

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
EN ECOLOGÍA MARINA**

**ESTRUCTURA Y DIVERSIDAD GENÉTICA DE LA GUITARRA RAYADA
Zapteryx exasperata EN EL PACÍFICO NORTE MEXICANO**

TESIS

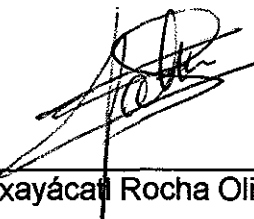
que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

ANA YONORY CASTILLO PÁEZ

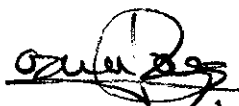
Ensenada, Baja California, México, Enero del 2012.

TESIS DEFENDIDA POR
ANA YONORY CASTILLO PÁEZ
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ



Dr. Axayácatl Rocha Olivares

Director del Comité



Dr. Oscar Sosa Nishizaki

Miembro del Comité



Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro

Miembro del Comité



Dra. Bertha Eugenia Lavaniegos Espejo

*Coordinador del programa de posgrado
en Ecología Marina*



Dr. David Hilario Covarrubias Rosales

Director de Estudios de Posgrado

18 de Enero de 2012

RESUMEN de la tesis de **Ana Yonory Castillo Páez**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de **MAESTRO EN CIENCIAS** en Ecología Marina. Ensenada, Baja California, Enero 2012.

ESTRUCTURA Y DIVERSIDAD GENÉTICA DE LA GUITARRA RAYADA
***Zapteryx exasperata* EN EL PACÍFICO NORTE MEXICANO**

Resumen aprobado por:



Dr. Axayácatl Rocha Olivares

Zapteryx exasperata es una especie de batoideo con importancia ecológica y económica en el Pacífico norte mexicano. El conocer la diversidad, estructura y flujo genéticos de esta especie, permitirá establecer unidades intraespecíficas genéticamente diferenciadas, además de entender procesos microevolutivos y ecológicos. En el presente estudio se estimaron la diversidad genética, el grado de diferenciación y la magnitud del flujo genético, entre especímenes de *Z. exasperata* muestreados en cinco campos pesqueros del Golfo de California (GC) y seis de la Costa del Pacífico de Baja California (CPBC). Se identificaron diez haplotipos entre 61 secuencias individuales del gen mitocondrial NADH₂, en donde el haplotipo ZAEX-02 fue el más abundante y predominó en el GC, mientras que el ZAEX-03 fue el segundo más abundante y sólo se encontró en la CPBC. La diversidad haplotípica fue baja ($h = 0.308$) en el GC y alta ($h = 0.723$) en la CPBC, sin embargo la diversidad nucleotídica fue baja en las dos regiones (GC $\pi = 0.0005$ y CPBC $\pi = 0.0016$). El índice de fijación fue alto ($F_{st} = 0.304$, $p < 0.001$) indicando que hay una muy alta y significativa estructura genética, en la que el 30% de la varianza genética ocurrió entre localidades. El flujo genético fue alto entre las localidades de CPBC, sin embargo fue bajo entre las regiones del GC y CPBC. Teniendo en cuenta el criterio de Unidades Evolutivamente Significativas (UES), proponemos considerar la existencia de dos UES para *Z. exasperata*, una en la CPBC con alta diversidad mitocondrial, y otra en el GC con baja diversidad genética, causada posiblemente por un cuello de botella o efecto fundador histórico. La diferenciación entre regiones que refleja un bajo flujo de genes puede estar asociada a las diferentes condiciones ambientales y los efectos de la ecología reproductiva de la especie.

Palabras Claves: Gen mitocondrial NADH₂, diversidad genética, estructura genética, flujo genético y *Zapteryx exasperata*

ABSTRACT of the thesis presented by **Ana Yonory Castillo Páez** as a partial requirement to obtain the **MASTER OF SCIENCE** degree in Marine Ecology. Ensenada, Baja California, January 2012.

GENETIC STRUCTURE AND DIVERSITY OF BANDED GUITARFISH *Zapteryx exasperata* IN THE NORTHERN MEXICAN PACIFIC.

Zapteryx exasperata is an ecologically and economically important batoid in the northern Mexican Pacific. Knowledge about its diversity, genetic structure and gene flow will allow the identification of genetically distinct intraspecific units, and increase our understanding of microevolutionary and ecological process. In this study, we estimate the genetic diversity and gene flow, among samples of *Z. exasperata* from five fishing camps of the Gulf of California (GC) and six in the Pacific coast of Baja California (PCBC). Ten haplotypes were identified among 61 individual sequences of the mitochondrial gene NADH₂; the ZAEX-02 haplotype was the most abundant and was predominant in the GC, whereas ZAEX-03 was the second most abundant and prevailed along PCBC. Haplotype diversity was low in CG ($h=0.308$) but high in PCBC ($h=0.723$), however nucleotide diversity was low in both regions (PCBC $\pi = 0.0016$, CG $\pi = 0.0005$). The fixation index was large ($F_{st} = 0.304$, $p < 0.001$), reflecting a high genetic structure in which 30% of the genetic variance was found among localities. Gene flow was high among fishing camps of the PCBC, but low between the GC and PCBC regions. We propose two evolutionally significant units (ESU) of *Z. exasperata*, one with high mitochondrial diversity along PCBC and another one in GC with low genetic diversity, which may suggest a possible historical bottleneck or founder effect. Differences in the environmental regimes between the GC and PCBC regions and their effects on the reproductive ecology of the species may be contributing to the low levels of gene flow and the genetic differentiation found in this study.

Keywords: Gene mitochondrial NADH₂, genetic diversity, genetic structure, gene flow and *Zapteryx exasperata*.

DEDICATORIAS

A la mujer que ha dado todo para que mis sueños se hagan realidad, porque me apoya en cada uno de ellos, por más descabellados y locos que sean, Gracias por darme la vida.

Dios te bendiga y te de mil años más de vida!

Te amo madre!

Anayibe Pérez

Padre hermoso! Gracias por ser el apoyo incondicional, cada palabra tuya me alienta y llega en el momento justo. Eres mi ejemplo de vida.

Gracias a Ti he logrado muchas de mis metas propuestas.

Que Dios te siga bendiciendo!

Leonel Castillo

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT, por la beca otorgada a lo largo de mis estudios de maestría en el posgrado de Ecología Marina.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada CICESE por todo el apoyo brindado en mi maestría.

Al Departamento de Ecología Marina por aceptarme y ofrecerme la oportunidad de formarme académicamente.

Al Dr. Axa, por aceptarme para formar parte de su equipo de trabajo en el laboratorio de ecología molecular, gracias por su disponibilidad y brindarme todo el apoyo para que mi tesis llegara a un final feliz. Gracias por su amistad y creer en mí!

Al Dr. Oscar Sosa, por aceptarme y ser parte de mi comité. Gracias por permitirme salir con su equipo de trabajo para coleccionar muestras y conocer lo linda que es la Península de Baja California.

Al Dr. Alexei Licea, por su disponibilidad para ser parte del presente trabajo, gracias por sus sugerencias.

A Jonathan Sandoval, María del Pilar Blanco, Carmina Salinas y al laboratorio de ecología pesquera, por donar parte de las muestras para el presente trabajo.

A mis compañeros del laboratorio de ecología molecular, Abigail, Jorge, Pablo, Mirayana, Nancy y Geo, por ayudarme a sacar este trabajo adelante, gracias por todas las risas y los buenos momentos!

A Ariadna! Fuiste la primera persona que conocí en México y en Ensenada, gracias porque desde ese instante supe que tenía una Gran Amiga, mi cómplice en las buenas y en las malas. Te quiero mucho.

A Paty García! Gracias por apoyarme en cada instante, por las parrandas, las copas, las botellitas, en fin Por cada risa, broma, chiste, pero sobre todo por tu sincera amistad. Te quiero Patolina!

Finalmente a Abraham, es poco el tiempo de conocemos, pero sé que nos esperan muchos años por compartir, gracias porque cada instante me llenas de motivos para no dejar mis sueños y luchar por ellos. Te quiero mucho!

CONTENIDO

	Página
Resumen español	i
Resumen inglés	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	v
Lista de Figuras	vii
Lista de Tablas	viii
I. Introducción	1
I.1. Estructura genética poblacional.....	1
I.2. Implicaciones para la conservación y el manejo.....	4
I.3. Pesca de peces batoideos en el Golfo de California y en la costa del Pacífico de Baja California.....	5
II. Antecedentes	7
II.1. Biología y distribución de <i>Zapteryx exasperata</i>	7
II.2. Estructura genética de batoideos.....	10
III. Justificación	13
IV. Hipótesis	14
V. Objetivos	15
V.1. Objetivo general.....	15
V.2. Objetivos específicos.....	15
VI. Materiales y métodos	16
VI.1. Área de estudio.....	16
VI.2. Trabajo de campo.....	17
VI.3. Trabajo de laboratorio.....	17
VI.3.1. Extracción del ADN.....	17
VI.3.2. Amplificación del ADNmt.....	18
VI.3.3. Purificación del producto de PCR.....	18
VI.3.4. Secuenciación del ADN.....	19
VI.4. Análisis de datos.....	19
VI.4.1. Diversidad genética.....	19
VI.4.2. Diferenciación genética.....	20
VI.4.3. Número de migrantes efectivos.....	20
VI.4.4. Patrones filogeográficos.....	20

CONTENIDO (Continuación)

	Página
VII. RESULTADOS.....	22
VII.1 Muestreo.....	22
VII.2. Extracción, amplificación y secuenciación de ADN.....	23
VII.3. Edición, alineamiento e identificación de sitios polimórficos de las secuencias de ADN.....	25
VII.4. Distribución de haplotipos.....	25
VII.5. Diversidad genética.....	27
VII.6. Estructura genética.....	28
VII.7. Flujo genético.....	30
VII.8 Patrones filogeográficos de los haplotipos.....	30
VIII. Discusión.....	33
VIII.1. Estructura genética de <i>Zapateryx exasperata</i>	33
VIII.2. Diversidad genética de <i>Zapateryx exasperata</i>	37
VIII.3. Patrones filogenéticos.....	40
VIII.4. Implicaciones para el Manejo y Conservación.....	41
IX. Principales Hallazgos.....	42
X. Recomendaciones.....	43
XI. Literatura citada.....	44

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Patrones de diferenciación genética basados en la cantidad de flujo genético y el tamaño efectivo poblacional.....	2
Figura 2. Genoma mitocondrial, el círculo interno representa la hebra delgada y externo hebra gruesa, en el cuadro rosado se señala el gen ND ₂ o NADH ₂	3
Figura 3. <i>Zapteryx exasperata</i> en vista dorsal.....	7
Figura 4. Distribución de la guitarra rayada <i>Z. exasperata</i>	9
Figura 5. Posición geográfica de los campos pesqueros de donde se obtuvieron muestras de <i>Z. exasperata</i> en el Golfo de California y la costa del Pacífico de Baja California.....	22
Figura 6. Distribución de haplotipos del gen mitocondrial NADH ₂ de <i>Z. exasperata</i> en cada localidad, los cuatro haplotipos compartidos están codificados en colores y los privados en blanco. Los campos pesqueros están agrupados en las cinco localidades de acuerdo a los símbolos.....	26
Figura 7. Árbol filogenético (Neighbor-Joining) de haplotipos de <i>Z. exasperata</i> , enraizado con <i>Raja radiata</i> como grupo de referencia. Los valores de bootstrap se ubican en cada nodo. Los haplotipos del Golfo de California se simbolizan con Δ y los haplotipos de la costa del Pacífico de Baja California con \bigcirc el número en cada figura representa la frecuencia del haplotipo.....	31
Figura 8. Red filogenética de máxima parsimonia de los haplotipos mitocondriales (NADH ₂) de <i>Z. exasperata</i> . El número en cada círculo representa el haplotipo, cada línea representa una paso mutacional, el color su frecuencia en ambas regiones geográficas y el tamaño del círculo su abundancia en el total de las muestras.....	32

