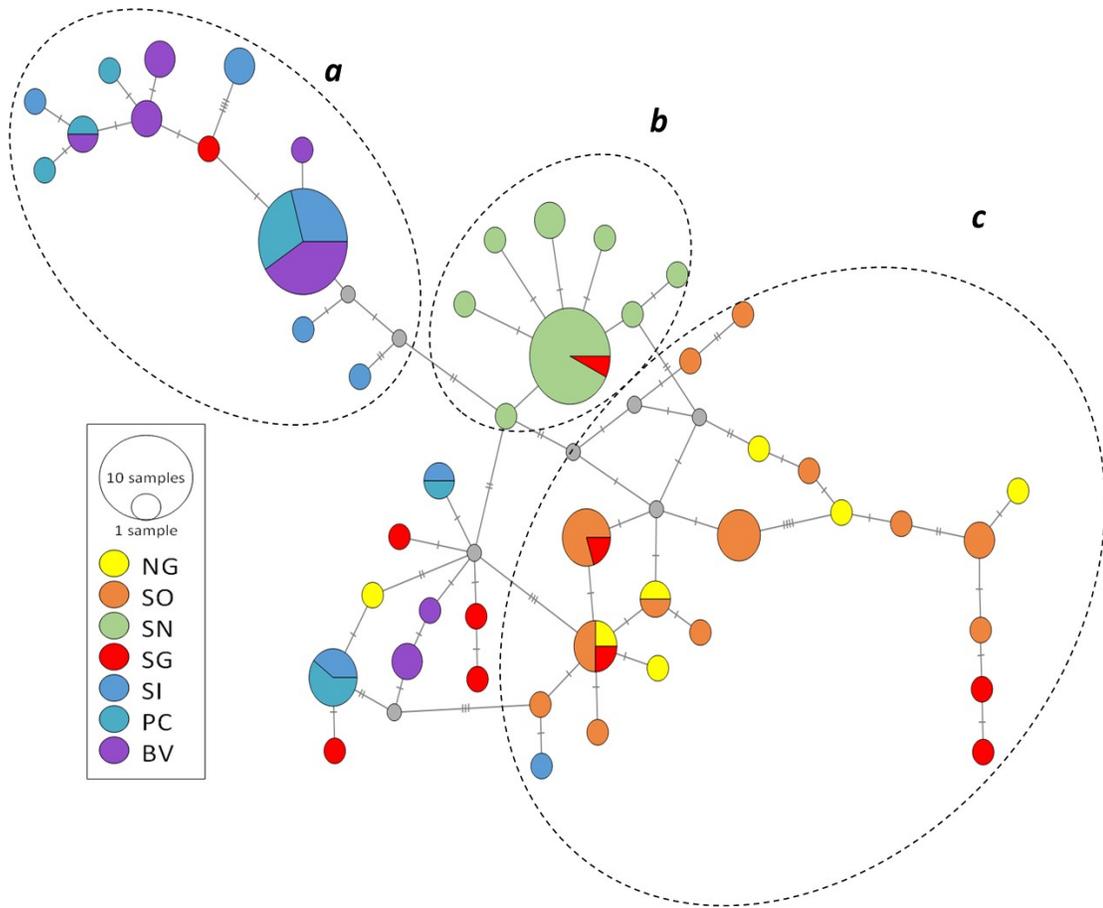


Figura 11: Red haplotípica de parsimonia estadística (TCS) del ADNmt concatenado de *Zapteryx exasperata*. El tamaño de los círculos representa la frecuencia haplotípica, los colores la localidad de procedencia, los círculos grises son haplotipos que faltan y las líneas representan un paso mutacional. NG, Noroeste del Golfo de California; SO, Sonora; SN, Sinaloa; SG, Suroeste; SI, San Ignacio; PC, Punta Canoas; BV, Bahía Vizcaíno.

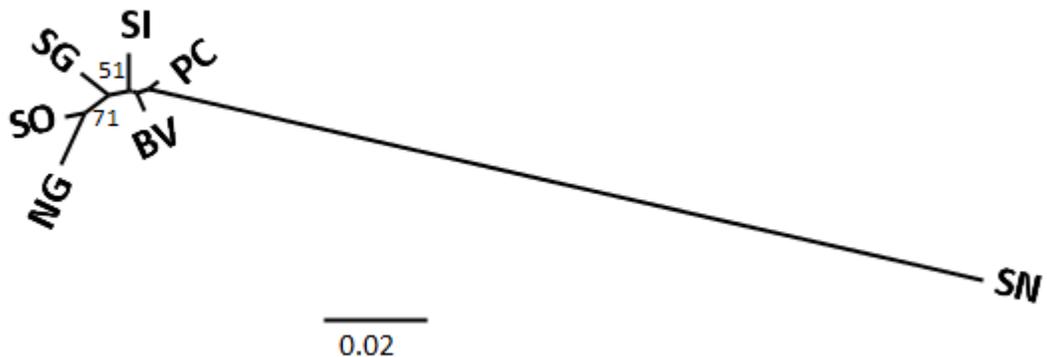


Figura 12: Dendrograma radial no enraizado del vecino más cercano (neighbor-joining) de microsatélites representando las relación y las distancias genéticas de las localidades muestreadas. Se muestran valores de bootstrap >50 %. R^2 de 0.998 del método de Nei (1987, Da). NG, Noroeste del Golfo de California; SO, Sonora; SN, Sinaloa; SG, Suroeste; SI, San Ignacio; PC, Punta Canoas; BV, Bahía Vizcaíno.

4.3.6 La dispersión de machos y hembras no difiere

No hay evidencia de sesgo en la dispersión de ambos sexos. La comparación de los valores pareados de los índices de fijación uniparentales (ADNmt, F_{ST}) y biparentales (microsatélites, F'_{ST}) no fueron estadísticamente significativos (Kruskal-Wallis Rank sum test; $p = 0.4579$) a nivel poblacional. Resulta interesante que todos los valores pareados de F_{ST} de la localidad Sinaloa fueron más bajos que los F'_{ST} (Tabla 14) contrario al resto de localidades. Los valores de mAIC y vAIC fueron lo opuesto a lo esperado. La mAIC para las hembras fue negativa y mucho más baja que la de los machos indicando que en promedio las hembras no nacieron en el lugar donde fueron muestreadas. La vAIC debió de ser menor en las hembras que en los machos puesto que estos se dispersan y se puede encontrar una mezcla de residentes y migrantes (Tabla 15). Los resultados no cambiaron cuando se agruparon de acuerdo a las cuatro poblaciones encontradas.

Tabla 14: Valores de F_{ST} pareados del ADN mitocondrial concatenado y de los microsatélites

Localidades pareadas	F_{ST} ADNmt	F'_{ST} Microsatélites
PC vs BV	0.0449	0.0000
PC vs SI	0.0000	0.0092
PC vs SG	0.0542	0.0380
PC vs NG	0.0571	0.0241
PC vs SO	0.0852	0.0385
BV vs SI	0.0442	0.0139
BV vs SG	0.1062	0.0358
BV vs NG	0.1123	0.0172
BV vs SO	0.1312	0.0372
SI vs SG	0.0341	0.0172
SI vs NG	0.0358	0.0445
SI vs SO	0.0663	0.0446
SG vs NG	0.0000	0.0388
SG vs SO	0.0068	0.0293
NG vs SO	0.0168	0.0000
SN vs PC	0.2548	0.3591
SN vs BV	0.2927	0.3979
SN vs SI	0.2316	0.3602
SN vs SG	0.1555	0.3870
SN vs NG	0.2253	0.3799
SN vs SO	0.2214	0.3754

Tabla 15: Valores de la prueba de sesgo en la dispersión de los sexos de *Z. exasperata* basados en marcadores biparentales, microsatélites.

	n	F _{ST}	mAIC	vAIC
Hembra	80	0.1248	-0.0894	6.2666
Macho	65	0.1029	0.1099	5.4015
Significancia		0.7290	0.5950	0.5580

n, número de individuos; F_{ST} índice de fijación; mAIC, media del índice de asignación; vAIC, variancia de índice de asignación

4.3.7 Aislamiento por distancia

La correlación entre distancias genética y geográfica fue positiva y estadísticamente significativa ($r=0.7076$, $p=0.001$, Figura 13) en el ADN mitocondrial, indicando que a medida que aumenta la distancia geográfica disminuye la similitud genética. Sin embargo, no lo fue con los microsatélites ($r=0.3295$, $p=0.073$, Figura 13).

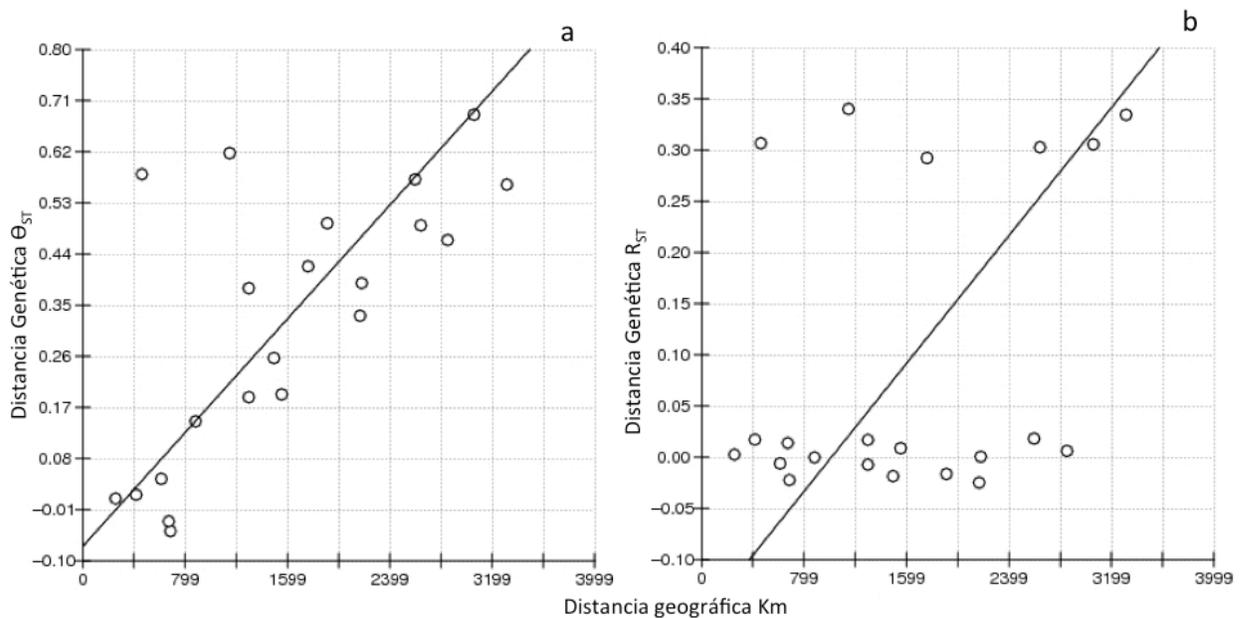


Figura 13: Prueba de Mantel. a) distancia genética del ADN mitocondrial y b) Distancia genética del ADN nuclear.

4.4 Discusión

Los patrones de estructura poblacional de *Z. exasperata* en el NPM son complejos. La diferenciación poblacional fuerte y significativa a lo largo del NPM y el bajo flujo genético entre poblaciones pueden

deberse a aislamiento por distancia y barreras físicas. Las poblaciones de la guitarra rayada presentan tres tipos de variación: fenotípica, genética y espacial.

4.4.1 La baja diversidad del genoma de la guitarra rayada

Los loci mitocondriales y nucleares analizados en el presente estudio muestran una diversidad extremadamente baja a lo largo del área de estudio, con excepción del locus RNC del ADNmt. Puesto que la RC no está sujeta a selección es de esperarse que sea más polimórfica que el gen codificante ND2. No obstante, como se ha encontrado para esta especie (Castillo-Páez et al., 2014) y otros elasmobranquios, la RC no es la más polimórfica del mtDNA y por esta razón los estudios filogenéticos y poblacionales a este grupo de peces se realizan con genes codificantes como el ND2 y ND4 (Naylor et al., 2012). Si únicamente se hubieran analizado los loci ND2 y RC no se hubiera detectado la diferenciación poblacional en Sinaloa, ya que ésta presenta el mismo haplotipo y con similar frecuencia que otras localidades como Sonora (Figura 7). Esto es relevante, ya que se demuestra que si se hacen estudios poblacionales únicamente con el gen ND2 posiblemente se esté subestimando la diversidad genética y la diferenciación poblacional de una especie. El locus que está marcando la diferenciación es la RNC cuyo descubrimiento solo fue posible al secuenciar el genoma mitocondrial en su totalidad (Capítulo 2; Castillo-Páez et al., 2016); este locus mitocondrial es el más polimórfico e informativo de la guitarra rayada, tiene un gran número de haplotipos privados y los haplotipos compartidos lo hacen entre zonas cercanas mostrando un gradiente espacial (Figura 7). No obstante, dicho locus no ha sido descrito en otras especies de batoideos. Este descubrimiento da crédito a los esfuerzos de secuenciación de mitogenomas, que permiten descubrir regiones que de otra forma pasarían inadvertidas.

Las diversidades haplotípicas y nucleotídicas se estimaron mediante la concatenación de los loci mitocondriales, todas las localidades muestran altos valores de diversidad, con excepción de Sinaloa en donde fue moderada (Tabla 9). Puede ser que la baja diversidad haplotípica y nucleotídica que muestra Sinaloa corresponda con una población periférica de *Z. exasperata* o con el límite de la distribución más norteño de una población que se distribuye al sur de Sinaloa en el centro y sur de México. Se ha identificado que las poblaciones periféricas muestran una diversidad genética mucho más baja que las centrales (Lesica y Allendorf, 1995). En contraparte, la alta diversidad haplotípica que se presenta en la Costa Oeste del GC se debe a que es una zona de mezcla, en donde convergen los individuos de la CPBC y Sonora.

Los microsatélites suelen ser de los marcadores moleculares más polimórficos e informativos. Sin embargo, en la guitarra rayada el número de alelos por localidad fue extremadamente bajo; en promedio no se encuentran más de tres alelos por locus. Las heterocigosidades son bajas y la probabilidad de encontrar un individuo heterocigoto en toda el área de estudio es menor al 50 %, todas las localidades presentan déficit de heterocigotos. Sin embargo, al parecer esto no es algo anómalo en batoideos y algunas especies con hábitos bentónicos muestran un patrón similar. El número de alelos promedio para dos poblaciones de *Raja pulchra* en Corea del Sur fue de 4.7 y 4.9 y sus H_o promedio fueron entre 0.56 y 0.577, muy similar a lo encontrado en las localidades de *Z. exasperata* (Kang et al., 2012). Sin embargo, *R. pulchra* únicamente presentó déficit de heterocigotos en un par de locus y una población (Sinaloa), pero esto fue ocasionado por la presencia de alelos nulos y no por un efecto como la endogamia o subestructuración poblacional que podría afectar a todo el genoma (Kang et al., 2012). No obstante, el déficit de heterocigotos y el desajuste a los supuestos de HWE en la mayoría de localidades de *Z. exasperata* puede deberse a procesos que las poblaciones sufrieron como un recientemente un cuello de botella, una expansión, endogamia o un efecto Wahlund.

No se sabe si las poblaciones de la guitarra rayada han colapsado, pero se sabe que *Z. exasperata* es un componente importante en la pesquería artesanal en el NPM lo que puede reducir el tamaño de la población y la diversidad genética (Blanco-Parra et al., 2009b; Cartamil et al., 2011; Ramirez-Amaro et al., 2013). Puede ser que la especie presente alguna conducta que promueva la reproducción entre organismos cercanos como la filopatría, pero en el presente estudio no se detectó que dicho fenómeno ocurra en esta especie, sugiriendo que los organismos pueden dispersarse y reproducirse con individuos de otras poblaciones. El efecto Wahlund ocurre cuando dos o más subpoblaciones son muestreadas inadvertidamente como una sola población. Sin embargo, no se detectó ninguna subdivisión poblacional.

Por varias décadas se ha reconocido que las tasa de evolución molecular de los elasmobranquios es significativamente menor que la de los vertebrados homeotermos (ver Martin et al., 1992). El presente trabajo da cuenta de una tasa de evolución molecular muy baja en la guitarra rayada, no solo en el ADNmt sino también el genoma nuclear (RAG1 + microsatélites). Es posible que esta sea una condición basal en esta especie de elasmobranquio con hábitos demersales, ya que no se tiene conocimiento de que sus poblaciones hayan pasado por un cuello de botella.