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla I. Batoideos capturados en el Golfo de California y la costa del Pacífico de Baja California. En cada estado se enlista las especies en orden de abundancia decreciente.....	6
Tabla II. Tamaño de las muestras (n) obtenidas en cada campo pesquero, posición geográfica y colector.....	23
Tabla III: Número de individuos secuenciados (n) para cada campo pesquero y localidad.....	24
Tabla IV. Frecuencias de cada haplotipo por localidad.....	27
Tabla V. Diversidad genética mitocondrial (NADH ₂) de <i>Z. exasperata</i> en cada localidad y región. Tamaño de muestras (n) número de haplotipos (A), diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π).....	28
Tabla VI. Resultados del análisis de variancia ANOVA. Grados de libertad (d.f.).....	29
Tabla VII. Valores de <i>Fst</i> pareados entre localidades (bajo la diagonal) y sus niveles de significancia (sobre la diagonal)	29
Tabla VIII. Flujo genético (<i>Nm</i>) entre localidades calculados a partir de los valores de <i>Fst</i>	30
Tabla IX. Comparación de algunos aspectos de la biología <i>Z. exasperata</i> , entre el Golfo de California y la costa del Pacífico de Baja California.....	36

I. Introducción

I.1. Estructura genética poblacional

El conocimiento sobre la estructura genética poblacional permite mejorar el manejo de recursos explotados y el entendimiento de los procesos microevolutivos (Coyne, 1994; Sinclair, 1988). La diferenciación genética entre subpoblaciones se debe principalmente a la interacción de procesos evolutivos como la mutación, la selección natural, la endogamia, la deriva génica, el flujo genético y el aislamiento reproductivo. La magnitud del flujo genético determina la conectividad entre localidades. Tanto el flujo genético como el tamaño poblacional efectivo, constituyen dos variables determinantes de los patrones de variación genética de las poblaciones (Hedrick, 2000; Hellberg *et al.*, 2002). Cuando el flujo genético y el tamaño poblacional efectivo son pequeños, existen altas tasas de reclutamiento local, por lo que las poblaciones son cerradas y genéticamente diferenciadas. Por otra parte, cuando el flujo genético y el tamaño poblacional efectivo son grandes, las poblaciones serán abiertas y genéticamente homogéneas. Entre estos modelos extremos, las poblaciones pueden mostrar similitudes genéticas graduales, dando como resultado patrones de diferenciación intermedios, como el modelo de aislamiento por distancia (Figura 1) (Hellberg *et al.*, 2002). Cuando el flujo genético entre las poblaciones es alto, evolucionarán juntas, a menos que sea contrarrestado por selección natural o deriva génica, mientras que si el flujo genético es muy bajo, las poblaciones empezarán a divergir, y como resultado se obtendrá aislamiento reproductivo y linajes evolutivamente independientes (Hellberg *et al.*, 2002).

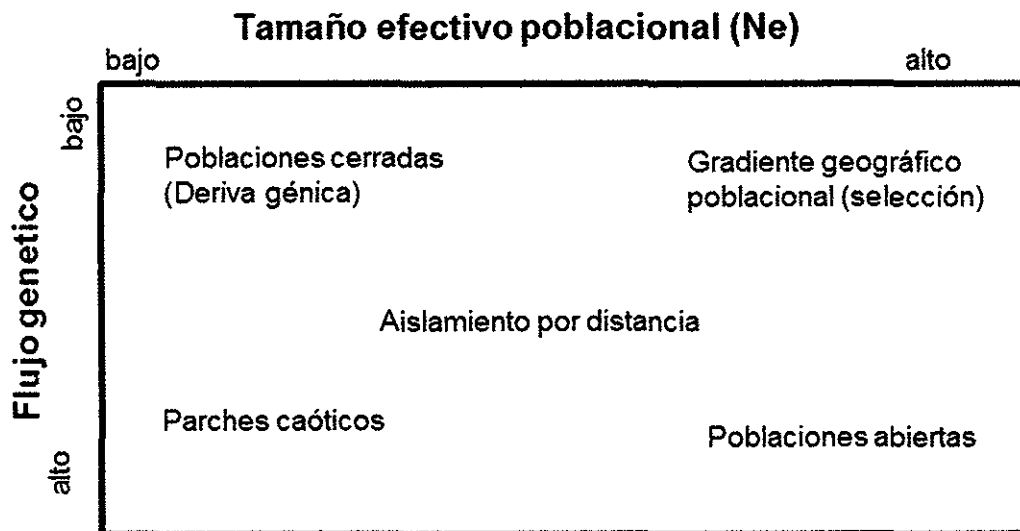


Figura 1. Patrones de diferenciación genética basados en la cantidad de flujo genético y el tamaño efectivo poblacional (Tomado de Hellberg *et al.*, 2002)

El ADN mitocondrial (ADNmt) es una molécula circular de doble cadena, haploide, sencilla, pequeña y abundante en células eucariotas, lo que facilita su amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Contiene 37 genes, 22 codifican ARNs de transferencia (ARNt), 2 ARN ribosomal (ARNr) y 13 codifican proteínas (Figura 2). El ADNmt animal tiene una alta tasa mutacional (basada en sustituciones), únicamente se recombina con sí mismo, por lo cual no se ve afectado por la recombinación y es heredado intacto a la progenie, se hereda matrilinealmente en la mayoría de especies. Estas características lo convierten en un marcador útil para estudiar procesos macroevolutivos, como la reconstrucción filogenética, y microevolutivos, como la genética poblacional. En el presente estudio se analizarán secuencias del gen que codifica la subunidad dos de la enzima metabólica Nicotinamida Adenina Dinucleótido Deshidrogenasa ($NADH_2$) para evaluar la estructura genética de la raya *Zapteryx exasperata* en el Pacífico norte mexicano. Este gen ha sido utilizado exitosamente para estudiar la

I.2. Implicaciones para la conservación y el manejo

Los peces batoideos presentan estrategias de vida de tipo K, con crecimiento lento, reproducción tardía, baja progenie y baja resiliencia (Stevens *et al.*, 2000), estas características los convierten en especies vulnerables a la explotación pesquera, y requieren planes de acción para su conservación y manejo. Por lo anterior, las pesquerías de México y del mundo están implementando estrategias y legislaciones para mejorar la explotación de estos organismos. Por consiguiente el estudio de las especies en cuanto a las historias de vida, ciclos reproductivos, pesquerías y unidades específicas de manejo (stocks), son necesarias para poder implementar medidas de manejo óptimas en las poblaciones.

Se han realizado algunos esfuerzos en el país para identificar grupos uniespecíficos reproductivamente aislados, para la costa del Pacífico de Baja California y el Golfo de California se han realizado varios estudios pesqueros, pero son pocas las especies de batoideos que han sido analizadas utilizando herramientas moleculares (Sandoval-Castillo *et al.*, 2004; Plank *et al.*, 2010; Sandoval-Castillo y Rocha-Olivares, 2011), esto limita la implementación de medidas de manejo basadas en el reconocimiento explícito de unidades discretas de manejo (stocks) que pueden responder de forma diferente a la presión pesquera.

Gracias a la utilización de criterios genéticos y evolutivos en la conservación y manejo de recursos naturales, se ha acuñado el término de Unidad Evolutivamente significativa (UES) para referirse a una población o grupo de poblaciones que están separadas evolutivamente de otras poblaciones y presentan un aislamiento reproductivo histórico. Las UES representan un componente importante en el legado evolutivo de la especie, por lo que este nuevo concepto de unidad de manejo incorpora la necesidad de conservar el

potencial evolutivo de una especie, representado por la variabilidad genética intra-específica. La UES le confiere a la unidad de manejo un significado evolutivo más allá de sus características fenotípicas, que son las que tradicionalmente definen a los stocks pesqueros (Bowen, 1997).

I.3. Pesca de peces batoideos en el Golfo de California y en la costa del Pacífico de Baja California

La pesquería de batoideos es reciente, la introducción de la red de enmalle de fondo en la región del Alto Golfo de California incrementó la captura de rayas. Al parecer, esta actividad comenzó oficialmente en 1986, presentándose los mayores desembarcos en 1996 con una abundancia de aproximadamente 6,000 toneladas. Desde entonces, las capturas han mostrado una tendencia a disminuir (Márquez-Farías, 2002). La captura de elasmobranquios varía con las estaciones del año, siendo abundantes en primavera y verano; de igual manera, la pesquería de tiburones y rayas varía entre los estados que conforman el Golfo de California y la costa del Pacífico de Baja California. En la Tabla I se enlista la composición de batoideos por estado de acuerdo al orden de abundancia, siendo *Rhinobatos*, *Rhinoptera*, *Dasyatis* y *Myliobatis* los géneros más capturados.

En el Golfo de California, *Zapteryx exasperata* es desembarcada principalmente en Bahía Kino y en el estero El Soldado en el estado de Sonora, donde presenta capturas elevadas y posee un valor comercial mayor al resto de los sitios donde se captura (Blanco-Parra *et al.*, 2009 a). Por otra parte, en los estados de Baja California y Baja California Sur su pesca es escasa y poco valorada. En el campo pesquero de Laguna Manuela situado en la costa del Pacífico de Baja California, *Z. exasperata* es el segundo batoideo con mayor volumen de desembarco pesquero artesanal, y es capturada entre los meses de abril y agosto; sin embargo, su costo en el mercado es relativamente bajo. En el

estado de Baja California Sur, los pescadores de las localidades Bahía Tortugas y Malarrimo, generalmente la descartan, sólo las aletas tienen precio comercial y en ocasiones se utiliza para carnada (Cartamil *et al.*, 2011; Carmina Salina, Bahía Tortugas, *Comunicación personal*).