Fuera de toda expectativa, el gen nuclear RAG1 fue informativo al mostrar señal geográfica. No obstante, únicamente se detectó diferenciación poblacional únicamente entre un par de localidades. Esto puede deberse a: i) la tasa de evolución baja que se ha encontrado para este gen (Dudgeon et al., 2012; Sclavi y

Herrick, 2013), puesto que en algunas especies de tiburones se ha encontrado extremada baja diversidad alélica e incluso en algunos especies solo se ha encontrado un alelo para todas las poblaciones (ver Boomer et al., 2012; Tillett et al., 2012a), o ii) al tamaño de muestra que se ha analizado ($n=64$), puede ser que este sea muy pequeño, dada la baja variabilidad y no ser lo suficiente para encontrar dicha señal poblacional.

4.4.2 Poblaciones alopátricas en ambas costas de la Península de Baja California

Ya se habían descrito dos linajes matrilineales de *Z. exasperata* en el NPM, uno en la CPBC y otro en el estado de Sonora (Castillo-Páez et al., 2014). En el presente trabajo se aumentó el número de loci, de individuos y de localidades analizadas para obtener un panorama más completo de los patrones de estructura y conectividad genética poblacional. Si bien se confirma la presencia de las dos poblaciones anteriormente descritas, se encontró que la Costa Oeste del GC es una zona de mezcla. El flujo genético histórico es asimétrico y con una mayor intensidad desde las poblaciones de Sonora y la CPBC hacia la Costa Oeste del GC (Figura 9). De igual manera, tanto en el árbol filogenético como en la red haplotípica se puede visualizar que los individuos del noroeste y suroeste del GC se encuentran dispersos en la topología (Figura 10 y 11).

Un escenario completamente diferente se observó con el ADNn. La distribución de las frecuencias alélicas para todas las localidades (con excepción de Sinaloa) es homogénea. Sugiriendo que hay una población panmíctica en ambas costas de la Península de Baja California. El único estudio con microsatélites en un batoideo bentónico simpátrico observó un patrón similar. En *Urobatius halleri*, no se encontró diferenciación poblacional entre Sonora, en el GC y California en Estados Unidos (Plank et al., 2010). Posiblemente la discrepancia entre marcadores moleculares se explique en parte por las diferentes tasas mutacionales entre el ADNmt y el ADNn, puesto que los microsatélites tienen una tasa de mutación mucho más alta que los genes mitocondriales. El tamaño efectivo poblacional también influye en las diferencias entre marcadores, la teoría génica predice que en los sistemas haploides el tamaño efectivo poblacional es cuatro veces menor que en los sistemas diploides (Prugnolle y de Meeus, 2002).

Castillo-Páez et al. (2014) hipotetizaron sobre las posibles barreras que limitan la conectividad entre estas poblaciones, incluyendo un evento de vicarianza por el surgimiento de la península de Baja California, factores abióticos contrastantes entre los hábitats de las poblaciones y la filopatría

reproductiva femenina. En el presente estudio se evaluó con un mayor número de genes y muestras si el sesgo en la dispersión de los sexos o el aislamiento por distancia actúan como barreras para la dispersión. A pesar de los patrones contrastantes entre los marcadores moleculares no se encontró evidencia de que un sexo se disperse más que el otro, contradiciendo cualquier expectativa. Este fenómeno ha sido frecuentemente encontrado en los tiburones de hábitos pelágicos (Daly-Engel et al., 2012), pero no hay registro en los batoideos (Flowers et al., 2016), ya sea por falta de estudios o porque no se presenta dicho fenómeno en este grupo de peces. Por ejemplo, en *Aetobatos narinari* no se encontraron diferencias entre los F_{ST} de los machos y las hembras. Sin embargo, este resultado se debe de tomar con cautela por el tamaño de muestra bajo (Sellas et al., 2015). En contraparte, se puede decir que la distancia geográfica si está actuando como barrera para la dispersión en la guitarra rayada. Al menos parece jugar un papel limitante en la dispersión de las hembras puesto que se encontró una correlación positiva entre la distancia geográfica y genética mitocondrial.

La guitarra rayada en Laguna Manuela en la CPBC es capturada principalmente con redes de enmalle y generalmente a dos kilómetros de la costa y a una profundidad no mayor de 20 m. Los sustrato en dicha zona es fangoso, arenoso y arrecife rocoso, en estos dos últimos sustratos es donde se captura más la guitarra rayada. Al igual que en Laguna Manuela, en el estado de Sonora *Z. exasperata* es capturada con el mismo arte de pesca pero a profundidades mayores entre los nueve y 54 m. No obstante, se han encontrado que la guitarra rayada también está asociada a áreas con profundidades entre 100 y 200 m con elevada captura de individuos tanto en el California como en Sonora (Blanco-Parra et al., 2009b). Al parecer la preferencia de hábitat en Sonora es el arrecife rocoso (Blanco-Parra et al., 2009b). Las capturas de la guitarra rayada en Sinaloa son de los arrastres de camarón, y principalmente este arte de pesca captura a las rayas entre los nueve y 64 m de profundidad pero mucho más lejos de la costa a los 50 km.

4.4.3 La población de Sinaloa es morfológica y genéticamente diferenciada

Los individuos colectados en Sinaloa son fenotípicamente distintos a los de las demás localidades y se identificaron originalmente como *Z. xyster*, puesto que sus caracteres diagnósticos (morfológicos y de coloración) coinciden con los de la descripción de esta especie. Sin embargo, los análisis moleculares indican que estos organismos pertenecen a la especie *Z. exasperata* (Capítulo 3; Castillo-Páez et al., 2017b), al no presentar niveles de divergencia genética interespecífica con el resto de los organismos identificados como *Z. exasperata*. No obstante, el análisis genético poblacional revela que las rayas de

Sinaloa forman una población diferenciada de *Z. exasperata* en el NPM. La distribución de las frecuencias haplotípicas de los genes del ADNmt presenta un patrón más heterogéneo. El único haplotipo que comparte Sinaloa lo hace con una sola localidad (Mulegé) de toda el área de estudio (Figura 7). De igual manera, en algunos loci microsatelitales, los electroferogramas mostraron patrones diferentes y alelos exclusivos para esta localidad. Los valores de Φ_{ST} pareados de Sinaloa versus otras localidades son similares a los observados entre Sonora y las localidades de la CPBC. No obstante, los valores pareados de R_{ST} de Sinaloa versus todas las localidades son al menos un orden de magnitud mayor que los del resto de las comparaciones.

Es interesante que, a pesar de la corta distancia geográfica que hay entre El Estero del Soldado (en Sonora) y Sinaloa, así como entre La Paz (en Suroeste del GC) y Sinaloa, estas localidades alberguen poblaciones diferentes de guitarra rayada. Es muy probable que este aislamiento se deba por el ambiente y puede que exista una barrera no detectada que impida la dispersión de las rayas de Sonora hacia el sur y de las rayas de Sinaloa hacia el norte, limitando de esta forma el flujo genético entre las localidades. El aislamiento por el medio ambiente se define como un patrón en el cual la diferenciación genética aumenta con las diferencias ambientales, independientemente de la distancia geográfica. Dichas diferencias pueden ser los diferentes tipos de hábitat, el tipo de sustrato, los gradientes de temperatura entre otros (Wang y Bradburd, 2014). Por ejemplo, la distribución espacial de las especies crípticas de *Dipturus batis* concuerdan con los gradientes de temperatura (Griffiths et al., 2010), sugiriendo que este batoideo puede presentar límites térmicos potenciales a la distribución. La boca del GC donde se encuentra la población de Sinaloa, es una zona donde confluyen las diferentes masas de aguas, pero dicha región está más asociada a la del Pacífico Oriental Tropical (Soto-Mardones et al., 1999). Puede ser que se esté observando el límite de la distribución más norteña de una población que se puede distribuir a lo largo del Pacífico Central Mexicano asociada con aguas más cálidas.

En las especies bentónicas como la guitarra rayada, la batimetría puede ser un factor importante para la dispersión como ya se ha hipotetizado para otros batoideos (Plank et al., 2010). En la entrada del GC hay cuencas oceanográficas con profundidades superiores a 500 km (Lavín y Marinone, 2003); esto funge como barrera física impidiendo que los peces puedan atravesar el GC y migrar a localidades cercanas con distancias inferiores a 200 km. Finalmente, no se puede descartar que estos patrones de diferenciación genética sean el resultado de barreras biológicas, como diferencias en biología y comportamiento reproductivo (Villavicencio-Garayzar, 1995; Blanco-Parra et al., 2009a), además de las posibles barreras físicas y ecológicas.

Puede ser que las poblaciones de Sonora y Sinaloa se hubieran diferenciado también por la selección sexual. Las preferencias femeninas y las señales masculinas pueden dar como resultado un aislamiento reproductivo. La selección sexual puede causar una rápida divergencia de los rasgos sexuales asociados con la adquisición de parejas. Si las características para la selección de pareja son muy divergentes el reconocimiento de estas por parte de individuos de la misma especie puede ser difícil; por consiguiente, se ha propuesto que la selección sexual puede facilitar la divergencia entre sistemas de reconocimiento de las parejas entre poblaciones y conducir al aislamiento reproductivo que a su vez conllevará a la diferenciación poblacional y especiación (Panhuis et al., 2001).

4.4.4 Variabilidad fenotípica de la guitarra rayada

A lo largo de la distribución de *Z. exasperata* en NPM se ha detectado variación morfológica que concuerda con la variabilidad genética. Se han identificado al menos tres poblaciones que cuentan con características intrínsecas. Ya se había establecido que las hembras y los machos de la CPBC son significativamente más grandes ($LT_M=79.9 \pm 6.9$ cm y $LT_H=83.4 \pm 10$ cm; Cartamil et al., 2011) que los del Sonora ($LT_M=66.06 \pm 7.57$ cm, $LT_H = 73.46 \pm 10.42$ cm ;Blanco-Parra et al., 2009b; Castillo-Páez et al., 2014) y los individuos analizados en el presente estudio procedentes de Sinaloa son los más pequeños ($LT_M=51.6 \pm 7,1$ cm y $LT_H=60.4 \pm 13.5$ cm), aunque se debe tener cautela por el reducido tamaño de muestra ($n_M=10$, $n_H=21$).

Los patrones de reproducción son diferentes entre la CPBC y Sonora. Blanco-Parra et al. (2009a) indican que el periodo de ovulación y gestación ocurren al mismo tiempo en los peces de Sonora, mientras que Villavicencio-Garayzar (1995) estableció que dichos periodos no son simultáneos en Bahía Almejas en la CPBC. Se desconoce acerca de la biología reproductiva de la población de Sinaloa, pero se puede hipotetizar que esta población también puede presentar patrones reproductivos intrínsecos puesto que su hábitat está regido por patrones oceanográficos diferentes a los que imperan en el GC y en la CPBC (Lluch-Cota et al., 2007).

Otra característica fenotípica que diferencia a las poblaciones es la coloración, los individuos de Sinaloa presentan ocelos amarillos redondeados de negro. Castillo-Páez et al. (2017b, Capítulo 3) indica que no es un carácter secundario de dimorfismo sexual puesto que ambos sexos las presentan, tampoco un carácter ontogenético puesto que están presentes en juveniles y adultos. Puede ser que esta población tenga contacto con la especie hermana más sureña *Z. xyster* asociada al trópico y con presencia de

dichos ocelos. Se han encontrado procesos de hibridación en batoideos, las rayas *Raja polystigma* y *R. montagui* con distribución parapátrica en el Atlántico norte, presentan una zona de hibridación en el suroeste del Mediterráneo (Frodella et al., 2016). Sin embargo, es difícil evaluar dicha hipótesis con los datos disponibles puesto que *Z. xyster* no se encuentra bien caracterizada genéticamente. Otra hipótesis es que esta población simplemente exprese un fenotipo diferente en respuesta a los ambientes contrastantes entre el norte y sur del Pacífico mexicano, en donde el norte está regido por aguas frías típicas de la Corriente de California y el sur por masa de agua cálidas procedentes de la contracorriente de Costa Rica (Wilkinson et al., 2009).

4.4.5 Implicaciones para la conservación

La conservación de las especies a largo plazo depende de que se conserven las poblaciones genéticamente distintas (Lesica y Allendorf, 1995). En este trabajo se corroboró la existencia de las poblaciones de la CPBC y Sonora previamente identificadas y adicionalmente se detectó una nueva población en Sinaloa. El flujo genético histórico entre las poblaciones es bajo y la diferenciación genética entre poblaciones cercanas es alta; por lo tanto, cada población debe de ser considerada como una “Unidad de Manejo” independiente para fines de regulación pesquera (Moritz, 1994). Además, el número de inmigrantes que llegan a estas poblaciones es más bajo que el número de emigrantes, lo cual es característico de las poblaciones fuente. La presión pesquera en dichas poblaciones puede causar efectos catastróficos, reduciendo el tamaño de la población, por la extracción de individuos de la población y por el bajo número de inmigrantes. Por consiguiente, se sugiere seguir con los estudios de demografía en todas las poblaciones, dado su extrema baja diversidad genética y su importancia pesquera, principalmente para la población de Sonora.

La Costa Oeste del GC es una zona de mezcla y de importancia para la conservación de la diversidad genética, puesto que se encontraron migrantes de las tres poblaciones de la guitarra rayada. Esta región actúa como una población sumidero, en donde el número de inmigrantes es mayor que el número de emigrantes. La presión pesquera en este tipo de poblaciones puede ser amortiguada por la llegada de inmigrantes de diferentes las diferentes poblaciones.

Capítulo 5. Primera evidencia de paternidad múltiple en un batoideo vivíparo, *Zapteryx exasperata*

5.1 Introducción

Una camada engendrada por más de un padre (paternidad múltiple - PM) se deriva del sistema de apareamiento poliándrico, puesto que las hembras se aparean con más de un macho en la misma época reproductiva (Fitzpatrick et al., 2012). Este comportamiento ha sido ampliamente documentado en la mayoría de taxones (ver Zeh y Zeh, 2001). Sin embargo, aún persiste la pregunta del porqué las hembras permiten múltiples apareamientos. Se ha hipotetizado que cuando el esperma de los diferentes machos coocurre, la competencia espermática desencadena un aumento en la probabilidad de fertilización con espermatozoides de alta calidad, incrementa la probabilidad de compatibilidad genética, se “escogen los mejores genes” y se eleva la diversidad genética de la camada; de esta manera, la hembra y su progenie tienen ciertos beneficios genéticos, al aumentar la probabilidad de que al menos una cría de la camada sobreviva a las condiciones ambientales y a su vez reduce la competencia entre hermanos (ver Zeh y Zeh, 2001; Simmons, 2005). En contraparte, se ha propuesto que la poliandria puede reducir la aptitud femenina en especies donde las cópulas son agresivas; por ejemplo, durante las múltiples cópulas en los tiburones, los machos muerden a las hembras para sujetarlas ocasionando heridas graves en las aletas y cuerpo, además de laceraciones, hematomas e infecciones en la cavidad vaginal (Byrne y Avise, 2012).

La tasa de encuentro depende de las parejas potenciales especialmente cuando las poblaciones son pequeñas. Sin embargo, la probabilidad de encontrar pareja se incrementa con las agregaciones en las épocas reproductivas. No obstante, la explotación pesquera puede disminuir dicha tasa de encuentro, debido a la reducción en el tamaño poblacional o a los cambios en las proporciones de sexos en los individuos maduros (Daly-Engel et al., 2006). Esto puede ocurrir en los elasmobranchios, puesto que en algunas especies las poblaciones son pequeñas y tienen importancia comercial o son capturadas incidentalmente; aunado a esto, su tasa de recuperación es lenta ya que presentan bajas tasas de fecundación, pocas crías y crecimiento lento (Walker y Heessen, 1996). Por consiguiente, el entendimiento de los sistemas de apareamiento en especies explotadas y con alta vulnerabilidad es indispensable para su conservación.

El uso de marcadores moleculares de herencia biparental (como los microsatélites) permite analizar los mecanismos de los sistemas de apareamiento, en especial en aquellas especies en donde la observación directa es imposible. Las herramientas genéticas han permitido determinar la paternidad cuando es muy

difícil de inferirla por observación de cópulas o de relaciones sociales (Zeh y Zeh, 2001). Especies que se creían monógamas (como la mayoría de las aves) actualmente son catalogadas como poliándricas, puesto que las pruebas de paternidad indican que algunas crías de la camada no fueron engendradas por su pareja (Zeh y Zeh, 2001). Asimismo, el uso de dichas técnicas permite inferir procesos copulatorios y postcopulatorios que promuevan el aislamiento reproductivo al detectarse sesgo en el éxito reproductivo masculino (Zeh y Zeh, 1997).