Tabla I. Batoideos capturados en el Golfo de California y en la costa del Pacífico de Baja California. En cada estado se enlista las especies en orden de abundancia decreciente (Datos de: Bizarro *et al.*, 2009 a; Bizarro *et al.*, 2009 b; Bizarro *et al.*, 2009 c; Cartamil *et al.*, 2011; Cruz-Agüero *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 2009)

	Baja California	Baja California Sur	Sonora	Sinaloa
Golfo de California	<i>Rhinobatos productus</i>	<i>Mobula munkiana</i>	<i>Rhinobatos productus</i>	<i>Rhinobatos glaucostigma</i>
	<i>Myliobatis californica</i>	<i>Dasyatis dipterura</i>	<i>Dasyatis dipterura</i>	<i>Dasyatis dipterura</i>
	<i>Mobula munkiana</i>	<i>Gymnura</i> spp	<i>Gymnura</i> spp	<i>Rhinoptera steindachneri</i>
	<i>Gymnura</i> spp	<i>Mobula japonica</i>	<i>Rhinoptera steindachneri</i>	<i>Gymnura</i> spp
	<i>Rhinoptera steindachneri</i>	<i>Dasyatis longa</i>	<i>Narcine entemedor</i>	<i>Dasyatis longa</i>
	<i>Dasyatis dipterura</i>	<i>Rhinobatos productus</i>	<i>Rhinobatos glaucostigma</i>	<i>Aetobatus narinari</i>
	<i>Zapteryx exasperata</i>	<i>Rhinoptera steindachneri</i>	<i>Myliobatis californica</i>	<i>Zapteryx exasperata</i>
	<i>Raja velezi</i>	<i>Myliobatis longirostris</i>	<i>Zapteryx exasperata</i>	
Costa del Pacífico de la Baja California	<i>Rhinobatos productus</i>	<i>Urolophus maculatus</i>		
	<i>Zapteryx exasperata</i>	<i>Urolophus halleri</i>		
	<i>Myliobatis californica</i>	<i>Rhinobatos productus</i>		
	<i>Gymnura marmorata</i>	<i>Urotrigon chilensis</i>		
	<i>Raja inornata</i>	<i>Diplobatis ommata</i>		
	<i>Platyrrhinoideis triseriata</i>	<i>Gymnura marmorata</i>		
	<i>Dasyatis dipterura</i>	<i>Urotrigon rogersi</i>		
	<i>Narcine entemedor</i>	<i>Zapteryx exasperata</i>		

II. Antecedentes

II.1. Biología y distribución de *Zapteryx exasperata*

Zapteryx exasperata (guitarra rayada) pertenece al grupo de las rayas comúnmente conocidas como guitarras, este calificativo lo reciben por la forma del cuerpo (Figura 3). 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 en el dorso (Ebert, 2003).



Figura 3. *Zapteryx exasperata* en vista dorsal (Tomado de www.oceanwideimages.com)

Z. exasperata se distingue de los demás Rhinobatidos porque el ancho del disco es casi igual a la longitud del mismo; la aleta caudal es redondeada y moderadamente larga; la primera aleta dorsal se origina más cerca de la base de las aletas pélvicas que del origen de la aleta caudal; posee una fila de espinas

agrandadas en la espalda media; ojos y espiráculos pequeños situados en el dorso de la cabeza; orificios nasales grandes y oblicuos; boca amplia pero corta; dientes pequeños carentes de filo; la coloración dorsal es de tonalidades café arenoso y gris oscuro, con varias manchas negras a manera de franjas y con manchas oscuras en el borde posterior de las aletas pectorales (Figura 3) (McEachran y Carvalho, 2002; Ebert, 2003).

La guitarra rayada tienen hábitos de forrajeo nocturnos, alimentándose de crustáceos incluyendo camarones y cangrejos. Es vivípara aplacentaria con saco vitelino, puede tener de 2 a 13 embriones (7 en promedio) por camada, la longitud total de nacimiento va desde los 15 hasta 22 cm. Los machos maduran sexualmente entre los 64 y 70 cm y alcanzan un talla máxima de 83 cm; mientras que las hembras maduran entre los 57 y 79 cm y pueden alcanzar una talla máxima de 97 cm. Al parecer, las hembras son más grandes que los machos de una misma edad, lo que es característico de los Rhinobatidos. En el estado de Sonora en el Golfo de California, 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 el sur de la costa del Pacífico de Baja California el ciclo ovárico y la gestación no coinciden (Blanco-Parra *et al.*, 2009 a; Villavicencio-Garayzar, 1995; McEachran y Carvalho, 2002; Ebert 2003).

Los estudios de distribución, sugieren que puede haber una segregación espacial por sexo, puesto que se han encontrado hembras congregadas en aguas poco profundas de bahías o lagunas (McEachran y Carvalho, 2002; Ebert, 2003). La especie se encuentra con frecuencia en zonas cálidas y templadas con cierta preferencia a arrecifes rocosos, pozas de litorales y esporádicamente en fondos arenosos; desde la zona del intermareal hasta 69 m de profundidad. Se distribuye desde el Sur de California (Estados Unidos) hasta Mazatlán (México) incluyendo

el Golfo de California y posiblemente hasta Perú (Figura 4) (McEachran y Notarbartolo di Sciara 1995; Ebert, 2003).

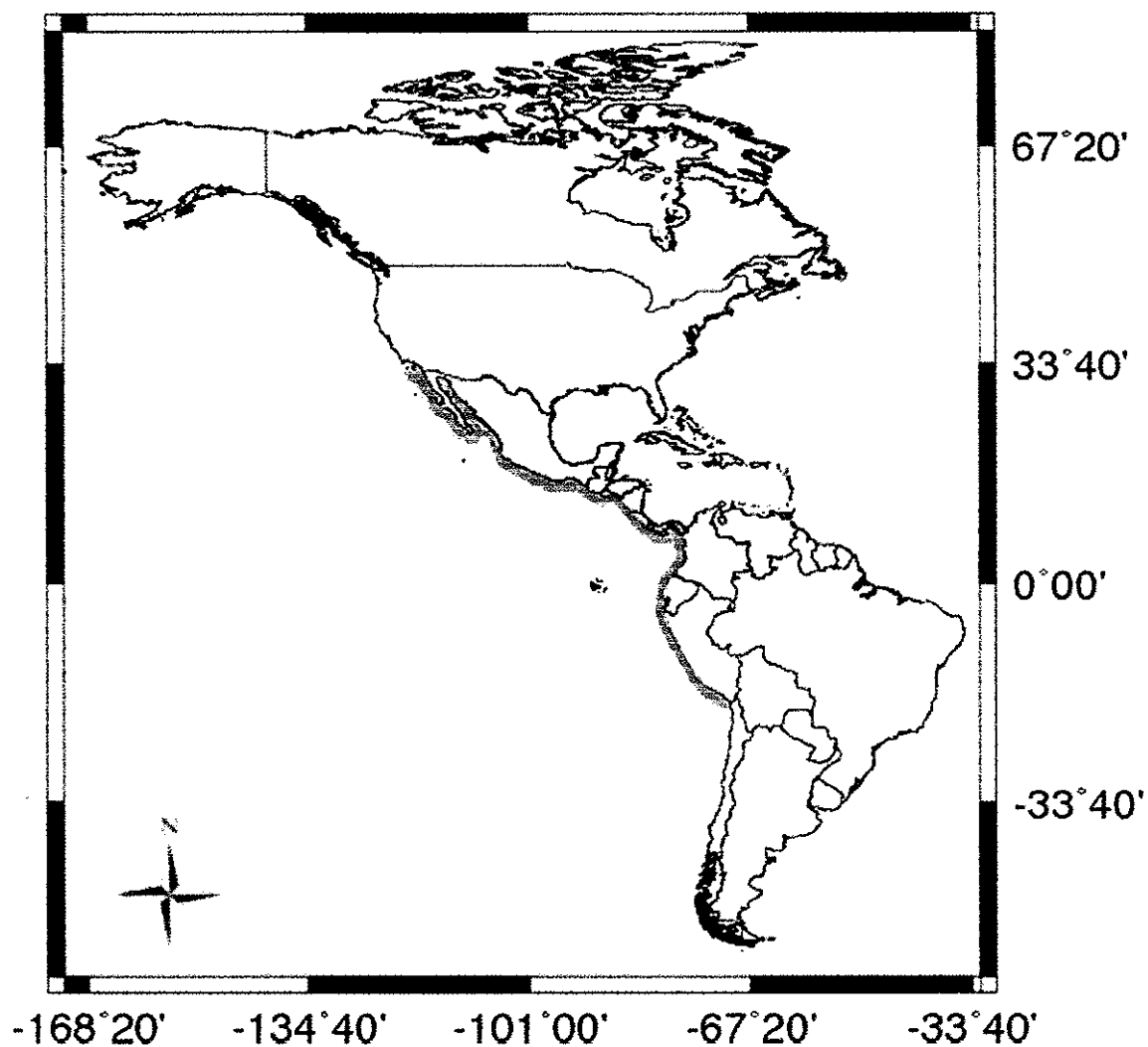


Figura 4: Distribución de la guitarra rayada *Z. exasperata* (según McEachran y Notarbartolo di Sciara (1995)

El género *Zapteryx* incluye tres especies poco conocidas, *Z. brevirostris* que se distribuye en aguas del Atlántico sudamericano (Brasil y Argentina)

(Figueiredo, 1977) y *Z. xyster* que es usualmente confundida con *Z. exasperata*. Las especies se diferencian por la coloración dorsal, *Z. xyster* presenta cuatro puntos amarillos prominentes, mientras que *Z. exasperata* tiene bandas negras (Ebert, 2003). Ebert (datos no publicados) indica que posiblemente *Z. exasperata* se distribuye al norte de Mazatlán y *Z. xyster* al sur.

II.2. Estructura genética de batoideos

Los trabajos realizados sobre estructura genética en batoideos, han seguido el desarrollo histórico de los marcadores genéticos. En los primeros estudios de genética poblacional se utilizaron las aloenzimas, una técnica electroforética que separa isoenzimas alélicas, pero la resolución para establecer diferencias genéticas es relativamente baja (Grant *et al.*, 1999). En batoideos las aloenzimas se han utilizado para examinar la estructura genética de poblaciones simpátricas en dos morfotipos del género *Myliobatis* en Brasil, donde se encontró una diferencia genética entre los morfotipos indicando que son especies crípticas, además uno de ellos presentó alta heterocigosidad (Levy and Conceição, 1989).

Con el desarrollo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se pudo amplificar genes que presentan mayor grado de variabilidad. La secuenciación de los genes mitocondriales NADH₄ y citocromo-b (cytb) de *Aetobatus narinari* en la extensa región del Indo-Pacífico, revelaron una alta y significativa estructura genética ($F_{st} \text{ NADH}_4 = 0.53$ y $F_{st} \text{ cytb} = 0.64$) entre el Este de china, Sureste de Asia y Australia (Schluessel *et al.*, 2010). En el Norte de Australia, la secuencia de la región control del ADNmt, en tres especies del género *Pristis*, revelaron una alta estructura poblacional para *P. microdon* ($F_{st} = 0.811$), *P. clavata* ($F_{st} = 0.419$) y *P. zijsron* ($F_{st} = 0.202$), sin embargo la diversidad haplotípica en las tres especies fue moderada y la diversidad nucleotídica baja Phillips *et al.*, (2011).

El gen *cytb* del ADNmt fue utilizado para analizar la estructura poblacional de *Amblyraja radiata* en el Atlántico Norte, se encontró una débil ($\theta = 0.019$ $p = 0.001$) pero significativa diferenciación poblacional, una alta diversidad haplotípica y una baja diversidad nucleotídica (Chevolot *et al.*, 2007). En aguas europeas tres marcadores moleculares (siete loci microsatélites, secuencias del gen *cytb* y parte de la región control del ADNmt) revelaron la existencia de dos clados claramente diferenciados en la raya *Dipturus batis*, en donde las rayas del norte de Europa se diferenciaron genéticamente de las del sur (Griffiths *et al.*, 2010). En esta misma región, las poblaciones de *Raja clavata* presentan una moderada diversidad haplotípica y una baja diversidad nucleotídica. Las secuencias del gen *cytb* revelaron una alta estructura poblacional ($\theta_{ADNmt} = 0.348$), sin embargo el análisis de cinco loci microsatélites nucleares reflejaron que hay una débil estructura ($\theta_{microsatélites} = 0.042$). A nivel regional, *R. clavata* presentó diferenciación entre la cuenca del Mediterráneo, los Azores y la plataforma continental europea, la baja diversidad en las poblaciones del Mar Negro posiblemente es el resultado de un reciente cuello de botella y/o aislamiento físico, que también pudo ocurrir en los Azores (Chevolot *et al.*, 2006). En el centro del Mediterráneo al parecer existen dos grupos genéticamente diferenciados de *Raja asterias*, sin embargo esto no ocurre para las especies *R. clavata* y *R. miraletus* en la misma área de estudio; estas especies presentaron baja o casi nula estructura poblacional debido al alto flujo genético. De las tres especies analizadas, *R. clavata* presentó la mayor variabilidad genética y en *R. asterias* fue nula (Valsecchi *et al.*, 2005).

En nuestra zona de estudio, la región control de ADNmt ha sido utilizada en la guitarra común *Rhinobatos productus*. Sandoval-Castillo *et al.* (2004) reportaron diversidades altas, tanto haplotípicas como nucleotídicas y niveles significativos de diferenciación genética entre las poblaciones del Golfo de California y en la costa del Pacífico de Baja California. El gen mitocondrial *NADH₂* en *Rhinoptera steindachneri* reveló evidencias de aislamiento reproductivo entre los individuos del Golfo de California y los de la costa del Pacífico de Baja California, la

diferenciación fue muy alta entre las dos localidades, ya que los individuos del Golfo de California se encontraron fijados para un haplotipo único y los individuos del Pacífico se fijaron para un haplotipo diferente (Sandoval-Castillo y Rocha-Olivares, 2011). Este patrón de diferenciación genética entre la costa del Pacífico de Baja California y el Golfo de California, no se encontró en la raya *Urobatris halleri* mediante el análisis de siete loci microsatélites, los valores bajos en el índice de fijación reflejaron la ausencia de estructura genética entre individuos provenientes del sur de California y el centro del Golfo de California, lo que sugiere que no hay poblaciones costeras aisladas; sin embargo, las muestras colectadas en Isla Santa Catalina, se diferenciaron genéticamente de las costeras, adicionalmente, esta población presentó la menor riqueza alélica y baja heterocigosidad reflejando posiblemente un reciente cuello de botella (Plank *et al.*, 2010).

III. Justificación

La guitarra rayada *Z. exasperata* es una especie de batoideo poco estudiada. Si bien, se han realizado trabajos sobre su biología reproductiva, relaciones morfométricas y pesquería (Blanco- Parra, *et al.*, 2009 a; Blanco- Parra, *et al.*, 2009 b; Villavicencio-Garayzar, 1995), se desconoce el grado de conectividad genética entre las poblaciones a lo largo del rango de distribución incluyendo el Golfo de California y la costa del Pacífico de Baja California.

Conocer la estructura genética poblacional y el flujo genético de *Z. exasperata* es importante para identificar unidades intraespecíficas genéticamente diferenciadas y reproductivamente aisladas desde una perspectiva evolutiva. Esto es necesario, para la implementación de medidas de manejo para la explotación y conservación de este batoideo que es sujeto de mortalidad por pesca.

El conocer en detalle la historia de vida, el aislamiento geográfico, los patrones de conectividad y los cambios ambientales a los que están sometidas las poblaciones de *Z. exasperata*, nos permitirá integrar estas perspectivas para comprender los procesos microevolutivos de la especie.

IV. Hipótesis

H01: No existe diferenciación genética entre los organismos de *Z. exasperata* del Golfo de California y en la costa del Pacífico de Baja California.

HA1: Existe diferenciación genética entre los organismos de *Z. exasperata* del Golfo de California y en la costa del Pacífico de Baja California.

H02: El flujo genético entre las poblaciones de *Z. exasperata* no está afectado por la distancia entre poblaciones.

HA2: El flujo genético está afectado por la distancia entre poblaciones.

V. Objetivos

V.1. Objetivo general

Cuantificar la estructura genética de la guitarra rayada *Z. exasperata* en el Golfo de California y en la costa del Pacífico de Baja California.

V.2. Objetivos específicos

- Estimar la diversidad genética de las muestras de *Z. exasperata* colectadas en el área de estudio.
- Calcular el grado de diferenciación genética entre las poblaciones de *Z. exasperata*.
- Evaluar la magnitud del flujo genético entre poblaciones de *Z. exasperata*.

VI. Materiales y métodos

VI.1. ÁREA DE ESTUDIO

Las muestras fueron obtenidas de la pesca artesanal del Golfo de California y en la costa del Pacífico de Baja California. Oceanográficamente el Golfo de California está delimitado en cuatro regiones: el Golfo Norte, comprendido desde el Delta del Río Colorado hasta la Región de las Grandes Islas; la Región de las Grandes Islas, desde el norte de la Isla Ángel de la Guarda hasta la Isla San Pedro Mártir; el Golfo Central, desde el límite sur de las Grandes Islas hasta la Bahía de Topolobampo en el oriente y La Paz en el occidente; por último, la Región Sur hasta la boca del Golfo de California (CONANP-SEMARNAP, 2000). Las condiciones hidrológicas varían a lo largo del Golfo; la región norte se caracteriza por tener altas salinidades superficiales y la temperatura varía entre los 10 °C en invierno y 32 °C en verano; en la región de las grandes islas la temperatura superficial es la más baja del Golfo, debido a la intensa mezcla por marea; en la Región Central la temperatura superficial es de 16 °C en invierno y 31 °C en verano; en la Región Sur la temperatura varía todo el año, debido a las diferentes masas de agua que se encuentran en éste lugar, pero esencialmente la estructura de la termohalina corresponde con la del Pacífico Tropical Oriental. En primavera y verano el agua entra al Golfo y en otoño e invierno sale, la temperatura y la circulación tienen una fuerte señal estacional, mientras que la salinidad no presenta este patrón (Soto-Mardones *et al.*, 1999).

La costa oeste de la península de la Baja California está influenciada por la Corriente de California, es una corriente de frontera superficial (0 a 300 m de profundidad) con un flujo paralelo a la costa en dirección al Ecuador, tanto la

temperatura como la salinidad son relativamente bajas y varía de modo estacional, oscilando entre los 9 y los 26 °C y entre los 32.5 y los 34.5 respectivamente. La velocidad de desplazamiento superficial de aproximadamente 25 cm/s y puede alcanzar los 50 cm/s (Reid *et al.*, 1963), presenta un alto contenido de oxígeno disuelto y elevadas concentración de nutrientes (Lynn y Simpson, 1987).

VI.2. Trabajo de campo

Se visitaron campos pesqueros en los estados la Baja California y Sonora. Del desembarco artesanal, se identificaron las guitarras rayadas *Z. exasperata* de los demás batoideos. De cada individuo se extrajo aproximadamente 1 cm³ de tejido muscular de las aletas, se etiquetó y preservó en etanol sin desnaturalizar al 95 % hasta su análisis posterior en el laboratorio.

VI.3. Trabajo de laboratorio

VI.3.1. Extracción del ADN

Aproximadamente 10 mg de tejido muscular o hígado fueron cortados lo más finamente posible, y se colocaron en un buffer de extracción (NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM, SDS 1 %, EDTA 50 mM, pH 8.0) con 5 µl de proteinasa K (10 mg/ml) y se dejaron incubando a 55 °C durante toda una noche. Posteriormente se precipitaron las proteínas adicionado 300 µl de LiCl 5M y se extrajeron los compuestos orgánicos con 600 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se centrifugó por 15 min a 13000 g permitiendo la separación de los compuestos en dos fases, la fase acuosa (superior) en donde se encuentra el ADN fue separada a un nuevo tubo y se le adicionó 50 µl de acetato de sodio 3 M y 1000 µl de

alcohol al 100 % para precipitar el ADN, se limpió nuevamente agregando 750 μ l de etanol al 70 %, posteriormente se redisolvió en 100 μ l de buffer TE 1X (10 mM Tris-Cl 1 mM EDTA pH 8.0). Se evaluó la calidad y cantidad del ADN en geles de agarosa al 1.5 % Posteriormente se cuantificó espectrofotométricamente la concentración del ADN del stock y se realizaron diluciones de 20 ng/ μ l.

VI.3.2. Amplificación del ADNmt

Se utilizó la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) para amplificar la región del ADNmt que codifica la subunidad dos de la NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleótido Deshidrogenasa). Para ello se utilizaron dos primers específicos diseñados para elasmobranquios: NADH₂Met47 (forward) (5'- TTT TGG GCC CAT ACC C -3') y NADH₂Trp18 (reverse) (5'- GCT TTG AAG GCT TTT GGT -3') (Sandoval-Castillo y Rocha-Olivares, 2011).

Cada reacción de 25 μ l se compuso de 0.5 mM dNTPs, 1X PCR buffer, 2.0 mM MgCl₂, 10 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 5 min a 95 °C seguidos por; 35 ciclos de: 15 seg a 95 °C, 30 seg a 60 °C, y 2 min a 72 °C; seguidos por una elongación final de 10 min a 72°C. La calidad y cantidad de los productos del PCR se verificó en geles de agarosa al 1.5 % a 95 V durante 45 min.

VI.3.3. Purificación del producto de PCR

La limpieza de los productos del PCR se realizó utilizando columnas QIAquick PCR Purification Kit de acuerdo al protocolo del fabricante (QUIAGEN Inc., Valencia CA). Para verificar la calidad y cantidad de producto de PCR, se realizó un gel de agarosa al 1.5 % a 95 V durante 45 min.

VI.3.4. Secuenciación de ADN

Una vez limpio el producto de PCR se procedió a secuenciar cada una de las cadenas complementarias en el laboratorio Langebio de Cinvestav, Irapuato.

VI.4. Análisis de datos

VI.4.1. Diversidad genética

Utilizando el programa Codon Code Aligner v3.7.1 (Codon Code Corporation, Dedham, MA, USA) se verificaron las secuencias complementarias. Posteriormente se alinearon todas las secuencias en el programa MEGA v 5.05 (Tamura *et al.*, 2011) y se obtuvieron los haplotipos mediante el programa DnaSP v.5 (Librado y Rozas, 2009).

En cada localidad se calcularon los siguientes índices de diversidad genética molecular utilizando el programa Arlequin v3.5.1.3 (Excoffier y Lischer, 2011):

1. Diversidad haplotípica (h):

$$h = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k P_i^2 \right) \quad (1)$$

Donde n es el tamaño de muestra, k es el número de haplotipos y P_i es la frecuencia del i -ésimo haplotipo de la muestra (Nei, 1987).

2. Diversidad de nucleotídica (π):

$$\pi = \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j < i} P_i P_j \hat{d}_{ij}}{L} \quad (2)$$

Donde k es el número de secuencias, P_i y P_j son las frecuencias en la i -ésima y j -ésima secuencias, d_{ij} es el número de nucleótidos diferentes por sitio nucleótido entre la i -ésima y j -ésima secuencia.

Se realizó una prueba t de Hutcheson para comparar los valores de los índices de diversidad (Zar, 1984).

VI.4.2. Diferenciación genética

Se estimaron los índices de fijación F_{st} , que involucran las frecuencias alélicas, para la hipótesis de panmixia global y para todos los pares de localidades. Los cálculos fueron realizados como un Análisis de Varianza (ANOVA) con el programa Arlequín v3.5.1.3 (Excoffier y Lischer, 2011).

VI.4.3. Número de migrantes efectivos

Se estimaron los valores de flujo genético (Nm) a partir de los valores pareado de F_{st} asumiendo el modelo de isla de Wright (Aguirre, 2007)

$$Nm = \frac{1}{4} \left(\frac{1}{F_{st}-1} \right) \quad (4)$$

VI.4.4. Patrones filogeográficos

Para la reconstrucción filogenética de los haplotipos, se elaboró un árbol filogenético enraizado en una secuencia ortóloga de *Raja radiata*, usando el

método de distancias Neighbor-Joining, con el programa MEGA v 5.05 (Tamura *et al.*, 2011). Adicionalmente se construyó una red filogenética de mínima parsimonia con el mismo programa, en la cual se indican los pasos mutacionales que diferencian a los haplotipos, utilizando el programa TreeView.v1.6.6 (Roderic D, 2001) para su representación gráfica.