En batoideos se han realizado tan solo dos estudios de PM en las especies *Raja clavata* y *Aetobatus narinari* este último realizado con organismos en cautiverio. *R. clavata* es el elasmobranquio más fecundo, la frecuencia de PM es del 100 % puesto que se encontró PM en todas las hembras analizadas (Chevolot et al., 2006a; Janse et al., 2013). La mayoría de los estudios realizados en tiburones son en especies vivíparas y la frecuencia de PM varía ampliamente. Por ejemplo, *Sphyrna tiburo* presenta predominancia de camadas monoándricas, 18 de 22 camadas analizadas (81 %) mostraron evidencia genética de que solo un macho las había engendrado. Por otra parte, se encontró que las madres de las camadas con PM fueron significativamente más grandes que aquellas sin PM. Sin embargo, estos datos deben de tomarse con cautela porque solo se analizaron cuatro madres (Chapman et al., 2004).

Por el contrario, en *Mustelus henlei* predomina el modo de apareamiento poliándrico, con una alta frecuencia de PM (93 %) puesto que 13 de 14 camadas analizadas fueron poliándricas. La única camada que no presentó PM fue la más pequeña (cuatro crías). Adicionalmente, no se encontró relación entre la longitud total (LT) de la madre y el número de padres o el tamaño de la camada (Byrne y Avise, 2012). El sesgo en el éxito reproductivo de los machos también se ha estimado, casi siempre un macho fecunda más de la mitad de la camada; por ejemplo, en nueve de las 17 camadas con PM de *Carcharhinus plumbeus* un macho engendró el 60 % de las crías (Portnoy et al., 2007).

Zapteryx exasperata es un batoideo de hábitos bentónicos, tanto hembras como machos maduros son principalmente capturados en primavera e inicios del verano en el norte del Pacífico mexicano, lo cual puede estar asociado a la migración reproductiva (Villavicencio-Garayzar, 1995; Blanco-Parra et al., 2009a). Al parecer la población de la costa Pacífica de Baja California (CPBC) se segrega sexualmente, puesto que se han reportado captura en mayor frecuencia de individuos del mismo sexo (Villavicencio-Garayzar, 1995; Ramirez-Amaro et al., 2013). Sin embargo, en Sonora (Golfo de California) dicha segregación no existe (Blanco-Parra et al., 2009a). La guitarra rayada presentan dimorfismo sexual, las hembras son siete cm más grandes que los machos de la misma edad (Blanco-Parra et al., 2009a).

La guitarra rayada posee un par de oviductos, de glándulas oviducales, de ovarios y de úteros que funcionan simultáneamente (Villavicencio-Garayzar, 1995; Blanco-Parra et al., 2009a). En la población de Sonora el promedio de la fecundidad es de siete crías por hembra (intervalo de dos a 13 crías; Blanco-Parra et al., 2009a) y en la CPBC lo frecuente es encontrar entre seis y nueve crías (intervalo de cuatro a 11 crías; Villavicencio-Garayzar 1995). En ninguna población existe sesgo en la proporción de sexos de las crías y la distribución de estos es igual en los úteros. En la CPBC a medida que incrementa la talla de la hembra la fecundidad también incrementa (Villavicencio-Garayzar, 1995). Sin embargo, esta correlación es baja pero significativa en la población de Sonora ($r^2 = 0.27$; Blanco-Parra et al., 2009a). El ciclo reproductivo presenta algunas diferencias entre las poblaciones, en Sonora la ovulación, la copula y la fertilización ocurren inmediatamente después del parto, tanto la ovulación como la gestación suceden al mismo tiempo, pero en la CPBC no es igual, la ovulación no ocurre después del periodo de gestación (Blanco-Parra et al., 2009a). Se ha hipotetizado una diapausa embrionaria en la población de Sonora dado que no se han encontrado hembras con desarrollo embrionario entre agosto (apareamiento) y febrero (inicio de gestación; Blanco-Parra et al., 2009a). A pesar del conocimiento que se tiene de la biología reproductiva de este batóideo vivíparo aplacentario, falta mucho por investigar acerca de los sistemas de apareamiento.

Como se ha mencionado, la PM es común en tiburones vivíparos (Byrne y Avise, 2012; Fitzpatrick et al., 2012). Sin embargo, este comportamiento reproductivo ha sido poco estudiado en batóideos y no se han realizado estudios en hábitat natural en especies vivíparas. El principal objetivo del presente estudio es estimar la frecuencia de PM en *Z. exasperata* en la población de la CPBC. Específicamente se plantea: i) si en la guitarra rayada predominan las camadas poliándricas o las monoándricas, ii) cuál es el sesgo en el éxito reproductivo de los machos al engendrar una camada y iii) si el tamaño de la camada está relacionado con el número mínimo de padres inferidos. Para esto: 1) se evaluó la frecuencia de PM en 12 camadas de *Z. exasperata* utilizando siete microsatélites, 2) se estimó el número mínimo de padres que pudieron engendrar cada camada y 3) se estimó la relación en el número de padres y el tamaño de la camada. A pesar de la extremada baja diversidad alélica de los loci microsatelitales de la guitarra rayada en el norte del Pacífico mexicano (Capítulo 4), los análisis genéticos permitieron establecer su sistema de apareamiento.

5.2 Metodología

5.2.1 Obtención de camadas y extracción de ADN

Se recolectaron 12 hembras grávidas y su respectiva camada en agosto del 2013 en la pesca artesanal de Bahía Tortugas (114.894 W y 27.690 N) y El Campito (114.518 W y 27.800 N), en la CPBC, México. El tejido muscular de la madre y las crías fueron preservados en etanol (95 %) a temperatura ambiente. Se midió la LT de cada madre. La extracción del ADN genómico fue realizada mediante la digestión del tejido muscular utilizando *proteínasa K* y precipitando el ADN mediante un protocolo de sales de cloruro de litio (Gemmell y Akiyama, 1996).

5.2.2 Estimación genética de paternidad múltiple

Para estimar la frecuencia de la PM se amplificaron siete loci microsatélitales polimórficos (con tres o más alelos) descritos para la especie (ZAEX3-09, ZAEX3-10, ZAEX3-22, ZAEX-39, ZAEX3-26, ZAEX4-11 y ZAEX4-20; Capítulo 2; Castillo-Páez et al., 2017a). La reacción de amplificación, los perfiles de termociclado y la genotipificación fueron realizados de la misma manera a lo descrito por en el capítulo 2 (Castillo-Páez et al., 2017a). El tamaño alélico fue establecido en GeneMarker 2.4.0 (Softgenetics LLC, State College, PA) y verificados visualmente. Para asegurar que toda la progenie compartía al menos un alelo materno en cada locus, se construyó una matriz genotípica, la cual consistió en los alelos maternos y los alelos de cada cría.

El conteo de alelos paternos permitió una estimación inicial del número mínimo de padres por camada. Asimismo, para reconstruir los genotipos parentales y estimar el número mínimo de padres que contribuyeron en una camada se utilizó el programa GERUD 2.0 (Jones, 2005). Cuando una camada tenía tres o más alelos paternos en uno o más loci fue considerada poliándrica. La probabilidad de detectar la PM depende del polimorfismo del locus (la frecuencia alélica), del número de loci, el tamaño de la progenie y el número de padres putativos (Neff y Pitcher, 2002). Esta probabilidad fue estimada usando la frecuencia alélica de cada locus en todas las poblaciones de *Z. exasperata* (Anexo G) y se tuvieron en cuenta los siguientes escenarios: i) dos machos con igual éxito reproductivo (50 % y 50 %), ii) dos machos con éxito sesgado (66.7 % y 33.3 %), iii) tres machos con igual éxito (33.3 %, 33.3 % y 33.3 %) y iv) tres machos con éxito sesgado (57 %, 28.5 % y 14.5 %), para esto se utilizó el programa PrDM (Neff y Pitcher, 2002). Para determinar si el tamaño de la camada está correlacionado con el número mínimo de padres se realizó una correlación de Spearman.

5.3 Resultados

Se colectaron 12 hembras grávidas y su respectiva camada. La hembra más pequeña tenía una LT de 880 mm y nueve crías, mientras que la hembra más grande midió 990 mm y tenía 12 crías. La hembra con el mayor número de crías (15) tenía una LT de 930 mm. El tamaño de la camada varió entre tres y 15 crías (Tabla 16).

Tabla 16: Características de 12 camadas de *Z. exasperata* y el número mínimo de padres que las engendraron.

Madre *	LT	No. crías (genotipadas)	# Loci	No. mínimo de padres **	Sesgo (probabilidad relativa)**
EC243	960	3 (3)	7	1	-
EC250	968	4 (3)	7	1	-
EC251	925	5 (4)	7	1	-
EC259	934	7 (4)	7	1	-
BT246	970	7 (5)	6	1	-
EC252	935	8 (8)	7	1	-
BT245	880	9 (8)	6	1	-
BT244	970	9 (6)	7	2	4:2 (1.19E ⁻⁵)
EC253	954	9 (6)	7	2	4:2 (1.7E ⁻⁴)
EC247	950	10 (7)	7	2	5:2 (1.63E ⁻⁵)
EC240	930	15 (11)	6	2	8:3 (2.08E ⁻⁶)
EC254	990	13 (13)	7	3	7:4:3 (1.44E ⁻¹⁰)

LT, Longitud total de la madre en milímetros; *, BT y EC, individuo capturado en Bahía Tortugas o El campito respectivamente; **, se refiere al número mínimo de padres y a la proporción de la contribución paterna más probable y su probabilidad relativa (en paréntesis) detectados por el programa GERUD.

Como se esperaba, el poder de detectar la PM fue mayor con el incremento del tamaño de la camada y el número de padres (Tabla 17). El poder de detectar la PM en la guitarra rayada fue alto y se incrementó cuando la camada tenía seis o más crías. Cuando los padres tienen el mismo éxito reproductivo (es decir; engendran el mismo número de crías) la probabilidad es levemente más alta que cuando existe un sesgo en el éxito reproductivo (Tabla 17). Cinco de las 12 camadas analizadas (41.66 %) fueron engendradas por múltiples machos (Tabla 16). Las camadas con cinco o menos crías genotipadas fueron engendradas por un padre (camadas monoándricas), mientras que las camadas con seis o más crías tenían uno o múltiples padres (camadas poliándricas). La camada con mayor número de crías genotipadas y una de las más grandes analizadas (EC254, Tabla 16) fue la que tuvo el mayor número de padres detectados (tres) por conteo de alelos en el programa GERUD. Todas las camadas poliándricas presentaron sesgo en el éxito reproductivo, un macho engendró más de la mitad de la camada. El tamaño de la camada (únicamente el número de crías genotipadas) está moderadamente correlacionado con el número mínimo de padres (correlación de Spearman's $r_s = 0.618$, $p = 0.032$).

Tabla 17: La probabilidad de detectar paternidad múltiple basada en la frecuencia alélica y el sesgo en el éxito reproductivo

Escenario	Tamaño de la camada					
	4	6	8	10	12	14
2 machos (50:50)	0.365	0.592	0.702	0.756	0.790	0.810
2 machos (66.7:33.3)	0.327	0.530	0.649	0.718	0.757	0.785
3 machos (33.3:33.3:33.3)	0.496	0.742	0.853	0.907	0.934	0.952
3 machos (57:28.5:14.5)	0.425	0.661	0.781	0.848	0.886	0.914

5.4 Discusión

A pesar de la extremada baja diversidad alélica que se ha encontrado en *Z. exasperata* (Capítulo 4 y Castillo-Páez et al., 2017a), los microsatélites utilizados en el presente estudio permitieron dar la primera evidencia genética de la frecuencia de PM en un batoideo vivíparo aplacentario en el hábitat natural. Hasta la fecha únicamente se han realizado dos estudios de PM, uno en una especie ovípara y el otro en una especie vivípara en cautiverio sin estimar la frecuencia de este comportamiento. La guitarra raya tiene casi la misma proporción de camadas poliándricas o monoándricas, el éxito reproductivo de los machos no es igual y la correlación entre el número mínimo de padres y el tamaño de la camada es moderada y significativa.

En el batoideo ovíparo *R. clavata* se detectó PM en las cuatro puestas de huevos analizadas; por consiguiente, la frecuencia de PM es alta al ser todas las camadas poliándricas (Chevolot et al., 2007). Sin embargo, la frecuencia de PM en *Z. exasperata* (41.7 %) es inferior a la reportada para *R. clavata*, posiblemente debido a que al ser una especie ovípara, las camadas de *R. clavata* son mucho más grandes (39-52 crías) que las de la guitarra rayada (2 y 15), aumentando la probabilidad de ser engendradas por múltiples padres. Al parecer las especies ovíparas tienen tendencia de presentar alta frecuencia de PM. En el tiburón ovíparo *Scyliorhinus canicula* L. la frecuencia de PM fue de 92 % solo una camada fue engendrada por un solo macho. Además en dicha especie camadas con poca progenie entre cuatro y seis crías presentaron PM siendo engendradas por dos o tres padres (Griffiths et al., 2011a).

La frecuencia de PM de *Z. exasperata* es similar a la reportada en algunos tiburones vivíparos. En dos especies de *Mustelus* se detectó PM, en *M. mustelus* la frecuencia fue de 47 % mientras que en *M. punctulatus* fue de 54 % (Marino et al., 2015). Cabe mencionar que las especies vivíparas de tiburones tienen alta variedad en la frecuencia de PM, se han encontrado especies con elevada frecuencia de PM (*Carcharhinus plumbeus* 85 %, *M. henlei* 93 %, *Negaprion brevirostris* 85 %) y otras con tendencia a ser

monoándricas (*Squalus mitsukurii* 11 % y *S. acanthias* 17 %; ver Byrne y Avise, 2012; Fitzpatrick et al., 2012). *Triakis semifasciata* es un tiburón con características muy similares a las que presenta *Z. exasperata* es vivíparo aplacentario y de hábitos bentónicos. La frecuencia de PM interanual en *T. semifasciata* es 36.4 %. Sin embargo, la frecuencia de PM tiene una variación interanual, en el 2010 fue de 20 % y en el 2011 de 78 %. Dicha variación se debe a que en el 2011 aumento la presencia de machos, sugiriendo que probablemente la tasa de encuentro fue mayor ese año (Nosal et al., 2013).

El poder de detectar PM depende de cuatro parámetros principales: i) del número de loci, ii) el número de alelos y su frecuencia, iii) el número de crías analizadas en cada camada y iv) el número de padres y su éxito reproductivo (Neff y Pitcher, 2002). Puede ser que se esté subestimando la frecuencia de PM en la guitarra rayada; puesto que i) en algunos loci tanto el número de alelos (de tres a seis alelos) como su frecuencia es baja (ver Anexo G). Por ejemplo, los loci ZAEX3-10 y ZAEX3-22 presentan seis y cuatro alelos respectivamente, pero en la mayoría de los alelos la frecuencia es extremadamente baja (<0.1, Anexo G) y por esta razón el índice de contenido polimórfico también es bajo. Como consecuencia, la mayoría de las camadas para estos dos loci eran homocigotas para el alelo más frecuente (ver Anexo G). Por otra parte, ii) no se genotipificaron igual número de loci ni todas las crías de las camada. En la mayoría de las camadas (Tabla 16) faltaron por genotipar entre uno y cuatro (cuatro en la camada más grande) crías y en tres de ellas faltó por amplificar un locus. Por ejemplo, en la camada monoándrica BT245, faltó por genotipificar una cría y uno de los loci más polimórficos (ZAEX4-11, Anexo G), lo cual puede estar subestimando tanto el número mínimo de padres que la engendran como el sesgo en el éxito reproductivo. iii) El poder para determinar PM está relacionado directamente con el tamaño de la camada (Neff y Pitcher, 2002), las simulaciones realizadas con los siete loci (Tabla 17) permitieron establecer que con cuatro crías la probabilidad de detectar PM es menor al 50 %. Cinco de las camadas monoándricas tenían entre tres y cinco crías genotipadas (Tabla 16), esto puede ser el reflejo de dicha falta de poder para determinar la PM y por lo tanto estar subestimandola en la guitarra rayada. No obstante, se observó camadas monoándricas con todos los individuos y loci genotipados (EC252 con ocho crías y EC243 con tres crías, Anexo G), permitiendo establecer que *Z. exasperata* presenta tanto camadas monoándricas como poliándricas.