VII. Resultados

VII.1 Muestreo

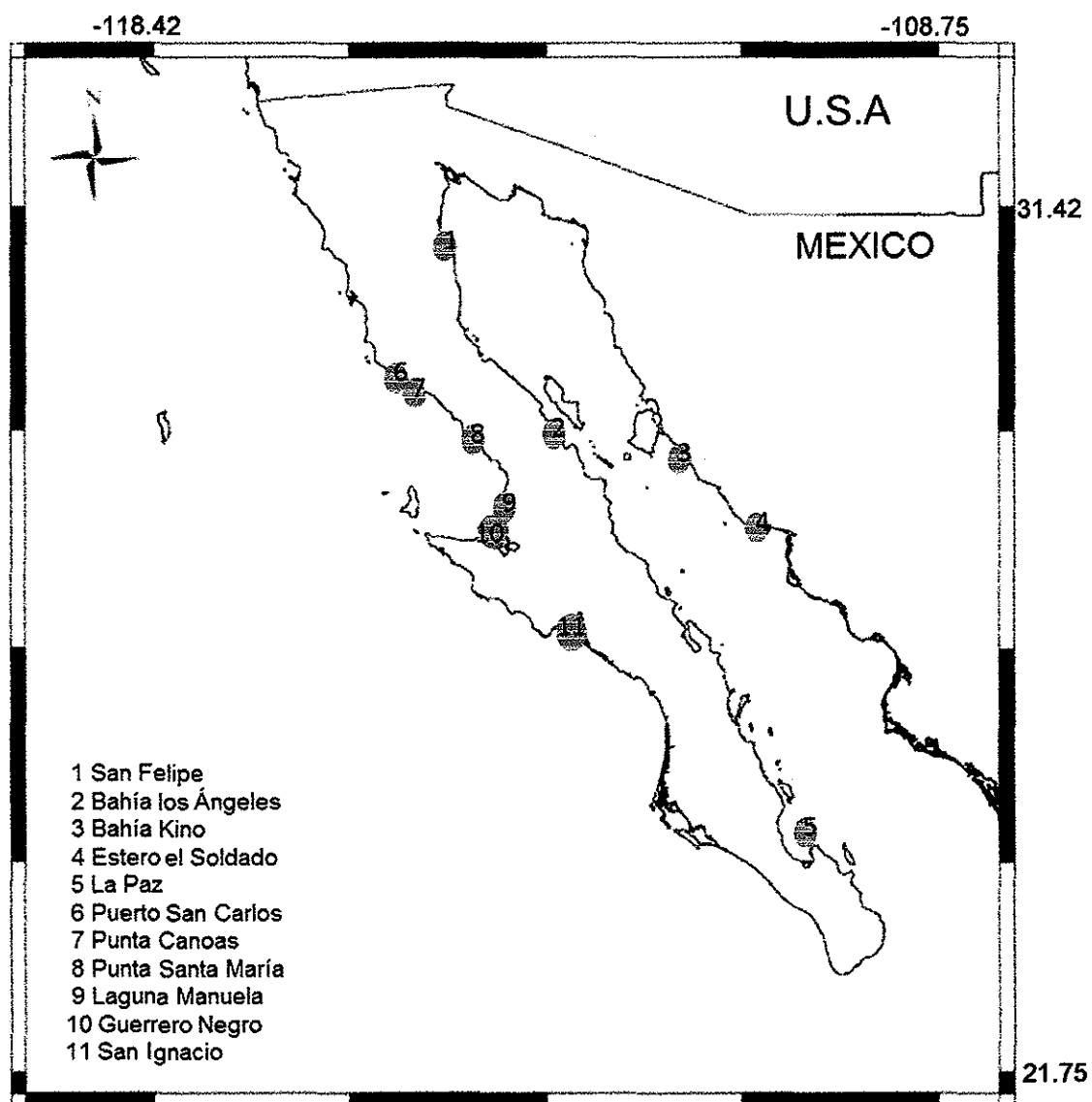


Figura 5: Posición geográfica de los campos pesqueros de donde se obtuvieron muestras de *Z. exasperata* en el Golfo de California y la costa del Pacífico de Baja California

Las muestras fueron obtenidas del desembarco pesquero artesanal de cinco campos pesqueros en el Golfo de California y de seis en la costa del Pacífico de Baja California (Figura 5). En total 159 organismos fueron obtenidos de los cuales 52 fueron del Golfo de California y 107 de la costa del Pacífico de Baja California (Tabla II).

Tabla II. Tamaño de las muestras (n) obtenidas en cada campo pesquero, posición geográfica y colector

Región	Estado	Campo pesquero	Latitud	Longitud	n	colector
Golfo de California	Sonora	Estero El Soldado	27.95	-110°96	31	Blanco-Parra
		Bahía Kino	28.82	-111.94	6	Blanco-Parra
	Baja California	San Felipe	31.01	-114.83	13	Sandoval-Castillo
		Bahía los Ángeles	28.95	-113.56	1	Sandoval-Castillo
	Baja California Sur	La Paz	24.15	-110.31	1	Sandoval-Castillo
Costa del Pacífico de Baja California	Baja California	Puerto San Carlos	29.63	-115.48	6	Santana-Morales
		Punta Canoas	29.42	-115.12	28	Castillo-Páez
		Punta Santa María	28.94	-114.51	1	Castillo-Páez
		Laguna Manuela	28.24	-114.08	28	Sandoval-Castillo
		Guerrero Negro	28.02	-114.12	24	Santana-Morales
	Baja California Sur	San Ignacio	26.38	-113.18	20	Salinas

VII.2. Extracción, amplificación y secuenciación de ADN

Debido a la heterogeneidad en los tamaños de muestra entre los campos pesqueros, éstos se agruparon en cinco localidades (Sonora, Baja California, Punta Canoas, Bahía Vizcaíno y San Ignacio) (Tabla III) con el fin de contar con

un diseño de muestreo equilibrado. Se escogieron entre 10 y 15 organismos por localidad para realizar los análisis genéticos. De los 98 organismos analizados genéticamente, se extrajo el ADN genómico del tejido muscular y se amplificó exitosamente el gen mitocondrial NADH₂ en 61 organismos (Tabla III). En el resto de las muestras (n = 37) las amplificaciones no fueron exitosas, siendo la causa principal el pobre estado de preservación de los tejidos y el alto grado de degradación del ADN extraído.

Tabla III: Número de individuos secuenciados (n) para cada campo pesquero y localidad

Región	Campo pesquero	n	Localidad	n
Golfo de California	Estero El Soldado	15	Sonora	20
	Bahía Kino	5		
	San Felipe	2	Baja California	4
	Bahía los Ángeles	1		
	La Paz	1		
Costa del Pacífico de Baja California	Puerto San Carlos	4	Punta Canoas	10
	Punta Canoas	6		
	Punta Santa María	1	Bahía Vizcaíno	16
	Laguna Manuela	7		
	Guerreo Negro	8		
	San Ignacio	11	San Ignacio	11

VII.3. Edición, alineamiento e identificación de sitios polimórficos de las secuencias de ADN

Cada secuencia fue verificada base por base y se eliminaron los extremos ruidosos de baja calidad. En el alineamiento múltiple se obtuvo una secuencia consenso de 954 pares de bases (pb). Se encontraron sólo ocho sitios polimórficos y todas las mutaciones fueron transiciones. Los sitios segregantes ocurrieron en las siguientes bases del alineamiento: 1 (T/C), 90 (T/C), 249 (C/T), 429 (C/T), 651 (C/T), 818(C/T), 834(C/T) y 857 (G/A).

La traducción de las secuencias de ADN a aminoácidos, permitió identificar que la mayoría de las mutaciones fueron sinónimas, a excepción del sitio 818 en donde hubo reemplazo de una treonina por isoleucina; esta mutación no sinónima se presentó en 12 individuos pertenecientes a diferentes localidades de la región de la costa del Pacífico de Baja California y en 1 individuo de la localidad Baja de California. La segunda mutación no sinónima se presentó en el sitio 857, el aminoácido serina fue sustituido por asparagina, y se presentó únicamente en dos individuos de la localidad de San Ignacio.

VII.4. Distribución de haplotipos

Se obtuvieron en total 10 haplotipos, de los cuales seis fueron privados y sólo cuatro compartidos (Figura 6), San Ignacio presentó el mayor número de haplotipos privados (ZAEX_7, ZAEX_8 Y ZAEX_9). Entre los haplotipos compartidos, el haplotipo ZAEX_2 se encontró en toda el área de estudio, sin embargo fue predominante en el Golfo de California, en donde se encontró en el 87% de los individuos (Figura 6, Tabla IV). El haplotipo ZAEX_3 fue el segundo más frecuente, encontrándose exclusivamente en las localidades de la costa del Pacífico de Baja California

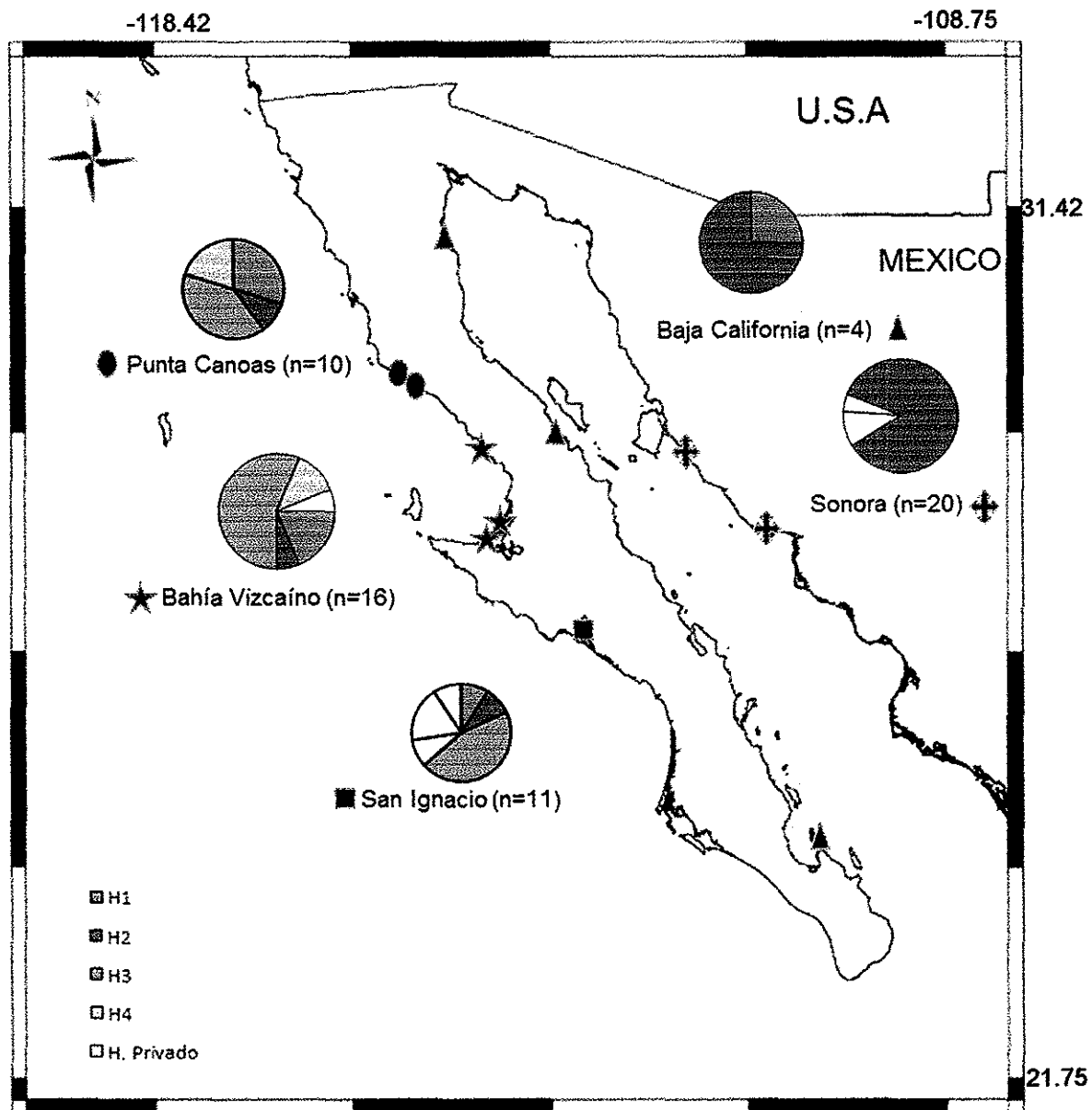


Figura 6. Distribución de haplotipos del gen mitocondrial NADH₂ de *Z. exasperata* en cada localidad, los cuatro haplotipos compartidos están codificados en colores y los privados en blanco. Los campos pesqueros están agrupados en las cinco localidades de acuerdo a los símbolos

Tabla IV. Frecuencias de cada haplotipo por localidad

Haplotipos (sitios segregados)	Localidad					Total
	Sonora	Baja California	Punta Canoas	Bahía vizcaíno	San Ignacio	
ZAEX_1 (TTCCCTCG)	0	1	3	3	1	8
ZAEX_2 (TTCCCCCG)	17	3	1	1	1	23
ZAEX_3 (CTCCCCCG)	0	0	4	9	5	18
ZAEX_4 (TTCCCTCG)	0	0	2	2	0	4
ZAEX_5 (CCCCCCCCG)	2	0	0	0	0	2
ZAEX_6 (CTCTCCCG)	0	0	0	1	0	1
ZAEX_7 (TTCTCCCG)	0	0	0	0	1	1
ZAEX_8 (TTCCCCCA)	0	0	0	0	2	2
ZAEX_9 (TTCCCTTG)	0	0	0	0	1	1
ZAEX_10 (TTTCCCCG)	1	0	0	0	0	1
Total	20	4	10	16	11	61

VII.5. Diversidad genética

Las diversidades haplotípicas (h) de las diferentes localidades fueron muy variables (Tabla V). En términos generales las muestras de la costa del Pacífico de Baja California fueron significativamente más diversas que las del Golfo de California ($t = \text{Hutcheson} = 3.04$ $p = 0.004$). San Ignacio presentó el valor más alto ($h = 0.800$) mientras que Sonora el más bajo ($h = 0.279$). Las diversidades nucleotídicas (π) fueron bajas en todas las localidades y, si bien se

correlacionaron con las diversidades haplotípicas, no fueron significativamente distintas entre las dos regiones ($t = \text{Hutcheson} = 0.91$ $p = 0.367$). Los individuos de San Ignacio presentaron la mayor diversidad nucleotídica ($\pi = 0.0018$); mientras que Sonora presentó la menor ($\pi = 0.0005$). Estos resultados reflejan el bajo grado de divergencia entre las secuencias del gen mitocondrial NADH₂. Los resultados obtenidos para la localidad de Baja California pueden estar sesgados y deben de ser tomados con cautela puesto que el tamaño de muestra es muy pequeño ($n = 4$).

Tabla V. Diversidad genética mitocondrial (NADH₂) de *Z. exasperata* en cada localidad y región. Tamaño de muestras (n) número de haplotipos (A), diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π)

Región	Localidad	n	A	h	π
	Sonora	20	3	0.279 ± 0.123	0.0005 ± 0.0005
	Baja California	4	2	0.500 ± 0.265	0.0010 ± 0.0010
Golfo de California		24	4	0.308 ± 0.118	0.0005 ± 0.0005
	Punta Canoas	10	4	0.778 ± 0.090	0.0016 ± 0.0012
	Bahía Vizcaíno	16	5	0.667 ± 0.113	0.0015 ± 0.0011
	San Ignacio	11	6	0.800 ± 0.114	0.0018 ± 0.0013
Costa del Pacífico de Baja California		37	8	0.723 ± 0.064	0.0016 ± 0.0011
	Total	61	10	0.758 ± 0.035	0.0013 ± 0.0009

VII.6. Estructura genética

El índice de fijación fue grande y altamente significativo ($F_{st} = 0.303$ $p < 0.001$) indicando un alto grado de estructura genética, el 30.29% de la variancia molecular ocurrió entre localidades (Tabla VI).

Tabla VI. Resultados del análisis de variancia ANOVA. Grados de libertad (*d.f.*)

Fuentes de Variación	<i>d.f.</i>	Suma de cuadrados	Varianza	% Variación
Entre localidades	4	6.854	0.123	30.29
Dentro de localidades	56	15.900	0.281	69.71
Total	60	22.754	0.407	

Los valores pareados de *Fst* permitieron identificar que la diferenciación genética entre las localidades residió fundamentalmente entre las muestras de Sonora y las localidades de la costa del Pacífico de Baja California, cuyas comparaciones involucraron valores de *Fst* grandes y altamente significativos (Tabla VII).

Tabla VII. Valores de *Fst* pareados entre localidades (bajo la diagonal) y sus niveles de significancia (sobre la diagonal)

Localidades	Sonora	Baja California	Punta Canoas	Bahía Vizcaíno	San Ignacio
Sonora		0.333	0.000*	0.000*	0.00*
Baja California	-0.013		0.139	0.012	0.024
Punta Canoas	0.476	0.210		0.765	0.485
Bahía Vizcaíno	0.514	0.324	-0.048		0.517
San Ignacio	0.462	0.242	0.009	-0.014	

***p <0.05 después de la corrección con Bonferroni

VII.7. Flujo genético

Como consecuencia de la homogeneidad genética entre las localidades de la región de la costa del Pacífico de Baja California, el número de migrantes estimado a partir de los valores de F_{st} resultó infinito. Sin embargo existe poca conectividad entre las regiones, el Nm promedio entre Sonora y las localidades de la costa del Pacífico de Baja California es de 0.267, indicando que hay aproximadamente un migrante cada cuatro generaciones (Tabla VIII).

Tabla VIII. Flujo genético (Nm) entre localidades calculados a partir de los valores de F_{st}

Localidades	Sonora	Baja California	Punta Canoas	Bahía Vizcaíno
Baja California	inf			
Punta Canoas	0.275	0.940		
Bahía Vizcaíno	0.236	0.522	inf.	
San Ignacio	0.291	0.783	27.05	inf

VII.8 Patrones filogeográficos de los haplotipos

No se encontró un patrón filogeográfico en el árbol filogenético Neighbor-Joining. Dada la poca divergencia molecular entre las secuencias, no se encontraron linajes claramente diferenciados con altos valores de bootstrap. El clado A (Figura 7) reúne algunos haplotipos de la región de la costa del Pacífico de Baja California, mientras que el clado B agrupa el haplotipo más frecuente del Golfo de California

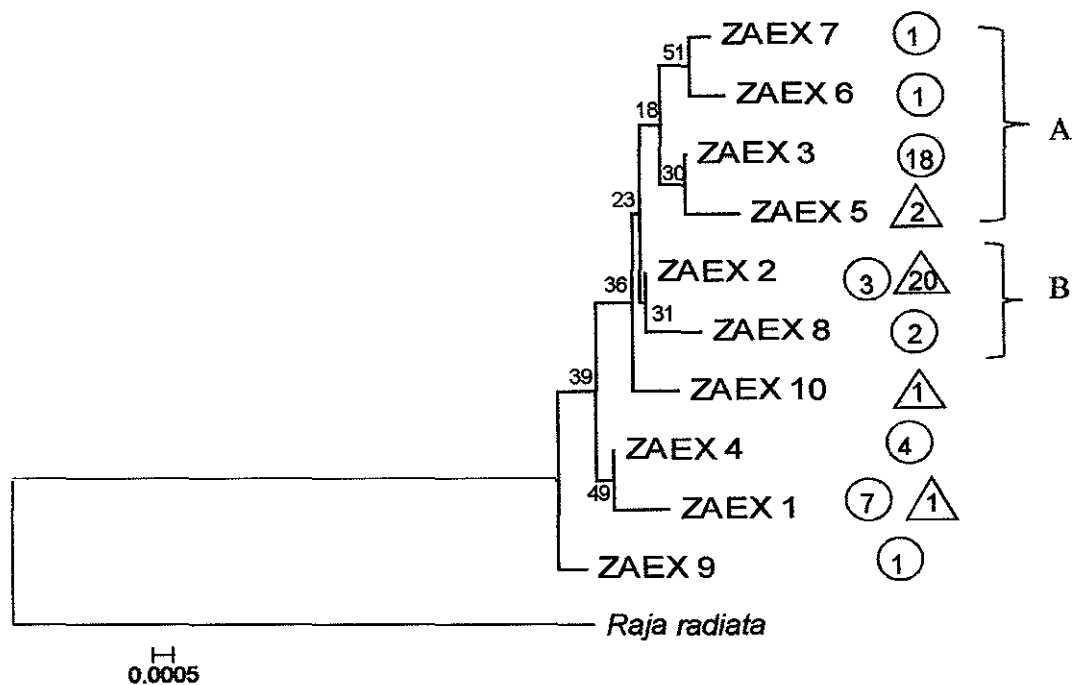


Figura 7. Árbol filogenético (Neighbor-Joining) de haplotipos de *Z. exasperata*, enraizado con *Raja radiata* como grupo de referencia. Los valores de bootstrap se ubican en cada nodo. Los haplotipos del Golfo de California se simbolizan con \triangle y los haplotipos de la costa del Pacífico de Baja California con \circ el número en cada figura representa la frecuencia del haplotipo

De manera general, en la red filogenética de haplotipos (Figura 8) se observa que la mayoría de los haplotipos están separados por sólo una mutación y en algunos casos por dos. El haplotipo ZAEX_2 y ZAEX_10 pertenecientes a la región del Golfo de California están unidos por un paso mutacional, de igual manera el haplotipo ZAEZ_3 y ZAEX_6 pertenecientes a la costa del Pacífico de Baja California.