La existencia de camadas monoándricas en la guitarra rayada puede explicarse por procesos precopulatorios (selección sexual) o postcopulatorios (competencia o selección espermática). Las camadas engendradas por un solo macho pueden deberse a que la madre realmente copuló con un único macho durante la época reproductiva o porque únicamente se “escogió” el esperma de uno de los machos con los que copuló. Las interacciones bioquímicas entre el esperma y los fluidos del tracto

reproductivo de la hembra pueden influir en el éxito de la fertilización (Zeh y Zeh, 1997). La hipótesis de la calidad espermática predice que un macho con espermatozoides de alta calidad puede engendrar mayor número de huevos puesto que estos nadan más rápido en comparación con espermatozoides de menor calidad (Zeh y Zeh, 1997). Asimismo, si el espermatozoide de un macho no es compatible con la hembra o no tiene “buenos genes” puede no ser exitoso en la fertilización; por consiguiente, la hembra “elegirá” únicamente al espermatozoide del macho genéticamente compatible y con “buenos genes” ya que en especies vivíparas como *Z. exasperata*, el desarrollo embrionario ocurre dentro de la madre y puede haber contacto entre la madre y las crías, evitando prole de “mala calidad” (Zeh y Zeh, 2001; Byrne y Avise, 2012; Fitzpatrick et al., 2012).

El número mínimo de machos que engendrarán una camada es el reflejo de que tan promiscua es la especie. El número mínimo de machos que contribuyen en una camada con PM en la guitarra rayada (dos o tres) es similar a lo encontrado para otros tiburones vivíparas (de dos a cuatro padres; Byrne y Avise, 2012). Sin embargo, en la raya *R. clavata* el número mínimo de padres (cuatro o seis) que contribuyeron a la fertilización de una camada fue más elevado (Chevolot et al., 2007). Como ya se mencionó, esto se debe a que en las especies ovíparas, además de que producen mayor número de huevos, el ciclo ovárico y la fertilización son más largos en comparación con especies vivíparas; por consiguiente, la PM es favorecida tanto por el incremento de la inseminación como por la extensión de tiempo reproductivo (Marino et al., 2015). No obstante, puede ser que se esté subestimando el número mínimo de padres en la guitarra rayada, puesto que faltaron individuos por genotipificar y locus en la mayoría de las camadas analizadas.

En todas las camadas con PM de *Z. exasperata* un macho es el padre de más de la mitad de la camada (Tabla 16). La mayoría de las especies que presentan PM también presenta sesgo en el éxito reproductivo del macho, casi siempre un macho es el padre de la mayoría de las crías de una camada y esto concuerda con lo que se predice acerca de los mecanismos postcopulatorios (como la competencia espermática) o simplemente por el orden de copulación. Por ejemplo, en dos especies de *Mustelus* con sesgo en el éxito reproductivo, un macho fue el que engendró más del 60 % de la camada (Marino et al., 2015).

Las camadas monoándricas y el sesgo en el éxito reproductivo de los machos es el reflejo de que la selección sexual actúa en *Z. exasperata*. Dicha selección resulta del apareamiento diferenciado entre individuos de la misma población. Los diferentes morfotipos y poblaciones encontradas de la guitarra rayada pueden haber surgido de los patrones de variación en los rasgos de los caracteres sexuales

secundarios y de las preferencias apareamiento de las hembras. Se ha demostrado que la diferenciación poblacional y la especiación ocurren por la selección sexual (Panhuis et al., 2001).

El tamaño de la camada en *Z. exasperata* está moderadamente relacionado con el número de padres que la engendraron. A mayor número de crías mayor número de padres contribuyen en la fertilización de la camada. Puede ser que se esté subestimando esta relación, posiblemente si se completa la genotipificación en las crías que faltan en cada camada, se incrementa el número mínimo de padres y por consiguiente esta correlación aumenta y sea más robusta. Sin embargo, este resultado se tiene que tomar precaución puesto que como ya se mencionó la probabilidad de detectar PM es menor al 50 % en camadas muy pequeñas. Este patrón puede explicarse simplemente por el hecho de que a mayor número de huevos por fertilizar mayor es la probabilidad de que más de un padre logre fertilizar la camada, esto sucedería si la hembra copula con más de un macho en la época reproductiva. Tanto la correlación como la no correlación de estas dos variables han sido reportadas en tiburones. En *Negaprion brevirostris* el número de padres se incrementa con el tamaño de la camada (DiBattista et al., 2008), mientras que en *Squalus acanthias* no existe correlación entre dichas variables y esto puede deberse a que *S. acanthias* es una especie donde predominan las camadas monoándricas (Veríssimo et al., 2011).

La baja diversidad alélica y el poder de detección de la PM en la guitarra rayada está influenciando en la detección de la frecuencia de la PM, el número mínimo de padres y el sesgo en el éxito reproductivo de los machos. La diversidad alélica extremadamente baja que presenta *Z. exasperata* (Capítulo 4; Castillo-Páez et al., 2017a) puede estar subestimando la detección de medio hermanos, puede ser que dos medio hermanos se estén interpretando como hermanos enteros puesto que pueden tener el mismo alelo o alelos pero proceden de padres diferentes dado la baja diversidad de los loci. Para solucionar esto, se debería de incrementar el número de loci que se analizan.

Es evidente que las camadas poliándricas tienen mayor diversidad genética que las monoándricas, dada la combinación alélica entre los múltiples padres y la madre; por consiguiente, la PM aumenta la diversidad genética de la camada (Ridley, 1993). Sin embargo, a nivel poblacional, la PM reduce el tamaño efectivo poblacional ocasionado por la mayor variación en el éxito reproductivo masculino, puesto que no todos los machos producen el mismo número de crías (Karl, 2008). Cuando el tamaño poblacional efectivo es reducido la pérdida de la diversidad genética es más rápida causada por la deriva genética, haciendo que las poblaciones se diferencien o que exista el riesgo de extinción de la población (Wright, 1951).

Finalmente estos resultados muestran que, al igual que los tiburones, los batoideos presentan una alta variabilidad en la frecuencia de PM y que en camadas poliándricas el éxito reproductivo masculino no es el mismo debido a procesos precopulatorios (selección sexual) y postcopulatorios (como la competencia espermática, entre otros). Estos resultados son relevantes puesto que es fundamental conocer la estrategia de reproducción de una especie, ya que ésta tiene influencia en la aptitud y la diversidad genética de las poblaciones, lo cual es esencial para la conservación en especies con mortalidad por pesca como *Z. exasperata*. La información de la PM es indispensable para entender cómo la explotación afecta la reducción poblacional y el mantenimiento de la diversidad genética (Daly-Engel et al., 2006; Blanco-Parra et al., 2009b; Cartamil et al., 2011).

Capítulo 6. Discusión general y conclusión

La disponibilidad de marcadores moleculares permite responder preguntas acerca de procesos macroevolutivos y microevolutivos (Kelley et al., 2016) como las planteadas en la presente tesis. La secuenciación de siguiente generación (NGS, por sus siglas en inglés) es ampliamente utilizada como una herramienta para el desarrollo de dichos marcadores moleculares. Cada vez es más fácil y barato obtener la secuencia del genoma mitocondrial y nuclear de una especie utilizando dicha herramienta y por ello va en aumento, el número de especies de elasmobranquios con mitogenoma secuenciado (Díaz-Jaimes et al., 2016) y parte del genoma nuclear conocido.

La NGS fue bastante útil en el presente trabajo, porque permitió describir el mitogenoma de *Zapteryx exasperata* (Castillo-Páez et al., 2016) una especie de elasmobranquio con importancia ecológica y elevada mortalidad por pesca en el norte del Pacífico mexicano (Blanco-Parra et al., 2009b, 2012; Cartamil et al., 2011). La organización del mitogenoma de *Z. exasperata* es similar a otros batoideos. Sin embargo, presenta una segunda región no codificante hasta ahora no descrita en este grupo de peces. Esta región tiene una estructura interesante al presentar de tres a cuatro motivos de repetición en tándem de 100 bases cada uno (ver capítulo 2). De los tres loci mitocondriales analizados dicha región fue la más informativa en los análisis de estructura poblacional y sistemática. Por otra parte, la NGS también permitió identificar 22 microsátelites polimórficos. No obstante, los loci microsatelitales analizados presentaron una extremadamente baja diversidad alélica, al encontrarse entre dos y seis alelos por locus (Castillo-Páez et al., 2017a). Además se identificaron 22 loci monomórficos que pueden ser útiles en congéneres como *Z. xyster*.

Se rechaza la hipótesis de que los peces guitarras del género *Zapteryx* que se distribuyen en Pacífico mexicano y que presentan ocelos amarillos (carácter más conspicuo de identificación) en el dorso pertenecen a la especie *Z. xyster* y organismos que carecen de ellos son de la especie *Z. exasperata*. Por consiguiente, la presencia de ocelos no es un carácter diagnóstico para separar las especies de este género, puesto que se encontraron organismos con ocelos pertenecientes a *Z. exasperata* y a un linaje “sureño” en Oaxaca (posiblemente *Z. xyster*). *Z. exasperata* presenta dos tipos de coloración, individuos sin presencia de ocelos en los estados de Baja California, Baja California Sur y Sonora o con presencia de estos en Sinaloa (Capítulo 3; Castillo-Páez et al., 2017a). Las causas del polimorfismo fenotípico de la guitarra rayada se desconocen. Sin embargo, se sugiere que la heterogeneidad del hábitat, hábitos de forrajeo o una estrategia antidepredador pueden estar asociadas a estas diferencias en la coloración.

Se encontraron tres poblaciones (Pacífico, Sonora y Sinaloa) de *Z. exasperata* en el norte del Pacífico mexicano cada una con características genéticas y fenotípicas intrínsecas, como es el caso de la presencia de ocelos en el dorso en la población de Sinaloa o individuos de mayor talla en la población del Pacífico. La presencia de esas poblaciones puede estar relacionada con barreras físicas y biológicas. No se rechaza la hipótesis de que entre más distanciadas geográficamente se encuentran las localidades mayor en la distancia genética entre estas (aislamiento por distancia) al menos con el ADN mitocondrial. No obstante, otras barreras físicas pueden estar contribuyendo a la diferenciación poblacional como la presencia de la península de Baja California, procesos oceanográficos y la heterogeneidad del hábitat. En cuanto a barreras biológicas y respondiendo la pregunta principal de esta tesis, solo la paternidad múltiple está contribuyendo con este patrón de estructura poblacional.

Se rechaza la hipótesis de que la guitarra rayada tiene filopatría reproductiva femenina. Por consiguiente, la heterogeneidad en la distribución de la variabilidad genética no se debe a que las hembras se mantengan o regresen al mismo lugar donde se reprodujeron y los machos se dispersen. No hay evidencia de que este fenómeno ocurra en batoideos, lo cual sugiere que ambos sexos pueden exhibir niveles similares de dispersión (Flowers et al., 2016). No se rechaza la hipótesis de que *Z. exasperata* tiene paternidad múltiple y que ésta está contribuyendo (más no son las únicas barreras) en que existan estos patrones de estructura poblacional en el norte del Pacífico mexicano. En condiciones naturales la paternidad múltiple reduce el tamaño efectivo poblacional por el aumento de la varianza general en el éxito reproductivo masculino; es decir, no todos los machos producen el mismo número de crías (Karl, 2008). Cuando una población se reduce en tamaño las frecuencias alélicas cambian por la deriva genética más rápidamente en comparación con una población grande. Las poblaciones pequeñas pueden divergir dado que son más susceptibles a la deriva genética y la fijación alélica (Wright, 1951).

En especies donde se presenta sesgo en la dispersión de los sexos y paternidad múltiple, los patrones de estructuración poblacional pueden ser extremadamente fuertes, a no ser que sean contrarrestados por otros procesos. Si no hay flujo genético entre localidades y además presenta reducción en el tamaño efectivo poblacional por la paternidad múltiple, la divergencia entre poblaciones será elevada. Por el contrario, si la especie presenta flujo genético entre poblaciones y paternidad múltiple, el efecto combinado de estos dos comportamientos reproductivos sería menos drástico que el anterior escenario, puesto que las poblaciones tienden a homogenizarse con la dispersión de los sexos pero se diferencian por la paternidad múltiple, como ocurre en *Z. exasperata* en el norte del Pacífico mexicano.

La Norma Oficial Mexicana (NOM-029-PESC-2006) para la pesca responsable de tiburones y rayas, trata a todas las especies con las mismas condiciones, sin tomar en cuenta las características intrínsecas de cada especie, tales como la estructura poblacional, la variación geográfica, la conectividad poblacional, uso de hábitat, entre otras. Este estudio es relevante para la conservación de la guitarra rayada dado que esta especie presenta una elevada mortalidad por pesca en el norte del Pacífico mexicano (Blanco-Parra et al., 2009b; Cartamil et al., 2011; Ramirez-Amaro et al., 2013) y puede ser la base para el diseño de políticas para el manejo de este batoideo y especies con historias de vida e intervalos de distribución similar. Las tres poblaciones identificadas presentan altos niveles de diferenciación y baja conectividad y por lo tanto deben de ser consideradas como Unidades de Manejo (MUs por sus siglas en inglés) independientes. Una en la Costa del Pacífico de Baja California, otra en Sonora y una más en Sinaloa. No obstante, la costa Oeste del Golfo de California es bastante interesante, el número de inmigrantes procedentes de todas las localidades es elevado en comparación con las otras poblaciones, es decir el flujo genético hacia esta zona es alto. Puede ser que la costa Oeste del Golfo de California funcione como reservorio genético al ser una zona sumidero; por consiguiente, también debe de tenerse en cuenta para la conservación. Por lo tanto, se propone que se debe de hacer las políticas de manejo de acuerdo a la diferenciación poblacional encontrada en la presente tesis, al menos tres zonas de manejo son necesarias para evitar el colapso de las poblaciones de la guitarra rayada ya que cada una de ellas está sometida a elevada mortalidad por pesca y cada población presenta características intrínsecas.

Se reconoce que una de las limitaciones del presente trabajo es el tamaño de muestra y lugares de muestreo. La obtención de muestras al sur de Sinaloa fue muy difícil debido a la baja abundancia de organismos de este género, por ello es recomendable continuar con los esfuerzos de muestreo en Pacífico tropical para establecer hasta donde llega la población de Sinaloa de *Z. exasperata* hacia el sur, y establecer zonas de hibridación entre los miembros del género *Zapteryx* si es que existe. De igual manera, muestras al norte de Punta Canoas serán muy beneficiosas para establecer los límites de la población de *Z. exasperata* que se ha encontrado en la costa del Pacífico de Baja California.

Literatura citada

- Ala-Honkola, O., Friman, E., Lindström, K. 2011. Costs and benefits of polyandry in a placental poeciliid fish *Heterandria formosa* are in accordance with the parent-offspring conflict theory of placentation. *Journal of Evolutionary Biology*, 24(12), 2600–2610. doi:10.1111/j.1420-9101.2011.02383.x.
- Alam, M.T., Petit III, R.A., Read, T.D., Dove, A.D.M. 2014. The complete mitochondrial genome sequence of the world's largest fish, the whale shark (*Rhincodon typus*), and its comparison with those of related shark species. *Gene*, 539(1), 44–49. doi:10.1016/j.gene.2014.01.064.
- Andrews, S. 2011. FastQC High Throughput Sequence QC report v.0.10.1. Babraham Bioinformatics. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/>.
- Arlyza, I.S., Shen, K.-N., Solihin, D.D., Soedharma, D., Berrebi, P., Borsa, P. 2013. Species boundaries in the *Himantura uarnak* species complex (Myliobatiformes: Dasyatidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 66(1), 429–435. doi:10.1016/j.ympev.2012.09.023.
- Ball, R.E., Serra-Pereira, B., Ellis, J.R., Genner, M.J., Iglésias, S.P., Johnson, A.F., Jones, C.S., Leslie, R., Lewis, J., Mariani, S., Menezes, G., Neat, F., Noble, L.R., Sims, D.W., Griffiths, A.M. 2016. Resolving taxonomic uncertainty in vulnerable elasmobranchs: are the Madeira skate (*Raja maderensis*) and the thornback ray (*Raja clavata*) distinct species? *Conservation Genetics*, 17(3), 565–576. doi:10.1007/s10592-015-0806-1.
- Beerli, P., Felsenstein, J. 2001. Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(8), 4563–4568. doi:10.1073/pnas.081068098.
- Benson, G. 1999. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Research*, 27(2), 573–580. doi:10.1093/nar/27.2.573.
- Bernard, A.M., Feldheim, K.A., Heithaus, M.R., Wintner, S.P., Wetherbee, B.M., Shivji, M.S. 2016. Global population genetic dynamics of a highly migratory, apex predator shark. *Molecular Ecology*, 25, 5312–5329. doi:10.1111/mec.13845.
- Bernt, M., Donath, A., Jühling, F., Externbrink, F., Florentz, C., Fritzsich, G., Pütz, J., Middendorf, M., Stadler, P.F. 2013. MITOS: improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69(2), 313–319. doi:10.1016/j.ympev.2012.08.023.
- Bigman, J.S., Knuckey, J.D.S., Ebert, D.A. 2016. Color aberrations in Chondrichthyan fishes: first records in the genus *Bathyraja* (Chondrichthyes: Rajiformes: Arhynchobatidae). *Marine Biodiversity*, 46(3), 579–587. doi:10.1007/s12526-015-0403-z.
- Bizzarro, J.J., Kyne, P.M. 2015. *Zapteryx exasperata*. 2015. The IUCN Red List of Threatened Species, Consultado 2 de febrero 2017 de e.T60177A80673370. doi:10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T60177A80673370.en.
- Blanco-Parra, M.-D.-P., Galván-Magaña, F., Márquez-Farías, J.F., Niño-Torres, C.A. 2012. Feeding ecology and trophic level of the banded guitarfish, *Zapteryx exasperata*, inferred from stable isotopes and stomach contents analysis. *Environmental Biology of Fishes*, 95, 65–77. doi:10.1007/s10641-011-

9862-7.

- Blanco-Parra, M.-D.-P., Márquez-Farías, J.F., Galván-Magaña, F. 2009a. Reproductive biology of the banded guitarfish, *Zapteryx exasperata*, from the Gulf of California, México. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 89(8), 1655–1662. doi:10.1017/S0025315409990348.
- Blanco-Parra, M.-D.-P., Márquez-Farías, J.F., Galván-Magaña, F. 2009b. Fishery and morphometric relationships of the banded guitarfish, *Zapteryx exasperata* (Elasmobranchii, Rhinobatidae), from the Gulf of California, Mexico. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 4(4), 456–465.
- Boomer, J.J., Harcourt, R.G., Francis, M.P., Stow, A.J. 2012. Genetic divergence, speciation and biogeography of *Mustelus* (sharks) in the central Indo-Pacific and Australasia. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 64(3), 697–703. doi:10.1016/j.ympev.2012.05.024.
- Booth, C.L. 1990. Evolutionary significance of ontogenetic color change in animals. *Biological Journal of the Linnean Society*, 40, 125–163. doi:10.1111/j.1095-8312.1990.tb01973.x.
- Borsa, P., Arlyza, I.S., Laporte, M., Berrebi, P. 2012. Population genetic structure of blue-spotted maskray *Neotrygon kuhlii* and two other Indo-West Pacific stingray species (Myliobatiformes: Dasyatidae), inferred from size-polymorphic intron markers. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 438, 32–40. doi:10.1016/j.jembe.2012.09.010.
- Briggs, J.C., Bowen, B.W. 2012. A realignment of marine biogeographic provinces with particular reference to fish distributions. *Journal of Biogeography*, 39, 12–30. doi:10.1111/j.1365-2699.2011.02613.x.
- Buroker, N.E., Brown, J.R., Gilbert, T.A., O’Hara, P.J., Beckenbach, A.T., Thomase, W.K., Smith, M.J. 1990. Length heteroplasmy of sturgeon Mitochondrial DNA: An illegitimate elongation model. *Genetics*, 124, 157–163.
- Byrne, R.J., Avise, J.C. 2012. Genetic mating system of the brown smoothhound shark (*Mustelus henlei*), including a literature review of multiple paternity in other elasmobranch species. *Marine Biology*, 159(4), 749–756. doi:10.1007/s00227-011-1851-z.
- Cartamil, D., Santana-Morales, O., Escobedo-Olvera, M., Kacev, D., Castillo-Géniz, J.L., Graham, J.B., Rubin, R.D., Sosa-Nishizaki, O. 2011. The artisanal elasmobranch fishery of the Pacific coast of Baja California, Mexico. *Fisheries Research*, 108, 393–403. doi:10.1016/j.fishres.2011.01.020.
- Casper, B.M., Ebert, D.A., Kyne, P.M. 2009. *Zapteryx xyxter*. The IUCN Red List of Threatened Species, Consultado el 2 de febrero del 2016 de e.T60178A12. doi:10.2305/IUCN.UK.2009-2.RLTS.T60178A12302031.en.
- Castillo-Páez, A., del Río-Portilla, M.Á., Oñate-González, E.C., Rocha-Olivares, A. 2016. The mitochondrial genome of the banded guitarfish, *Zapteryx exasperata* (Jordan and Gilbert, 1880), possesses a non-coding duplication remnant region. *Mitochondrial DNA Part A: DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, 27(3), 1668–1670. doi:10.3109/19401736.2014.958721.
- Castillo-Páez, A., Rocha-Olivares, A., Bisbal-Pardo, C.I., Zhu, D., Zhu, D., Itoh, H., Fukumori, H., Koseki, J., Garza, J.C., Urabe, J., Yefeng, L. V., Maki, M., Del Río-Portilla, M.Á., Chiba, S., Makino, W., Wang, W., Song, W., ... Hu, Z. 2017a. Microsatellite records for volume 9, issue 1. *Conservation Genetics Resources*, 9(1), 165–171. doi:10.1007/s12686-017-0689-1 (Extremely low allelic diversity of

microsatellite markers in the banded guitarfish (*Zapteryx exasperata*).

- Castillo-Páez, A., Sandoval-Castillo, J., Corro-Espinosa, D., Tovar-Ávila, J., Blanco-Parra, M.-D.-P., Saavedra-Sotelo, N.C., Sosa-Nishizaki, O., Galván-Magaña, F., Rocha-Olivares, A. 2017b. Cutting through the Gordian knot: Unravelling morphological, molecular and biogeographical patterns in the genus *Zapteryx* (guitarfish) from the Mexican Pacific. *ICES Journal of Marine Science*. doi:10.1093/icesjms/fsx021.
- Castillo-Páez, A., Sosa-Nishizaki, O., Sandoval-Castillo, J., Galván-Magaña, F., Blanco-Parra, M.-D.-P., Rocha-Olivares, A. 2014. Strong population structure and shallow mitochondrial phylogeny in the banded guitarfish, *Zapteryx exasperata* (Jordan y Gilbert, 1880), from the Northern Mexican Pacific. *Journal of Heredity*, 105(1), 91–100. doi:10.1093/jhered/est067.
- Castro-Aguirre, J.L., Pérez, H.E., González-Acosta, A.F. 2011. Peces demersales del Pacífico de México. *Revista Mexicana De Biodiversidad*, 82, 323–327.
- Castro, A.L.F., Stewart, B.S., Wilson, S.G., Hueter, R.E., Meekan, M.G., Motta, P.J., Bowen, B.W., Karl, S.A. 2007. Population genetic structure of Earth's largest fish, the whale shark (*Rhincodon typus*). *Molecular Ecology*, 16, 5183–5192. doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03597.x.
- Chapman, D.D., Feldheim, K.A., Papastamatiou, Y.P., Hueter, R.E. 2015. There and back again: a review of residency and return migrations in sharks, with implications for population structure and management. *Annual Review of Marine Science*, 7(1), 547–570. doi:10.1146/annurev-marine-010814-015730.
- Chapman, D.D., Prodöhl, P.A., Gelsleichter, J., Manire, C.A., Shivji, M.S. 2004. Predominance of genetic monogamy by females in a hammerhead shark, *Sphyrna tiburo*: implications for shark conservation. *Molecular Ecology*, 13, 1965–1974. doi:10.1111/j.1365-294X.2004.02178.x.
- Chen, X., Ai, W., Shi, X., Gao, T. 2015. Mitochondrial genome of the ringstraked guitarfish *Rhinobatos hynnicephalus* (Elasmobranchii: Rajiformes). *Mitochondrial DNA*, 26(4), 653–654. doi:10.3109/19401736.2013.836520.
- Chen, X., Ai, W., Xiang, D., Pan, L., Shi, X. 2016. Complete mitogenome of the brown guitarfish *Rhinobatos schlegelii* (Rajiformes, Rhinobatidae). *Mitochondrial DNA Part A: DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, 27(1), 310–311. doi:10.3109/19401736.2014.892091.
- Cheney, K.L. 2013. Cleaner fish coloration decreases predation risk in aggressive fangblenny mimics. *Behavioral Ecology*, 24(5), 1161–1165. doi:10.1093/beheco/art043.
- Chesser, R.K. 1991. Gene diversity and female philopatry. *Genetics*, 127, 437–447.
- Chevolot, M., Ellis, J.R., Hoarau, G., Rijnsdorp, A.D., Stam, W.T., Olsen, J.L. 2006a. Population structure of the thornback ray (*Raja clavata* L.) in British waters. *Journal of Sea Research*, 56(4), 305–316. doi:10.1016/j.seares.2006.05.005.
- Chevolot, M., Ellis, J.R., Rijnsdorp, A.D., Stam, W.T., Olsen, J.L. 2007. Multiple paternity analysis in the thornback ray *Raja clavata* L. *Journal of Heredity*, 98(7), 712–715. doi:10.1093/jhered/esm077.
- Chevolot, M., Hoarau, G., Rijnsdorp, A.D., Stam, W.T., Olsen, J.L. 2006b. Phylogeography and population structure of thornback rays (*Raja clavata* L., Rajidae). *Molecular Ecology*, 15(12), 3693–3705.

doi:10.1111/j.1365-294X.2006.03043.x.

- Clement, M., Snell, Q., Walker, P., Posada, D., Crandall, K. 2002. TCS: Estimating gene genealogies. *Parallel and Distributed Processing Symposium, International Proceedings*, 2(184), 184.
- Clusella Trullas, S., van Wyk, J.H., Spotila, J.R. 2007. Thermal melanism in ectotherms. *Journal of Thermal Biology*, 32(5), 235–245. doi:10.1016/j.jtherbio.2007.01.013.
- Colonello, J.H., Lucifora, L.O., Massa, A.M. 2007. Reproduction of the angular angel shark (*Squatina guggenheim*): geographic differences, reproductive cycle, and sexual dimorphism. *ICES Journal of Marine Science*, 64(1), 131–140. doi:10.1093/icesjms/fsl004.
- Cruz, V.P., Mendonça, F.F., Pardo, B.G., Vera, M., Martinez, P., Oliveira, C., Foresti, F. 2013. Development of microsatellite markers by high-throughput pyrosequencing in the freshwater stingray (*Potamotrygon motoro*) and cross-species amplification. *Molecular Ecology Resources*, 13, 546–549.
- Daly-Engel, T.S., Grubbs, R.D., Holland, K.N., Toonen, R.J., Bowen, B.W. 2006. Assessment of multiple paternity in single litters from three species of carcharhinid sharks in Hawaii. *Environmental Biology of Fishes*, 76, 419–424. doi:10.1007/s10641-006-9008-5.
- Daly-Engel, T.S., Seraphin, K.D., Holland, K.N., Coffey, J.P., Nance, H.A., Toonen, R.J., Bowen, B.W. 2012. Global phylogeography with mixed-marker analysis reveals male-mediated dispersal in the endangered scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*). *PLoS ONE*, 7(1), e29986. doi:10.1371/journal.pone.0029986.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8), 772–772. doi:10.1038/nmeth.2109.
- Díaz-Jaimes, P., Bayona-Vásquez, N.J., Adams, D.H., Uribe-Alcocer, M. 2016. Complete mitochondrial DNA genome of bonnethead shark, *Sphyrna tiburo*, and phylogenetic relationships among main superorders of modern elasmobranchs. *Meta Gene*, 7, 48–55. doi:10.1016/j.mgene.2015.11.005.
- DiBattista, J.D., Feldheim, K.A., Gruber, S.H., Hendry, A.P. 2008. Are indirect genetic benefits associated with polyandry? Testing predictions in a natural population of lemon sharks. *Molecular Ecology*, 17(3), 783–795. doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03623.x.
- Dittman, A.H., Quinn, T.P. 1996. Homing in Pacific salmon: mechanisms and ecological basis. *The Journal of Experimental Biology*, 199, 83–91.
- Donnellan, S.C., Foster, R., Junge, C., Huveneers, C., Rogers, P., Kilian, A., Bertozzi, T. 2015. Fiddling with the proof: the magpie fiddler ray is a colour pattern variant of the common southern fiddler ray (Rhinobatidae: *Trygonorrhina*). *Zootaxa*, 3981(3), 367–384. doi:10.11646/zootaxa.3981.3.3.
- Dudgeon, C.L., Blower, D.C., Broderick, D., Giles, J.L., Holmes, B.J., Kashiwagi, T., Krück N. C., Morgan, J.A.T., Tillett, B.J., Ovenden, J.R. 2012. A review of the application of molecular genetics for fisheries management and conservation of sharks and rays. *Journal of Fish Biology*, 80, 1789–1843. doi:10.1111/j.1095-8649.2012.03265.x.
- Dudgeon, C.L., Broderick, D., Ovenden, J.R. 2009. IUCN classification zones concord with, but underestimate, the population genetic structure of the zebra shark *Stegostoma fasciatum* in the

- Indo-West Pacific. *Molecular Ecology*, 18, 248–261. doi:10.1111/j.1365-294X.2008.04025.x.
- Duncan, K.M., Martin, A.P., Bowen, B.W., De Couet, H.G. 2006. Global phylogeography of the scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*). *Molecular Ecology*, 15, 2239–2251. doi:10.1111/j.1365-294X.2006.02933.x.
- Earl, D.A., VonHoldt, B.M. 2012. Structure Harvester: a website and program for visualizing structure output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359–361. doi:10.1007/s12686-011-9548-7.
- Ebert, D.A. 2003. *Sharks, Rays, and Chimaeras of California*. University of California Press., Berkeley, CA.
- Ebert, D.A., Compagno, L.J. V. 2007. Biodiversity and systematics of skates (Chondrichthyes: Rajiformes: Rajoidei). *Environmental Biology of Fishes*, 80, 111–124. doi:10.1007/s10641-007-9247-0.
- Emlen, S.T., Oring, L.W. 1977. Ecology, sexual selection, and the evolution of mating systems. *Science*, 197(4300), 215–223. doi:10.1126/science.327542.
- Engelhaupt, D., Rus Hoelzel, A., Nicholson, C., Frantzis, A., Mesnick, S., Gero, S., Whitehead, H., Rendell, L., Miller, P., De Stefanis, R., Cañadas, A., Airoldi, S., Mignucci-Giannoni, A.A. 2009. Female philopatry in coastal basins and male dispersion across the North Atlantic in a highly mobile marine species, the sperm whale (*Physeter macrocephalus*). *Molecular Ecology*, 18(20), 4193–4205. doi:10.1111/j.1365-294X.2009.04355.x.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611–2620. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x.
- Excoffier, L., Lischer, H.E.L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 564–567. doi:10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x.
- Faircloth, B.C. 2008. Msatcommander: detection of microsatellite repeat arrays and automated, locus-specific primer design. *Molecular Ecology Resources*, 8(1), 92–94. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01884.x.
- Feldheim, K.A., Gruber, S.H., Dibattista, J.D., Babcock, E.A., Kessel, S.T., Hendry, A.P., Pikitch, E.K., Ashley, M. V., Chapman, D.D. 2014. Two decades of genetic profiling yields first evidence of natal philopatry and long-term fidelity to parturition sites in sharks. *Molecular Ecology*, 23, 110–117. doi:10.1111/mec.12583.
- Feutry, P., Kyne, P.M., Pillans, R.D., Chen, X., Marthick, J.R., Morgan, D.L., Grewe, P.M. 2015. Whole mitogenome sequencing refines population structure of the Critically Endangered sawfish *Pristis pristis*. *Marine Ecology Progress Series*, 533, 237–244. doi:10.3354/meps11354.
- Fitzpatrick, J.L., Kempster, R.M., Daly-Engel, T.S., Collin, S.P., Evans, J.P. 2012. Assessing the potential for post-copulatory sexual selection in elasmobranchs. *Journal of Fish Biology*, 80(5), 1141–1158. doi:10.1111/j.1095-8649.2012.03256.x.
- Flowers, K.I., Ajemian, M.J., Bassos-Hull, K., Feldheim, K.A., Hueter, R.E., Papastamatiou, Y.P., Chapman, D.D. 2016. A review of batoid philopatry, with implications for future research and population