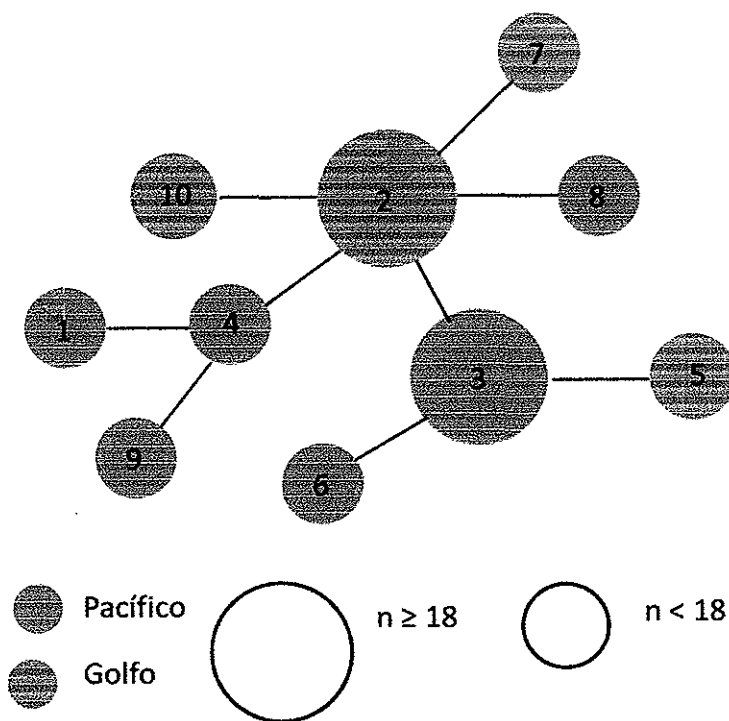


Figura 8. Red filogenética de máxima parsimonia de los haplotipos mitocondriales (NADH_2) de *Z. exasperata*. El número en cada círculo representa el haplotipo, cada línea representa un paso mutacional, el color su frecuencia en ambas regiones geográficas y el tamaño del círculo su abundancia en el total de las muestras

VIII. Discusión

El número de organismos colectados en cada localidad fue heterogéneo. Debido a esto, se realizaron agrupaciones de campos pesqueros cercanos con la finalidad de obtener un tamaño muestral equilibrado. Consideramos que los resultados obtenidos de la localidad de Baja California no son representativos y se deben de tomar con mesura, puesto que el número de individuos fue bajo ($n = 4$) y es la localidad con el área geográfica más extensa (Figura 6).

VIII.1. Estructura genética de *Zapteryx exasperata*

Rechazamos la hipótesis nula de panmixia entre todas las muestras colectadas en el Golfo de California y en la costa del Pacífico de Baja California, al encontrarse una clara estructura genética con un F_{st} de 0.303 y altamente significativo. Según Wright (1978) valores de F_{st} por encima de 0.25 indican que hay una estructura poblacional muy alta (Hartl y Clark, 1997). Para el Pacífico norte mexicano son pocos los estudios de estructura genética en batoideos, *Rhinoptera steindachneri* y *Rhinobatos productus* presentan una fuerte estructura genética (Sandoval-Castillo y Rocha-Olivares, 2011; Sandoval-Castillo *et al.*, 2004); sin embargo, *Urobatris halleri* no presenta estructura genética en muestras colectadas al sur de California y el centro del Golfo de California (Plank *et al.*, 2010).

Sewall Wright (1952) propone el modelo de islas, suponiendo que las especies pueden estar conformadas por poblaciones discretas, que han sido diferenciadas por mutación y deriva genética. Indica que la tasa de fijación de un

haplotipo es inversamente proporcional al tamaño efectivo poblacional, pero puede ser contrarrestado, con la transferencia de genes en menor o mayor grado de una población a otra. El flujo genético puede actuar y mantener homogeneizada la especie; por consiguiente, si el flujo genético es alto, todas las poblaciones evolucionarán juntas; en contraparte, si el flujo de genes es bajo, cada población comenzará a divergir por sí sola y establecerán linajes evolutivamente independientes (Lowe, and Allendorf, 2010; Hartl and Clark, 1997).

Si consideramos lo expuesto anteriormente, podremos indicar que todas las localidades muestreadas de la costa del Pacífico de Baja California representan una sola población puesto que presentaron un flujo continuo de genes. Lo mismo parece ocurrir entre las localidades del Golfo de California; sin embargo, somos conscientes de que este resultado requiere de un mayor número de muestras, dado que los organismos de la localidad de la Baja California no son representativos. Los valores pareados de F_{st} revelan que las mayores diferencias se encuentran entre la localidad de Sonora y las localidades de la costa del Pacífico de Baja California. El flujo genético entre la costa del Pacífico de Baja California y el Golfo de California es muy bajo, aproximadamente hay un migrante cada cuatro generaciones, por lo que proponemos la existencia de dos poblaciones para *Z. exasperata* en el Pacífico Norte Mexicano. Una población en el Golfo de California y otra en la costa del Pacífico de Baja California.

El flujo de genes puede ser afectado por la distancia geográfica, barreras geográficas, oceanográficas (corrientes, temperatura, salinidad etc.) y/o ecológicas (Bernardi *et al.*, 2003). Las dos regiones de estudio presentan hábitats diferentes con características propias en cada masa de agua. Las propiedades fisicoquímicas de la Boca del Golfo de California, corresponden a las del Océano Pacífico Tropical Oriental y son muy diferentes a las condiciones termohalinas de la Corriente de California que bordean la costa oeste de la Península de la Baja California (Soto-Mardones *et al.*, 1999). Puede ser que la diferenciación genética

entre las dos poblaciones de *Z. exasperata* se deba a la presencia de una barrera oceanográfica.

Eventos geográficos pueden explicar el patrón discontinuo que una especie presenta, este proceso conocido como vicarianza, quizás pueda ser el causante de la diferenciación genética entre las poblaciones del Golfo de California y la de la costa del Pacífico de Baja California como se ha evidenciado en peces teleósteos (Bernardi *et al.*, 2003). La formación de la península de Baja California desde hace aproximadamente 5.5 millones de años y el cierre reciente de los canales marinos a lo largo de la península (Holt *et al.*, 2000; Riddle *et al.*, 2000; Sandoval-Castillo *et al.*, 2004), que conectaban irregularmente el Océano Pacífico con el Mar Cortez, posiblemente fue una barrera geográfica que produjo la diferenciación genética de *Z. exasperata*.

Otra posible hipótesis por la cual *Z. exasperata* presenta un alto grado de estructura genética en el Pacífico norte mexicano, es la filopatría reproductiva, que implica que los individuos vuelvan al mismo lugar de apareamiento; sin embargo este comportamiento ha sido poco documentado en especies de batoideos (Holden, 1975; Whittamore and McCarthy, 2005; Chevolut *et al.*, 2006). La fidelidad a los sitios de reproducción evita que individuos maduros visiten nuevos lugares para reproducirse, disminuyendo la posibilidad de intercambiar genes entre poblaciones. Se ha reportado que *Z. exasperata* tiene agrupaciones masivas en bahías (p. ej., Bahía Kino en el estado de Sonora y Bahía Almejas y Bahía Vizcaíno en la costa del Pacífico de la Baja California), a finales de la primavera y principios del verano, que corresponden con la época reproductiva. Sin embargo, no se han realizado estudios que demuestren que son los mismos individuos los que concurren al mismo lugar en cada época reproductiva (Cartamil *et al.*, 2011; Banco-Parra *et al.*, 2009 b; Villavicencio-Garayzar *et al.*, 1995).

Datos morfológicos y de biología reproductiva indican algunas posibles diferencias fenotípicas entre poblaciones, que se correlacionan con la distinción genética encontrada en este trabajo. En el estado de Sonora el promedio de la longitud total (LT) de machos para *Z. exasperata* es 70.0 ± 9.9 cm y en hembras de 73.5 ± 10.4 cm (Banco-Parra *et al.*, 2009 a). Sin embargo, los individuos del Pacífico de Baja California en Bahía Vizcaíno son un poco más grandes, los machos tienen una LT promedio de 79.9 ± 6.9 cm y las hembras 83.4 ± 10.0 cm (Cartamil *et al.*, 2011). Adicionalmente, los períodos de gestación y los ciclos ováricos no muestran el mismo patrón (Tabla IX). En Sonora (Golfo de California) la ovulación, cópula y fecundación ocurren inmediatamente después del parto, por lo que el ciclo ovárico y el periodo de gestación ocurren simultáneamente; en contraparte, en Bahía Almejas (sur de la costa del Pacífico de Baja California) el ciclo ovárico y la gestación no coinciden (Banco-Parra *et al.*, 2009 b).

Tabla IX. Comparación de algunos aspectos de la biología *Z. exasperata*, entre el Golfo de California y la costa del Pacífico de Baja California (Tomada de Banco-Parra *et al.*, 2009 b).

	Sur de costa del Pacífico de Baja California	Sonora, Golfo de California
Fecundidad Uterina	4 - 11	2 - 13
Diámetro máximo del óvulo	42 mm (Marzo a Abril)	40 mm (Julio)
LT máxima del embrión	155 mm (Junio)	187 mm (Mayo)
Ciclo de vitelogenesis	Agosto - Abril	Febrero .- Julio
Periodo de gestación	Abril - Julio	Febrero- Julio
Ovulación y cópula	Abril	Julio

VIII.2. Diversidad genética de *Z. exasperata*

Las diversidades genéticas obtenidas mediante la secuenciación del gen mitocondrial NADH₂ en las localidades fueron heterogéneas. Esto se debe, a la variabilidad en el número de individuos, sitios segregantes y haplotipos presentes en cada localidad. La baja diversidad genética del Golfo de California, es el reflejo de las pocas sustituciones, el bajo número de haplotipos y la dominancia de uno de ellos (ZAEX_2). Se han reportado diversidades genéticas bajas, en otra especie de batoideo en la misma área de estudio. Sandoval-Castillo y Rocha-Olivares (2011) reportaron que existe una baja diversidad haplotípica ($h = 0.152$) y nucleotídica ($\pi = 0.114$) en *Rhinoptera steindachneri* utilizando el mismo gen mitocondrial NADH₂.

Existen diferentes hipótesis para explicar la baja diversidad genética encontrada en el Golfo de California. Puede ser que esta población este reducida sustancialmente; es decir, que el tamaño efectivo poblacional sea tan pequeño, que la deriva genética se encuentra fijando un haplotipo en esta población (Hellberg *et al.*, 2002), puesto que la mayoría (83 %) de los individuos presentaron el haplotipo ZAEX_2.

Un posible reciente cuello de botella, puede ser otra hipótesis que explique la baja diversidad genética. La población pudo haber tenido un descenso drástico en el tamaño efectivo poblacional, como consecuencia de la reducción de hábitats disponibles en un periodo de bajas temperaturas característico de una glaciación, en donde las especies de hábitats polares y templados migraban al trópico en busca de hábitats óptimos (Plank *et al.*, 2010; Smith, 1986). *Z. exasperata* habita ambientes templados y tropicales, las poblaciones del este estudio habitan ambientes templados, y posiblemente fueron afectadas por la última glaciación. Quizás un cuello de botella también pudo haberse causado, por la presión

pesquera a la que está sometida *Z. exasperata* en el estado de Sonora, al tener importancia comercial y ser un componente abundante en la pesca artesanal de batoideos en el estado (Blanco-Parra *et al.*, 2009 a). Las generaciones posteriores de este posible cuello de botella presentan baja diversidad genética, los haplotipos raros tienden a desaparecer y dominan los haplotipos comunes. Sin embargo, es necesario resaltar, que no podemos afirmar ni refutar que la baja diversidad observada en el Golfo de California, se deba a un posible cuello de botella causado por sobreexplotación del recurso o periodos de glaciación.

La combinación de bajas diversidades tanto nucleotídicas como haplotípicas han sido atribuidas a posibles efectos fundadores. Un subconjunto de individuos no representativo de una población puede colonizar un hábitat, la población pionera presentar exceso de haplotipos raros o escasos de haplotipos comunes de la población fuente. Este escenario de baja densidad poblacional y la baja diversidad genética de la población colonizadora, permite que la deriva genética actúe y sus efectos sean evidentes. La población del Golfo de California quizás sea el resultado de un efecto fundador por la recolonización de hábitats desde la última intreglaciación (Hewitt, 1999; Plank *et al.*, 2010; Hagstrum *et al.*, 1987).