- management. *Marine Ecology Progress Series*, 562, 251–261. doi:10.3354/meps11963.
- Freeland, J.R., Kirk, H., Petersen, S. 2011. En: Freeland, J., Kirk, H., Petersen, S., (Eds.) *Behavioural Ecology*. *Molecular Ecology*, John Wiley, 271–318. doi:10.1002/9780470979365.ch7.
- Frodella, N., Cannas, R., Velona, A., Carbonara, P., Farrell, E.D., Fiorentino, F., Follesa, M.C., Garofalo, G., Hemida, F., Mancusi, C., Stagioni, M., Ungaro, N., Serena, F., Tinti, F., Cariani, A. 2016. Population connectivity and phylogeography of the Mediterranean endemic skate *Raja polystigma* and evidence of its hybridization with the parapatric sibling *R. Montagu*. *Marine Ecology Progress Series*, 554, 99–113. doi:10.3354/meps11799.
- Gardner, M.G., Fitch, A.J., Bertozzi, T., Lowe, A.J. 2011. Rise of the machines - recommendations for ecologists when using next generation sequencing for microsatellite development. *Molecular Ecology Resources*, 11(6), 1093–1101. doi:10.1111/j.1755-0998.2011.03037.x.
- Gemmell, N.J., Akiyama, S. 1996. An efficient method for the extraction of DNA from vertebrate tissues. *Trends in Genetics*, 12(9), 338–339. doi:10.1016/S0168-9525(96)80005-9.
- Goudet, J. 2002. Fstat 2.9.3.2. a program to estimate and test gene diversities and differentiation statistics from codominant genetic markers.
- Greenwood, P.J. 1980. Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. *Animal Behaviour*, 28(4), 1140–1162. doi:10.1016/S0003-3472(80)80103-5.
- Griffiths, A.M., Jacoby, D.M.P., Casane, D., McHugh, M., Croft, D.P., Genner, M.J., Sims, D.W. 2011a. First analysis of multiple paternity in an oviparous shark, the small-spotted catshark (*Scyliorhinus canicula* L.). *Journal of Heredity*, 103(2), 166–173. doi:10.1093/jhered/esr112.
- Griffiths, A.M., Sims, D.W., Cotterell, S.P., El Nagar, A., Ellis, J.R., Lynghammar, A., McHugh, M., Neat, F.C., Pade, N.G., Queiroz, N., Serra-Pereira, B., Rapp, T., Wearmouth, V.J., Genner, M.J. 2010. Molecular markers reveal spatially segregated cryptic species in a critically endangered fish, the common skate (*Dipturus batis*). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1687), 1497–1503. doi:10.1098/rspb.2009.2111.
- Griffiths, A.M., Sims, D.W., Johnson, A.F., Lynghammar, A., McHugh, M., Bakken, T., Genner, M.J. 2011b. Levels of connectivity between longnose skate (*Dipturus oxyrinchus*) in the Mediterranean Sea and the north-eastern Atlantic Ocean. *Conservation Genetics*, 12(2), 577–582. doi:10.1007/s10592-010-0127-3.
- Hellberg, M.E., Burton, R.S., Neigel, J.E., Palumbi, S.R. 2002. Genetic assessment of connectivity among marine populations. *Bulletin of Marine Science*, 70(1 SUPPL.), 273–290.
- Hewitt, G.M. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405(6789), 907–913. doi:10.1038/35016000.
- Hubbard, J.K., Uy, J.A.C., Hauber, M.E., Hoekstra, H.E., Safran, R.J. 2010. Vertebrate pigmentation: from underlying genes to adaptive function. *Trends in Genetics*, 26(5), 231–239. doi:10.1016/j.tig.2010.02.002.
- Hueter, R.E., Heupel, M.R., Heist, E.J., Keeney, D.B. 2005. Evidence of philopatry in sharks and implications for the management of shark fisheries. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*,

35, 239–247. doi:10.2960/J.v35.m493.

- Jacobs, D.K., Haney, T. a., Louie, K.D. 2004. Genes, diversity, and geologic process on the Pacific coast. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 32(1), 601–652. doi:10.1146/annurev.earth.32.092203.122436.
- Janse, M., Kappe, A.L., Van Kuijk, B.L. 2013. Paternity testing using the poisonous sting in captive white-spotted eagle rays *Aetobatus narinari*: a non-invasive tool for captive sustainability programmes. *Journal of Fish Biology*, 82(3), 1082–1085. doi:10.1111/jfb.12038.
- Jensen, J.L., Bohonak, A.J., Kelley, S.T. 2005. Isolation by distance, web service. *BMC Genetics*, 6, 13. doi:10.1186/1471-2156-6-13.
- Jones, A.G. 2005. GERUD 2.0: A computer program for the reconstruction of parental genotypes from half-sib progeny arrays with known or unknown parents. *Molecular Ecology Notes*, 5(3), 708–711. doi:10.1111/j.1471-8286.2005.01029.x.
- Jordan, D.S., Evermann, B.W. 1896. The fishes of North and Middle America: a descriptive catalogue of the species of fish-like vertebrates found in the waters of North america, North of the Isthmus of Panama (FW True, ER Earll, JE Benedict, et al., Eds.). *Proceedings Bulletin of the United States National Museum*, Washington.
- Kajiura, S.M., Tricas, T.C. 1996. Seasonal dynamics of dental sexual dimorphism in the atlantic stingray *Dasyatis sabina*. *The Journal of Experimental Zoology*, 199, 2297–2306.
- Kalinowski, S.T. 2009. How well do evolutionary trees describe genetic relationships among populations? *Heredity*, 102(5), 506–513. doi:10.1038/hdy.2008.136.
- Kang, J.H., Park, J.Y., Jo, H.S. 2012. Rapid development of microsatellite markers with 454 pyrosequencing in a vulnerable fish, the mottled skate, *Raja pulchra*. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(6), 7199–7211. doi:10.3390/ijms13067199.
- Karl, S.A. 2008. The effect of multiple paternity on the genetically effective size of a population. *Molecular Ecology*, 17(18), 3973–3977. doi:10.1111/j.1365-294X.2008.03902.x.
- Kelley, J.L., Brown, A.P., Therkildsen, N.O., Foote, A.D. 2016. The life aquatic: advances in marine vertebrate genomics. *Nature Reviews Genetics*, 17(9), 523–534. doi:10.1038/nrg.2016.66.
- Knudsen, B., Knudsen, T., Flensburg, M., Sandmann, H., Heltzen, M., Andersen, A., Dickenson, M., Bardram, K., Steffensen, P.J., Monsted, S. 2008. CLC Genomics Workbench, 4.0. eds CLC bio.
- Laikre, L., Palm, S., Ryman, N. 2005. Genetic population structure of fishes: implications for coastal zone management. *Ambio*, 34(2), 111–119. doi:10.1639/0044-7447(2005)034.
- Lavín, M.F., Marinone, S.G. 2003. An overview of the physical oceanography of the Gulf of California. *Nonlinear Processes in Geophysical Fluid Dynamics*, 173–204. doi:10.1029/RG021i005p01105.
- Leigh, J.W., Bryant, D. 2015. Popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1110–1116. doi:10.1111/2041-210X.12410.
- Lesica, P., Allendorf, F.W. 1995. When are peripheral populations valuable for conservation? *Conservation Biology*, 9(4), 753–760.

- Lewallen, E.A., Anderson, T.W., Bohonak, A.J. 2007. Genetic structure of leopard shark (*Triakis semifasciata*) populations in California waters. *Marine Biology*, 152(3), 599–609. doi:10.1007/s00227-007-0714-0.
- Librado, P., Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451–1452. doi:10.1093/bioinformatics/btp187.
- Lluch-Cota, S.E., Aragón-Noriega, E.A., Arreguin-Sánchez, F., Auriles-Gamboa, D., Bautista-Romero, J.J., Brusca, R.C., Cervantes-Duarte, R., Cortés-Altamirano, R., Del Monte-Luna, P., Esquivel-Herrera, A., Fernández, G., Hendrickx, M.E., Hernández-Vázquez, S., Herrera-Cervantes, H., Kahru, M., Lavín, M., Lluch-Belda, D., ... Sierra-Beltrán, A.P. 2007. The Gulf of California : review of ecosystem status and sustainability challenges. *Progress in Oceanography*, 73, 1–26. doi:10.1016/j.pocean.2007.01.013.
- López, M., Uribe-Alcocer, M., Díaz-Jaimes, P. 2010. Phylogeography and historical demography of the Pacific Sierra mackerel (*Scomberomorus sierra*) in the Eastern Pacific. *BMC Genetics*, 11(34). doi:10.1186/1471-2156-11-34.
- Ludt, W.B., Rocha, L.A. 2015. Shifting seas: the impacts of Pleistocene sea-level fluctuations on the evolution of tropical marine taxa. *Journal of Biogeography*, 42(1), 25–38. doi:10.1111/jbi.12416.
- Maan, M.E., Sefc, K.M. 2013. Colour variation in cichlid fish: developmental mechanisms, selective pressures and evolutionary consequences. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 24(6–7), 516–528. doi:10.1016/j.semcd.2013.05.003.
- Manceau, M., Domingues, V.S., Linnen, C.R., Rosenblum, E.B., Hoekstra, H.E. 2010. Convergence in pigmentation at multiple levels: mutations, genes and function. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1552), 2439–2450. doi:10.1098/rstb.2010.0104.
- Marino, I.A.M., Riginella, E., Gristina, M., Rasotto, M.B., Zane, L., Mazzoldi, C. 2015. Multiple paternity and hybridization in two smooth-hound sharks. *Scientific Reports*, 5(12919). doi:10.1038/srep12919.
- Martin, A.P., Naylor, G.J.P., Palumbi, S.R. 1992. Rates of mitochondrial DNA evolution in sharks are slow compared with mammals. *Nature*, 357, 153–155.
- Martínez, A., Garza, J.C., Pearse, D.E. 2011. A microsatellite genome screen identifies chromosomal regions under differential selection in steelhead and rainbow trout. *Transactions of the American Fisheries Society*, 140(3), 829–842. doi:10.1080/00028487.2011.588094.
- McEachran, J.D., Notarbartolo-Di-Sciara, G. 1995. Peces Batoideos. In: *Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico centro oriental*. (eds Fisher W, Krupp F, Schneider W, et al.), pp. 745–792. Roma.
- Meirmans, P.G. 2006. Using the AMOVA framework to estimate a standardized genetic differentiation measure. *Evolution*, 60(11), 2399–2402. doi:10.1007/s10869-007-9037-x.
- Mendonça, F.F., Oliveira, C., Burgess, G.H., Coelho, R., Piercy, A.N., Gadig, O.B.F., Foresti, F. 2011. Species delimitation in sharpnose sharks (genus *Rhizoprionodon*) in the western Atlantic Ocean using mitochondrial DNA. *Conservation Genetics*, 12, 193–200. doi:10.1007/s10592-010-0132-6.
- Moore, M.K., Ball, R.M. 2002. Multiple paternity in loggerhead turtle (*Caretta caretta*) nests on

- Melbourne Beach, Florida: a microsatellite analysis. *Molecular ecology*, 11(2), 281–288. doi:10.1046/j.1365-294X.2002.01426.x.
- Moritz, C. 1994. Defining evolutionarily significant Units for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 9(10), 373–375. doi:10.1016/0169-5347(94)90057-4.
- Naylor, G.J.P., Caira, J.N., Jensen, K., Rosana, K.A.M., White, W.T., Last, P.R. 2012. A DNA sequence-based approach to the identification of shark and ray species and its implications for global elasmobranch diversity and parasitology. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 367, 1–262.
- Neff, B.D., Pitcher, T.E. 2002. Assessing the statistical power of genetic analyses to detect multiple mating in fishes. *Journal of Fish Biology*, 61, 739–750. doi:10.1006/jfbi.2002.2101.
- Nosal, A.P., Lewallen, E.A., Burton, R.S. 2013. Multiple paternity in leopard shark (*Triakis semifasciata*) litters sampled from a predominantly female aggregation in La Jolla, California, USA. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 446, 110–114. doi:10.1016/j.jembe.2013.05.002.
- Ovenden, J.R., Morgan, J.A.T., Kashiwagi, T., Broderick, D., Salini, J. 2010. Towards better management of Australia's shark fishery: genetic analyses reveal unexpected ratios of cryptic blacktip species *Carcharhinus tilstoni* and *C. limbatus*. *Marine and Freshwater Research*, 61(2), 253–262. doi:10.1071/MF09151.
- Palumbi, S.R., Cipriano, F., Hare, M.P. 2001. Predicting nuclear gene coalescence from mitochondrial data: the three-times rule. *Evolution*, 55(5), 859–868. doi:10.1111/j.0014-3820.2001.tb00603.x.
- Panhuis, T.M., Roger, B., Zuk, M., Tregenza, T. 2001. Sexual selection and speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(7), 365–371. doi:10.1016/S0169-5347(01)02160-7.
- Park, S. 2001. Microsatellite toolkit. <http://acer.gen.tcd.ie/~sdepark/ms-toolkit/>.
- Parker, P.G., Snow, A.A., Schug, M.D., Booton, G.C., Fuerst, P.A. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*, 79(2), 361–382. doi:10.1890/0012-9658(1998)079[0361:WMCTUA]2.0.CO;2.
- Plank, S.M., Lowe, C.G., Feldheim, K.A., Wilson, R.R., Brusslan, J.A. 2010. Population genetic structure of the round stingray *Urobatis halleri* (Elasmobranchii: Rajiformes) in southern California and the Gulf of California. *Journal of Fish Biology*, 77(2), 329–340. doi:10.1111/j.1095-8649.2010.02677.x.
- Poortvliet, M., Hoarau, G. 2013. The complete mitochondrial genome of the spinetail devilray, *Mobula japonica*. *Mitochondrial DNA*, 24(1), 28–30. doi:10.3109/19401736.2012.716051.
- Le Port, A., Lavery, S.D. 2012. Population structure and phylogeography of the short-tailed stingray, *Dasyatis brevicaudata* (Hutton 1875), in the southern hemisphere. *Journal of Heredity*, 103(2), 174–185. doi:10.1093/jhered/esr131.
- Portnoy, D.S., Heist, E.J. 2012. Molecular markers: progress and prospects for understanding reproductive ecology in elasmobranchs. *Journal of Fish Biology*, 80(5), 1120–1140. doi:10.1111/j.1095-8649.2011.03206.x.
- Portnoy, D.S., Piercy, A.N., Musick, J.A., Burgess, G.H., Graves, J.E. 2007. Genetic polyandry and sexual conflict in the sandbar shark, *Carcharhinus plumbeus*, in the western North Atlantic and Gulf of

- Mexico. *Molecular Ecology*, 16(1), 187–197. doi:10.1111/j.1365-294X.2006.03138.x.
- Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7), 1253–1256. doi:10.1093/molbev/msn083.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945–959. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x.
- Prugnolle, F., de Meeus, T. 2002. Inferring sex-biased dispersal from population genetic tools: a review. *Heredity*, 88(3), 161–165. doi:10.1038/sj/hdy/6800060.
- Rambaut, A., Drummond, A. 2007. Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology. FigTree v1.3.
- Ramirez-Amaro, S.R., Cartamil, D., Galvan-Magaña, F., Gonzalez-Barba, G., Graham, J.B., Carrera-Fernandez, M., Escobar-Sanchez, O., Sosa-Nishizaki, O., Alamillo-Rochin, A. 2013. The artisanal elasmobranch fishery of the Pacific coast of Baja California Sur, Mexico, management implications. *Scientia Marina*, 77(3), 473–487. doi:10.1016/j.fishres.2011.01.020.
- Rasmussen, A.-S., Arnason, U. 1999. Molecular studies suggest that cartilaginous fishes have a terminal position in the piscine tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 2177–2182. doi:10.1073/pnas.96.5.2177.
- Rentería, M. 2007. Breve revisión de los marcadores moleculares. In: *Ecología molecular* (eds Eguiarte LE, Xitlali A), pp. 541–566. Instituto Nacional de Ecología, México.
- Rice, W.E.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43(1), 223–225. doi:10.2307/2409177.
- Ridley, M. 1993. Clutch size and mating frequency in parasitic Hymenoptera. *The American Naturalist*, 142(5), 893–910.
- Robertson, D.R., Allen, G.R. 2002. Shorefishes of the Tropical Eastern Pacific: an information system. CD-Rom. Balboa, Panama: Smithsonian Tropical Research Institute.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P. 2003. MrBayes 3: bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12), 1572–1574. doi:10.1093/bioinformatics/btg180.
- Rousset, F. 2008. Genepop'007: A complete re-implementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8(1), 103–106. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x.
- Sandoval-Castillo, J., Beheregaray, L.B. 2015. Metapopulation structure informs conservation management in a heavily exploited coastal shark (*Mustelus henlei*). *Marine Ecology Progress Series*, 533(AUGUST), 191–203. doi:10.3354/meps11395.
- Sandoval-Castillo, J., Mariano-Melendez, E., Villavicencio-Garayzar, C.J. 2006. New records of albinism in two elasmobranchs: the tiger shark *Galeocerdo cuvier* and the giant electric ray *Narcine entemedor*. *Cybium*, 30(2), 191–192.
- Sandoval-Castillo, J., Rocha-Olivares, A. 2011. Deep mitochondrial divergence in baja California populations of an aquilopelagic elasmobranch: the golden cownose ray. *Journal of Heredity*, 102(3), 269–274. doi:10.1093/jhered/esr004.
- Sandoval-Castillo, J., Rocha-Olivares, A., Villavicencio-Garayzar, C.J., Balart, E.F. 2004. Cryptic isolation of

- Gulf of California shovelnose guitarfish evidenced by mitochondrial DNA. *Marine Biology*, 145(5), 983–988. doi:10.1007/s00227-004-1378-7.
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18, 233–234. doi:10.1038/72708.
- Sclavi, B., Herrick, J. 2013. Slow evolution of *rag1* and *pomc* genes in vertebrates with Large genomes. Cornell University, arXivprepr.
- Sellas, A.B., Bassos-Hull, K., Hueter, R.E., Feldheim, K.A. 2011. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers from the spotted eagle ray (*Aetobatus narinari*). *Conservation Genetics Resources*, 3(4), 609–611. doi:10.1007/s12686-011-9415-6.
- Sellas, A.B., Bassos-Hull, K., Pérez-Jiménez, J.C., Angulo-Valdés, J.A., Bernal, M.A., Hueter, R.E. 2015. Population structure and seasonal migration of the spotted eagle ray, *Aetobatus narinari*. *Journal of Heredity*, 106(3), 266–275. doi:10.1093/jhered/esv011.
- Simmons, L.W. 2005. The evolution of polyandry: sperm competition, sperm selection, and offspring viability. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 36, 125–146. doi:10.1146/annurev.ecolsys.36.102403.112501.
- Soto-Mardones, L., Marinone, S.G., Parés-sierra, A. 1999. Time and spatial variability of sea surface temperature in the Gulf of California. *Ciencias Marinas*, 25(1), 1–30. doi:10.7773/cm.v25i1.658.
- Swofford, L.D. 2002. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and Other Methods). Version 4.0 b10. Sinauer Associates, Sunderland, MA. https://people.sc.fsu.edu/~dswwofford/paup_test/.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–2729. doi:10.1093/molbev/mst197.
- Tillett, B.J., Meekan, M.G., Broderick, D., Field, I.C., Cliff, G., Ovenden, J.R. 2012a. Pleistocene isolation, secondary introgression and restricted contemporary gene flow in the pig-eye shark, *Carcharhinus amblopinus* across northern Australia. *Conservation Genetics*, 13(1), 99–115. doi:10.1007/s10592-011-0268-z.
- Tillett, B.J., Meekan, M.G., Field, I.C., Thorburn, D.C., Ovenden, J.R. 2012b. Evidence for reproductive philopatry in the bull shark *Carcharhinus leucas*. *Journal of Fish Biology*, 80(6), 2140–2158. doi:10.1111/j.1095-8649.2012.03228.x.
- Van-Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P. 2004. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4(3), 535–538. doi:10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x.
- Veríssimo, A., Grubbs, R.D., Mcdowell, J.R., Musick, J.A., Portnoy, D.S. 2011. Frequency of multiple paternity in the spiny dogfish *Squalus acanthias* in the western north Atlantic. *Journal of Heredity*, 102(1), 88–93. doi:10.1093/jhered/esq084.
- Villavicencio-Garayzar, C.J. 1995. Biología reproductiva de la guitarra pinta, *Zapteryx exasperata* (Pisces: Rhinobatidae), en Bahía Almejas, Baja California Sur, México. *Ciencias Marinas*, 21(2), 141–153.
- Walker, P.A., Heessen, H.J.L. 1996. Long-term changes in ray populations in the North Sea. *Ices Journal of*

- Marine Science, 53(6), 1085–1093. doi:10.1006/jmsc.1996.0135.
- Wang, I.J., Bradburd, G.S. 2014. Isolation by environment. *Molecular Ecology*, 23, 5649–5662. doi:10.1111/mec.12938.
- Wilkinson, T.A., Wiken, E., Creel, J.B., Hourigan, T.F., Agardy, T. 2009. Marine ecoregions of North America. Instituto Nacional de Ecología, Mexico.
- Wishingrad, V., Ferrari, M.C.O., Chivers, D.P. 2014. Behavioural and morphological defences in a fish with a complex antipredator phenotype. *Animal Behaviour*, 95, 137–143. doi:10.1016/j.anbehav.2014.07.006.
- Wosnick, N., Freire, C.A. 2013. Some euryhalinity may be more common than expected in marine elasmobranchs: The example of the South American skate *Zapteryx brevirostris* (Elasmobranchii, Rajiformes, Rhinobatidae). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 166(1), 36–43. doi:10.1016/j.cbpa.2013.05.002.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15, 322–354. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- Wyman, S.K., Jansen, R.K., Boore, J.L. 2004. Automatic annotation of organellar genomes with DOGMA. *Bioinformatics*, 20(17), 3252–3255. doi:10.1093/bioinformatics/bth352.
- Zeh, J.A., Zeh, D.W. 1997. The evolution of polyandry II: post-copulatory defenses against genetic incompatibility. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 264(1378), 69–75. doi:10.1098/rspb.1997.0010.
- Zeh, J.A., Zeh, D.W. 2001. Reproductive mode and the genetic benefits of polyandry. *Animal Behaviour*, 61, 1051–1063. doi:10.1006/anbe.2000.1705.

Anexos

Anexo A: Frecuencias alélicas de cada locus en cada población.

Locus	Alelo	BV	NG	PC	SG	SI	SN	SO
ZAEX2-29	266	5.38	4.55	7.35	2.27	3.85	36.00	12.16
	268	80.00	81.82	77.94	75.00	65.38	56.00	81.08
	270	14.62	13.64	14.71	22.73	30.77	8.00	6.76
ZAEX3-09	173	8.70	34.62	12.12	21.62	10.00	13.33	38.89
	176	57.25	46.15	57.58	47.30	54.00	61.67	50.00
	179	3.62	7.69	4.55	1.35	4.00		2.78
	182	30.43	11.54	25.76	28.38	32.00	25.00	6.94
	185							1.39
	188				1.35			
ZAEX3-22	243	1.41		2.94		7.41		2.70
	246	92.25	91.67	94.12	97.87	90.74	98.39	91.89
	249	6.34	8.33	2.94	2.13	1.85	1.61	5.41
ZAEX3-26	160	15.22	12.50	13.64	18.09	27.78		16.67
	163						35.71	
	166	76.09	87.50	77.27	76.60	72.22	64.29	80.56
	169	1.45			2.13			
	172	6.52		9.09	3.19			2.78
	175	0.72						
ZAEX4-05	239	15.49	4.17	19.70	10.47	18.00	12.07	1.35
	243	21.13	33.33	12.12	31.40	18.00	18.97	40.54
	247	62.68	58.33	65.15	56.98	62.00	44.83	58.11
	251	0.70	4.17	3.03	1.16	2.00	24.14	
ZAEX4-41	195	62.31	79.17	60.61	53.33	59.26	87.93	68.92
	197	37.69	20.83	39.39	43.33	40.74	10.34	29.73
	199				3.33		1.72	1.35
ZAEX3-10	216	1.41		7.35		1.85		
	219	0.70						
	225	97.89	100.00	92.65	98.86	98.15	12.90	100.00
	228				1.14		22.58	
	231						46.77	
	234						17.74	

PC, Punta Canoas; BV, Bahía Vizcaíno; SI, San Ignacio; NG, Noroeste del Golfo de California; SG, Suroeste del Golfo de California; SO, Sonora; SN, Sinaloa.

Anexo A: Continuación. Frecuencias alélicas de cada locus en cada población

Locus	Alelo	BV	NG	PC	SG	SI	SN	SO
ZAEX3-19	330						8.06	
	332	41.18	41.67	36.36	53.41	50.00	29.03	48.65
	334	2.94		1.52	1.14		50.00	1.35
	336	55.88	58.33	62.12	45.45	50.00	12.90	50.00
ZAEX4-02	227	50.00	53.85	50.00	50.00	50.00	53.70	52.70
	231	50.00	46.15	50.00	50.00	50.00	46.30	47.30
ZAEX4-20	337	15.71	10.00	7.58	3.33	9.26		5.41
	341	28.57	15.00	30.30	33.33	25.93	11.67	27.03
	343						11.67	
	345	54.29	70.00	59.09	63.33	64.81	76.67	67.57
	347		5.00					
	349	1.43		3.03				
ZAEX4-22	232	94.37	88.46	95.59	73.33	96.30	100.00	90.00
	236	5.63	11.54	4.41	26.67	3.70		10.00
ZAEX4-39	321	33.67	31.25	37.88	53.66	51.92	48.00	44.29
	323	65.31	68.75	62.12	46.34	48.08	2.00	55.71
	329	1.02					50.00	
ZAEX4-42	218	3.33		14.29	5.26	8.33	53.13	7.14
	222	96.67	100.00	85.71	94.74	91.67	46.88	92.86

Anexo B: Sitios variables de la región control (RC) para el género *Zapteryx* en el Pacífico mexicano (los sitios fijos están sombreados).

Haplotipo	GenBank acc. no.	140	145	151	207	213	263	264	266	346	347	519	520	532	580
ZECR-1	KC610069	T	T	C	T	T	T	G	T	C	T	C	G	-	G
ZECR-2	KC610070	C	-	.
ZECR-3	KC610071	.	.	.	C	-	.
ZECR-4	KX959528	G	.
ZECR*	KC610069	?	?	?	?
ZAPCR-1	KU746359	C	G	T	.	C	.	A	A	T	C	A	A	-	A

GenBank acc. no., números de acceso de GenBank, en negrita son los haplotipos previamente publicados (Castillo-Páez et al., 2014); * Muestra con ADN degradado de Oaxaca; ., denota la identidad con el primer haplotipo; ?, datos perdidos; ZE, corresponden a secuencias encontradas en *Z. exasperata* y ZAP a secuencias encontradas en organismos de *Zapteryx* sp.

Anexo C: Sitios variables del gen NADH deshidrogenasa subunidad 2 (ND2) para el género *Zapteryx* en el Pacífico mexicano (los sitios fijos están sombreados).

Haplotipo	GenBank acc. no.	3	51	101	183	233	276	348	368	374	425	472	491	572	581	599	617	623	653	655	690	728	791	820	836	859	873	923	955
ZEND2-1	KC610072	T	A	C	G	T	T	C	C	C	A	C	A	T	T	A	C	C	C	C	T	T	C	C	C	G	A	C	A
ZEND2-2	KC610073	T	T
ZEND2-3	KC610074	C
ZEND2-4	KC610075	T
ZEND2-7	KC610078	A	.	.	.
ZEND2-11	KU746360	.	G
ZEND2-12	KX959529	C
ZEND2-13	KX959530	T	T	C
ZEND2*	KC610072	.	.	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
ZAPND2-1	KU756570	.	.	T	.	C	G	T	T	T	G	T	G	.	C	C	T	T	.	T	.	A	T	T	T	.	T	T	.
ZAPND2-2	KU756571	.	.	T	A	C	G	T	T	T	G	T	G	C	C	C	T	T	.	T	A	A	T	T	T	.	T	T	.

GenBank acc. no., números de acceso de GenBank, en negrita son los haplotipos previamente publicados (Castillo-Páez et al., 2014); * Muestra con ADN degradado de Oaxaca; (.), denota la identidad con el primer haplotipo; (-), infiere indel; ?, datos perdidos; ZE, corresponden a secuencias encontradas en *Z. exasperata* y ZAP a secuencias encontradas en organismos de *Zapteryx* sp.

Anexo D: Sitios variables de la región remanente de duplicación no codificante (RNC) para el género *Zapteryx* del Pacífico Mexicano (los sitios fijos están sombreados).

Posición de los sitios de repetición en tándem								1 (de 79 al 178)						2 (de 179 al 279)								
Haplotipo	GenBank acc. no.	16	24	26	30	31	53	95	122	132	136	166	167	202	218	220	228	231	253	266	267	268
ZENCR-1	KU746357	G	A	G	-	-	T	G	C	A	G	C	C	T	T	G	C	A	C	T	G	C
ZENCR-2	KU746358	A
ZENCR-3	KU746342	A
ZENCR-4	KU746343	A
ZENCR-5	KU746344
ZENCR-6	KU746345	C	A	C	.
ZENCR-7	KU746346	C	A	T
ZENCR-8	KU746347	C	.
ZENCR-9	KU746348	C	A	T
ZENCR-10	KU746349	C	A	T
ZENCR-11	KU746350	C	A	.	.	T	.	.	T
ZENCR-12	KU746351	C	C	A	.	.	.	A	.	T
ZENCR-13	KU746352	C	A	T
ZENCR-14	KU746353	G	.	.	.	C	A	T
ZENCR-15	KU746354	C	A	.	A	.	.	C	.
ZENCR-16	KU746355	A	C	A	.	.	T	.	.	T
ZENCR-17	KU746356	A	.	.	T	.	.	T
ZENCR-18	KX959522	C	A	.	.	T	.	.	T
ZENCR-19	KX959523	T	A	T	.	T	.	.	T
ZENCR-20	KX959524	C	A	.	.	T	.	.	T
ZENCR-21	KX959525	C	A	T
ZENCR-22	KX959526	C	A	T
ZENCR-23	KX959527	G	.	.	.	T	G	.	A	.	.	.	C
ZAPNCR-1	KU746341	A	G	A	-	-	.	.	.	G	A	.	T	C	C	A	T	-	.	C	C	.
ZAPNCR-2	KU746340	A	G	A	A	C	.	.	T	G	A	.	G	C	C	A	T	-	.	C	C	.

GenBank acc. no., números de acceso de GenBank; * Muestra con ADN degradado de Oaxaca; (.), denota la identidad con el primer haplotipo; (-), infiere indel; ?, datos perdidos; ZE, corresponden a secuencias encontradas en *Z. exasperata* y ZAP a secuencias encontradas en organismos de *Zapteryx* sp.

Anexo D: Continuación. Sitios variables de la región remanente de duplicación no codificante (RNC) para el género *Zapateryx* del Pacífico Mexicano (los sitios fijos están sombreados).

Posición de los sitios de repetición en tándem	3 (del 280 al 380)															4 (del 381 al 480)									
	290	292	293	303	309	319	320	321	329	332	354	368	369	375	376	393	394	413	421	422	464	476	478	480	
ZENCR-1	A	A	G	C	A	T	C	A	T	-	C	C	C	T	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ZENCR-2	T	.	.	-	.	G	.	.	A	A	G	C	T	A	C	G	C	A	
ZENCR-3	T	.	.	-	.	G	.	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ZENCR-4	G	.	.	T	.	.	T	G	C	A	.	G	.	.	A	A	G	C	T	A	C	G	C	A	
ZENCR-5	T	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ZENCR-6	G	.	.	T	.	.	T	G	C	A	.	G	.	.	A	A	G	C	T	A	C	G	C	A	
ZENCR-7	T	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ZENCR-8	G	.	.	T	.	.	T	G	C	A	.	G	.	.	A	A	G	C	T	A	C	G	C	A	
ZENCR-9	G	.	.	T	.	C	T	.	C	-	.	G	T	.	A	A	G	C	T	A	C	G	C	A	
ZENCR-10	G	.	.	T	G	C	T	.	C	-	.	G	.	.	A	A	G	C	T	A	C	G	C	A	
ZENCR-11	T	.	.	-	.	G	T	.	A	A	G	C	T	A	C	G	C	A	
ZENCR-12	T	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ZENCR-13	G	.	.	T	.	C	T	.	C	-	.	G	T	.	A	A	G	T	T	A	C	G	C	A	
ZENCR-14	T	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ZENCR-15	G	.	.	T	.	C	T	.	C	-	.	G	T	.	A	A	G	C	T	A	C	G	C	A	
ZENCR-16	T	.	.	-	.	G	.	.	A	A	G	C	A	A	C	G	C	A	
ZENCR-17	T	.	.	-	.	G	.	.	A	A	G	C	T	A	C	G	C	A	
ZENCR-18	T	.	.	-	.	G	.	T	A	A	G	C	T	A	C	G	C	A	
ZENCR-19	T	.	.	-	.	G	.	T	A	A	G	C	T	A	C	G	C	A	
ZENCR-20	T	.	.	-	T	G	.	T	A	A	G	C	T	A	C	G	C	A	
ZENCR-21	T	.	.	-	.	G	.	T	A	A	G	C	T	A	C	G	C	A	
ZENCR-22	T	.	.	-	.	G	T	T	A	A	G	C	T	A	C	G	C	A	
ZENCR-23	T	.	.	-	.	C	.	T	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ZAPNCR-1	G	-	A	G	A	T	T	T	T	A	T	C	
ZAPNCR-2	.	G	A	.	.	.	T	.	.	-	.	.	.	C	A	G	A	C	T	T	C	A	T	C	

Anexo D: Continuación. Sitios variables de la región remanente de duplicación no codificante (RNC) para el género *Zapteryx* del Pacífico Mexicano (los sitios fijos están sombreados).

Haplotipo	495	509	510	512	517	537	540	546	550	565	600
ZENCR-1	A	T	T	G	T	C	A	T	T	A	A
ZENCR-2
ZENCR-3
ZENCR-4
ZENCR-5
ZENCR-6
ZENCR-7
ZENCR-8
ZENCR-9
ZENCR-10
ZENCR-11
ZENCR-12
ZENCR-13
ZENCR-14
ZENCR-15
ZENCR-16
ZENCR-17
ZENCR-18	G
ZENCR-19
ZENCR-20
ZENCR-21
ZENCR-22
ZENCR-23	G	.
ZAPNCR-1	T	C	C	A	C	A	G	C	C	G	.
ZAPNCR-2	T	C	C	A	C	A	G	C	C	G	.

Anexo E: Sitios variables del gen RAG1 para el género *Zapteryx*.

Haplotipo	GenBank acc. no.	74	98	108	111	159	254	287	355
ZERAG1	JN184103	G	A	G	G	T	G	G	A
ZERAG1-1	KU756566	C	G	G	G
ZERAG1-3	KU756567	A	.	.	.	C	.	.	G
ZERAG1-4	KU756568	.	.	A	.	C	.	.	G
ZERAG1-5	KU756569	.	.	.	A	C	.	.	G
ZERAG1-6	KX959531	C	.	.	.
ZERAG1*	KU756563-5	?	?	?	?	?	.	A	G
ZAPRAG1-1	KU756563	.	T	.	.	C	.	A	G
ZAPRAG1-2	KU756564	C	.	A	G
ZAPRAG1-3	KU756565	C	A	A	G

GenBank acc. no., números de acceso de GenBank, en negrita son los haplotipos previamente publicado (Castillo-Páez et al., 2014); * Muestra con ADN degradado de Oaxaca; (.), denota la identidad con el primer haplotipo; ?, datos perdidos; ZE, corresponden a secuencias encontradas en *Z. exasperata* y ZAP a secuencias encontradas en organismos de *Zapteryx* sp.

Anexo F: Tamaño alélico de 12 camadas de *Z. exasperata* (la madre de cada camada está sombreada; -, individuo no genotipado).

Camada	Locus													
	3-10		3-22		4-39		3-9		3-26		4-11		4-20	
BT244	225	225	246	246	321	323	179	182	166	166	324	328	339	341
BT244-2	225	225	246	246	321	321	176	179	166	166	324	332	339	343
BT244-3	225	225	246	249	321	323	176	182	166	166	324	324	339	345
BT244-4	225	225	246	246	321	321	176	182	166	166	324	324	339	345
BT244-5	225	225	246	246	323	323	176	179	166	166	324	328	341	345
BT244-6	225	225	246	246	321	321	176	179	166	166	328	332	341	341
BT244-8	225	225	246	246	321	323	176	179	166	166	328	332	339	339
BT245	225	225	246	246	323	323	179	182	166	166	-	-	345	345
BT245-2	225	225	246	246	323	323	179	182	166	166	-	-	345	345
BT245-3	225	225	246	246	323	323	179	179	166	166	-	-	345	345
BT245-4	225	225	246	249	323	323	179	185	166	166	-	-	345	345
BT245-5	225	225	246	246	323	323	179	179	166	166	-	-	345	345
BT245-6	225	225	246	249	323	323	179	179	166	166	-	-	345	345
BT245-7	225	225	246	246	323	323	182	185	166	166	-	-	345	345
BT245-8	225	225	246	249	323	323	182	185	166	166	-	-	345	345
BT245-9	225	225	246	246	323	323	182	185	166	166	-	-	345	345
BT246	225	225	246	246	-	-	173	176	166	166	328	328	345	345
BT246-2	225	225	246	246	-	-	173	176	166	166	328	328	341	345
BT246-3	225	225	246	246	-	-	173	176	166	166	328	328	341	345
BT246-4	225	225	246	246	-	-	176	176	166	166	328	328	345	345
BT246-6	225	225	246	246	-	-	176	182	166	166	328	328	345	345
BT246-7	225	225	246	246	-	-	176	176	166	166	328	328	345	345
EC240	225	225	246	246	-	-	176	182	160	166	324	328	345	349
EC240-2	225	225	246	246	-	-	173	176	166	166	324	328	345	349
EC240-4	225	225	246	246	-	-	176	182	166	172	320	328	343	345
EC240-5	225	225	246	246	-	-	176	176	166	166	324	328	337	345
EC240-6	225	225	246	246	-	-	176	182	166	172	328	328	343	345
EC240-7	225	225	246	246	-	-	176	176	166	166	328	328	341	345
EC240-8	225	225	246	246	-	-	173	176	160	166	324	328	345	349
EC240-9	225	225	246	246	-	-	176	182	166	166	328	328	345	349
EC240-10	225	225	246	246	-	-	176	176	160	166	324	328	341	345
EC240-12	225	225	246	246	-	-	173	182	166	166	324	328	341	345
EC240-14	225	225	246	246	-	-	173	176	160	166	328	328	345	345
EC240-15	225	225	246	246	-	-	176	182	166	166	324	328	345	349
EC243	216	225	246	246	323	323	176	179	166	166	324	328	345	345
EC243-1	225	225	246	246	321	323	179	179	160	166	328	332	345	345
EC243-2	216	225	246	246	321	323	179	179	166	166	328	332	345	345
EC243-3	216	225	246	246	321	323	176	179	166	166	328	332	345	345
EC247	225	225	246	246	323	323	179	179	166	175	324	324	345	345
EC247-1	225	225	246	246	323	323	179	179	166	166	324	328	341	345
EC247-2	225	225	246	246	323	323	179	185	166	166	324	328	345	345
EC247-4	225	225	246	246	323	323	179	179	172	175	324	328	345	345
EC247-5	225	225	246	246	321	323	179	179	166	172	324	328	345	345
EC247-6	225	225	246	246	323	323	179	185	160	166	324	328	341	345
EC247-9	216	225	246	246	323	323	179	185	160	166	320	324	337	345
EC247-10	225	225	246	246	323	323	179	179	166	166	324	328	341	345

Anexo F: Continuación. Tamaño alélico de 12 camadas de *Z. exasperata* (la madre de cada camada está sombreada; -, individuo no genotipado).

Camada	Locus													
	3-10		3-22		4-39		3-9		3-26		4-11		4-20	
EC250	225	225	246	246	321	323	185	185	166	166	328	332	345	345
EC250-1	225	225	246	246	321	321	179	185	166	166	328	328	341	345
EC250-2	225	225	246	246	323	323	185	185	166	166	320	328	345	345
EC250-4	225	225	246	246	321	321	179	185	166	166	328	328	345	345
EC251	225	225	246	246	321	321	179	185	166	166	328	332	339	345
EC251-1	225	225	246	246	321	323	179	179	166	166	328	332	341	345
EC251-2	225	225	246	246	321	323	185	185	166	166	328	332	339	345
EC251-4	225	225	246	246	321	323	179	185	166	166	328	332	341	345
EC251-5	225	225	246	246	321	323	185	185	166	166	328	332	345	345
EC252	225	225	246	246	321	323	179	179	160	166	332	332	345	345
EC252-1	225	225	246	246	323	323	179	179	160	166	328	332	341	345
EC252-2	225	225	246	246	321	323	179	179	160	166	328	332	345	345
EC252-3	225	225	246	246	321	323	179	179	166	166	328	332	341	345
EC252-4	225	225	246	246	321	321	179	179	160	166	328	332	345	345
EC252-5	225	225	246	246	321	323	179	179	160	166	328	332	341	345
EC252-6	225	225	246	246	323	323	179	179	160	166	324	332	345	345
EC252-7	225	225	246	246	321	323	179	179	160	166	328	332	345	345
EC252-8	225	225	246	246	321	323	179	179	160	166	328	332	341	345
EC253	225	225	246	246	321	323	185	185	160	166	320	324	341	345
EC253-3	225	225	246	246	323	323	179	185	160	166	320	324	345	345
EC253-4	225	225	246	246	321	321	185	185	160	166	320	328	341	345
EC253-5	225	225	246	246	323	323	179	185	160	166	316	324	341	345
EC253-6	225	225	246	246	323	323	179	185	160	166	320	320	341	341
EC253-7	225	225	246	246	321	323	179	185	160	166	320	324	345	345
EC253-8	225	225	246	246	321	323	179	185	160	166	320	324	345	345
EC254	225	225	246	246	321	323	176	182	166	166	328	332	339	345
EC254-1	225	225	246	246	321	321	176	176	166	172	328	328	341	345
EC254-2	225	225	246	246	321	321	179	182	166	172	328	332	341	345
EC254-3	225	225	246	246	321	321	176	182	160	166	324	328	337	339
EC254-4	225	225	246	246	323	323	176	176	166	166	324	328	341	345
EC254-5	225	225	246	246	321	321	176	182	166	172	324	328	339	341
EC254-6	225	225	246	246	321	323	176	182	166	172	328	328	337	345
EC254-7	225	225	246	246	323	323	179	182	160	166	328	328	339	343
EC254-8	225	225	246	246	323	323	176	176	160	166	324	328	337	345
EC254-9	225	225	246	246	321	321	176	176	166	166	320	332	339	345
EC254-10	225	225	246	246	321	323	176	176	166	166	320	332	339	343
EC254-11	225	225	246	246	321	323	176	176	166	166	320	328	345	345
EC254-12	225	225	246	246	321	323	176	182	166	172	324	328	339	343
EC254-13	225	225	246	246	323	323	176	176	160	166	328	328	341	345
EC259	225	225	246	246	321	323	179	179	166	166	324	332	345	345
EC259-2	225	225	246	246	323	323	179	179	166	166	324	328	345	345
EC259-4	225	225	246	246	323	323	179	179	166	166	328	332	345	345
EC259-5	225	225	246	246	323	323	179	179	166	166	328	332	345	345
EC259-6	225	225	246	246	323	323	179	179	166	166	328	332	345	345

Anexo G: Frecuencia alélica global de 7 microsátélites utilizados para la detección de paternidad múltiple de *Z. exasperata* (PIC, índice de contenido polimórfico).

Locus	Alelo	Frecuencia	PIC
ZAEX4-39	321	0.4355	0.452
	323	0.5046	
	329	0.0599	
ZAEX3-09	173	0.1770	0.554
	176	0.5432	
	179	0.0309	
	182	0.2449	
	185	0.0021	
	188	0.0021	
ZAEX3-26	160	0.1528	0.368
	163	0.0397	
	166	0.7579	
	169	0.0079	
	172	0.0397	
	175	0.0020	
ZAEX4-11	316	0.1579	0.649
	320	0.0658	
	324	0.3750	
	328	0.3553	
	332	0.0461	
ZAEX4-20	337	0.0813	0.464
	341	0.2659	
	343	0.0139	
	345	0.6290	
	347	0.0020	
	349	0.0079	
ZAEX3-10	216	0.0156	0.221
	219	0.0019	
	225	0.8755	
	228	0.0292	
	231	0.0564	
	234	0.0214	
ZAEX3-22	243	0.0193	0.111
	246	0.9402	
	249	0.0405	

Glosario

ADN: El ácido desoxirribonucleico es una macromolécula que contiene la información genética de todas las células. Las bases que lo componen son adenina, citosina, guanina y timina.

Alelo: Es una variante particular de un gen.

Alelos nulos: Son alelos que no se amplifican durante la reacción en cadena de la polimerasa.

Batoideo: Es un pez cartilaginoso, cercanamente emparentado con los tiburones. La mayoría de las especies son aplanadas dorsoventralmente. A diferencia de los tiburones, las branquias se encuentran debajo de las aletas pectorales y los ojos y espiráculos se sitúan en el dorso.

Bootstrap: Es un método estadístico que indica la probabilidad de la incidencia de los nodos en el remuestreo.

Cebador: Es un segmento corto (por lo general de 18 nucleótidos) de ADN o ARN que se utiliza para identificar la región del genoma que se desea copiar por medio de la reacción en cadena de la polimerasa.

Cuello de botella: Es la reducción temporal del tamaño de una población.

Deriva genética: Es una fuerza evolutiva que cambia las frecuencias alélicas dentro de una población de una generación a la siguiente debido al muestreo aleatorio de gametos.

Desequilibrio de ligación: Ocurre cuando los alelos de dos o más loci coocurren con más frecuencia de lo que se espera en base a sus frecuencias.

Efecto Wahlund: Surge cuando se combinan datos de dos o más subpoblaciones con diferentes frecuencias alélicas, causando la reducción en los valores de heterocigosidad en relación con las esperadas del equilibrio de Hardy-Weinberg.

Equilibrio de Hardy-Weinberg: Las frecuencias genotípicas se mantienen constantes de generación en generación en una población sexual, de tamaño infinito, con apareamiento al azar, pero donde no actúe la selección natural, ni la migración, ni la mutación.

Filogenia: Es la representación de las relaciones evolutivas entre los diferentes linajes como las especies o géneros, casi siempre se usa un diagrama y generalmente es un árbol.

Filogeografía: Compara las relaciones evolutivas de los linajes genéticos con las localidades geográficas para poder entender que factores influyen la distribución de los genes, poblaciones y especies.

Flujo genético: Es el cambio en la distribución de genes, producido por el movimiento de gametos, individuos o grupo de individuos de un lugar a otro.

Gen: Es un segmento del genoma que codifica para una proteína.

Gen activador de la recombinación (RAG1): Es un gen que se encuentra en el núcleo y codifica para la proteína que lleva a cabo la reordenación o recombinación de los genes de la inmunoglobulina y el receptor de linfocitos T durante el proceso de recombinación.

Haplotipo: Es una variante particular de un gen haploide como lo son los del ADN de la mitocondria.

Heterocigosidad esperada: Una medida de la diversidad genética que refleja el nivel de heterocigosidad que se espera si una población está en el equilibrio de Hardy-Weinberg.

Heterocigosidad observada: Es el nivel actual de heterocigosidad dentro de una población, usualmente promediada mediante varios loci.

Heterocigoto: Individuo que tiene más de un tipo de alelo en un locus en particular.

Homocigoto: Individuo que tiene solo un tipo de alelo en un locus en particular.

Indel: Inserción o eliminación de nucleótidos.

Introgresión: Es el movimiento de genes de una especie o población a otra después de la hibridación.

Loci: Es el plural de locus.

Locus: Localización de un gen o región del ADN en el cromosoma.

Microsatélite: Es un segmento corto del genoma que se repite en tándem, puede ser de un hasta seis pares de bases.

Monofila: Grupo de individuos que tiene un ancestro en común.

Monofila recíproca: Cuando dos poblaciones o especies se vuelven monofiléticas entre sí.

Mutación: Una alteración (sustitución) en la estructura del genoma.

NADH deshidrogenasa subunidad dos (ND2): Es un gen de la mitocondria que codifica para proteína y que está involucrado en el transporte de electrones.

Panmixia: Es un grupo de organismos que se aparean al azar.

Plasticidad fenotípica: Es la capacidad que tiene un genotipo para expresarse en diferentes fenotipos, dependiendo de las condiciones ambientales.

Población: Grupo de individuos que pertenecen a la misma especie, que viven en la misma área geográfica y que potencialmente se pueden reproducir.

Polimórfico: Locus que tiene alelos múltiples en la población.

Politomia: Nodo del árbol filogenético no resuelto.

Reacción en cadena de la polimerasa: Es una técnica molecular que se utiliza para reproducir múltiples copias de un gen o región particular del genoma.

Región control (RC): Es un locus de la mitocondria que no codifica para proteínas.

Secuenciación de siguiente generación: Plataformas de secuenciación de ADN de alto rendimiento que pueden producir miles o millones de secuencias de nucleótidos en una sola ejecución y en poco tiempo.

Tamaño efectivo de la población: Es la fracción de la población que contribuye con sus genes a la siguiente generación. Este tamaño depende del sistema de apareamiento, la proporción de sexos, la variación en el éxito reproductivo y el traslape de generaciones.

Vicarianza: Es la división de una población por una barrera geográfica o ecológica.