Una población periférica se sitúa en el límite del rango ocupado por la especie de forma habitual; sin embargo, estos rangos no son constantes y varían en el tiempo y espacio (Guo *et al.*, 2005). Considerando la posibilidad, que la población del Golfo de California, sea el resultado de una reciente expansión de la población de la costa del Pacífico de Baja California, los resultados encontrados se ajustarían a los modelos que proponen Bridle y Vines (2007) de poblaciones que están al borde del área de distribución de una especie, en donde las bajas diversidades genéticas y la homogenización de la estructura poblacional puede ser el resultado de efectos fundadores o cuellos de botellas que las poblaciones periféricas sufren (Hewitt, 1999).

Un escenario completamente diferente se observó en las localidades de la costa del Pacífico de Baja California, en donde la diversidad haplotípica fue alta y similar a la reportada por Sandoval-Castillo *et al.* (2004), para un especie de la misma familia, la guitarra *Rhinobatos productus* ($h = 0.749$) en la misma área de estudio; sin embargo, ellos analizaron RFLPs de la región control mitocondrial (no codificante). Posiblemente la alta diversidad genética pueda deberse a la combinación de que tanto la densidad poblacional y la tasa de fecundidad en esta población, son lo suficientemente altas para contrarrestar los efectos de la deriva genética en el tamaño efectivo poblacional (Hellberg *et al.*, 2002). No se tienen datos sobre la densidad poblacional de *Z. exasperata*; sin embargo, datos pesqueros pueden brindar una idea acerca de la abundancia de una especie. Cartamil *et al.* (2011) reportan elevadas capturas en la pesquería artesanal de Laguna Manuela (CPUE = 9.04 ind/viaje) en la costa del Pacífico de Baja California. Frisk, (2010) indica que la familia Rhinobatidae a la que pertenece la *Z. exasperata* tiene una moderada fecundidad, Blanco-Parra *et al.*, (2009 b) reportan para esta especie de 4 a 13 embriones por camada

La diversidad haplotípica alta puede ser el reflejo, de que la población sea muy grande y por consiguiente, presente mayor número de posibilidades para que ocurran mutaciones. Las mutaciones tienen un importante rol en la diversidad genética de las poblaciones, puesto que son una fuente importante en la introducción de nuevos haplotipos. Una mutación sinónima mantiene la codificación del aminoácido; por el contrario, una mutación no sinónima causa el reemplazo de un aminoácido por otro (Hartl and Clark, 1997; Castillo, 2007).

Las mutaciones no sinónimas pueden brindar la posibilidad de un cambio potencialmente adaptativo, posiblemente sean la selección natural y la deriva genética al azar, las fuerzas evolutivas que pueden favorecer o desfavorecer la sobrevivencia del haplotipo (Castillo, 2007). En el caso de *Z. exasperata*, es

posible que la mutación no sinónima del sitio segregado 818 pueda ser sujeto de selección natural, dado el alto sesgo en su distribución geográfica, presentándose en 12 de los 37 organismos del Pacífico (32%) pero sólo en uno de los 24 peces del Golfo de California (1%).

Este es un claro ejemplo en el cual, las poblaciones de una especie con una amplia distribución y que habita ambientes distintos, puede estar sujetas a diversas presiones y por lo tanto responde de manera diferente, puesto que en la población de Golfo de California se encontraron diversidades haplotípicas bajas y en la costa del Pacífico de Baja California diversidades haplotípicas altas.

VIII. 3. Patrones filogenéticos

Los haplotipos que se obtuvieron con la secuenciación del gen mitocondrial NADH₂, pueden dar el registro de la historia matrilineal de las mutaciones; por consiguiente, estos eventos mutacionales pueden conectarse filogenéticamente y plasmarse en un filograma. Dicha reconstrucción puede sobreponerse a la distribución geográfica de los sitios de muestreo para realizar un análisis filogeográfico (Avice *et al.*, 1987).

Si bien, en la reconstrucción filogenética no se encontró ningún patrón, ni altos valores de bootstrap, que evidencien la existencia de linajes de al menos dos poblaciones bien diferenciadas, se logran percibir dos clados, uno que agrupa algunos haplotipos de la región del la costa del Pacífico de Baja California y otro con el haplotipo más frecuente de la región del Golfo de California. En la red filogenética de haplotipos, tampoco se observa ningún patrón filogenético, la mayoría de los haplotipos están estrechamente relacionados y la divergencia entre haplotipos es muy baja. Lo anterior puede sugerir, que las poblaciones si bien se encuentran genéticamente aisladas y diferenciadas, sus linajes

mitocondriales aún han divergido y han alcanzado un arreglo completo de linajes entre el Pacífico y el Golfo de California, de tal forma que los organismos de ambas localidades resultan polifiléticos.

VIII.4. Implicaciones para el Manejo y Conservación

Bajo el nivel de resolución que nos da el marcador molecular mitocondrial codificante NADH₂ y teniendo en cuenta el criterio de Unidades Evolutivamente Significativas (UES) (Moritz, 1994), se propone considerar la existencia de dos UES para *Z. exasperata* en el Pacífico norte mexicano: una en el Golfo de California y otra en la costa del Pacífico de Baja California. Cada UES presenta características genéticas únicas y por lo tanto, deberían de ser tratadas por separado y de manera diferente.

La baja diversidad genética que se presenta en la región del Golfo de California, pueden ser el reflejo de un reciente cuello de botella o efecto fundador, y esto puede sugerir un cierto grado de vulnerabilidad de la población (Plank *et al.*, 2010). Aunque en el presente estudio, no podemos afirmar ni descartar la hipótesis de que las bajas diversidades genéticas encontradas se deban a la sobreexplotación, diversos estudios han indicado que las diversidades genéticas pueden dar indicativos del estado de salud de las poblaciones, una población que está siendo presionada o explotada puede presentar diversidades genéticas bajas (Chevolot *et al.*, 2006). Por consiguiente, si esto se confirma en estudios posteriores será evidente que se requiera de una eficaz gestión y adecuado manejo para conservar este recurso.

IX. Principales Hallazgos

Las diversidades genéticas de las dos poblaciones son diferentes, presentando alta diversidad haplotípica la región de la costa del Pacífico de Baja California y una baja diversidad haplotípica la región del Golfo de California, y por lo tanto deben de ser manejadas para su conservación de manera diferente.

Existe alto flujo genético entre las localidades de la costa del Pacífico de Baja California, pero éste se reduce drásticamente entre regiones, lo que refleja la limitada conectividad de las poblaciones.

No existe un patrón filogenético claro, que separe la población del Golfo de California de la población de la costa del Pacífico de Baja California, los haplotipos están estrechamente relacionado y la divergencia entre las poblaciones es muy baja.

Bajo el criterio de Unidades Evolutivamente Significativas y con el valor obtenido del índice de fijación, se consideran dos poblaciones para *Z. exasperata*, una presente en el Golfo de California y otra en la costa del Pacífico de Baja California.

X. Recomendaciones

Optimizar la preservación de los tejidos musculares para que el ADN no se degrade y se logre amplificar. Evitar la preservación hígado puesto que su ADN se degrada con mucha facilidad.

Aumentar el tamaño de muestra para la localidad de Baja California, así como aumentar en al menos una localidad más, para la región del Golfo de California.

Analizar con otras herramientas moleculares como los microsatélites, que complementen los resultados mitocondriales y nos puedan ayudar a mejorar las inferencias e hipótesis ecológicas y evolutivas de este trabajo.

XI. Literatura citada

- Aguirre, E. 2007. Flujo genético: Métodos para estimarlo y marcadores moleculares. En: Eguiarte, L., Souza, V. and Aguirre, X. Ecología Molecular. SEMARNAT, Instituto Nacional de Ecología. México. 49-62p.
- Avise, J., Arnold, J., Ball, R., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J., Reeb, C. and Saunders, N. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual review of ecology and systematics*, 18: 489–522.
- Bernardi, G., Findley, L. and Rocha-Olivares, A. 2003. Vicariance and dispersal across Baja California in disjunct marine fish populations. *Evolution*, 57(7): 1599–1609.
- Bizzarro, J., Smith, W., Castillo-Géniz, L., Ocampo-Torres, A., Márquez-Farías, F. and Hueter, R. 2009 a. The seasonal importance of small coastal sharks and rays in the artisanal elasmobranch fishery of Sinaloa, Mexico. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 4(4): 513-531.
- Bizzarro, J., Smith, W., Hueter, R. and Villavicencio-Garayzar, C. 2009 b. Activities and catch composition of artisanal elasmobranch fishing sites on the eastern Coast of Baja California Sur, México. *Southern California Academy of Sciences*, 108(3): 137-151.
- Bizzarro, J., Smith, W., Márquez-Farías, F., Tyminski, J. and Hueter, E. 2009 c. Temporal variation in the artisanal elasmobranch fishery of Sonora, México. *Fisheries Research*, 97: 103–117.
- Blanco-Parra, M., Márquez-Farías, F. and Galván-Magaña, F. 2009 a. Fishery and morphometric relationships of *Zapteryx exasperata*. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 4(4): 456-465.
- Blanco-Parra, M., Márquez-Farías, F. and Galván-Magaña, F. 2009 b. 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.

- Bowen, B. and Grant, W. 1997. Phylogeography of the sardines (*Sardinops* spp.): assessing biogeographic models and population histories in temperate upwelling zones. *Evolution*, 51: 1601–1610.
- Bridle, J. and Vines, T. 2007. Limits to evolution at range margins: when and why does adaptation fail? *Trends in Ecology and Evolution*, 22: 140-147.
- Cartamil, D., Santana-Morales, O., Escobedo-Olvera, M., Kacev, D., Castillo-Genizd, L., Grahama, J., Rubín, R. and Sosa-Nishizaki, O. 2011. The artisanal elasmobranch fishery of the Pacific coast of Baja California. *Fisheries Research*, 108: 393–403.
- Castillo, A. 2007. Selección natural a nivel molecular. En: Eguiarte, L., Souza, V. and Aguirre, X. *Ecología Molecular*. SEMARNAT, Instituto Nacional de Ecología. México. 11-48 p.
- Chevolot, M., Hoarau, G., Rijnsdorp, A., Stam, W. and Olsen, J. 2006. Phylogeography and population structure of thornback rays (*Raja clavata* L., Rajidae). *Molecular Ecology*, 15: 3693–3705.
- Chevolot, M., Wolfs, P., Pálsson, J., Rijnsdrop, A., Stam, W. and Olsen, J. 2007. Population structure and historical demography of the thorny skate (*Amblyraja radiata*, Rajidae) in the North Atlantic. *Marine Biology*, 151: 1275–1286.
- CONANP-SEMARNAP. 2000. Programa de manejo área de protección de flora y fauna Islas del Golfo de California. Primera edición. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. México. 262p.
- Coyne, J. 1994. Ernst Mayr and the origin of the species. *Evolution*, 48(1): 19-30.
- Cruz-Agüero, J., Arellano-Martínez, M. y Cota-Gómez, V. 1996. Lista sistemática de los peces marinos de las lagunas de Ojo de Liebre y Guerrero Negro, BDS y BC, México. *Ciencias Marinas*, 22(1): 111-128.
- Ebert, D. 2003. *Sharks, Rays, and Chimaeras of California*. Universidad de California Press. Berkeley and Los Angeles. California. 284p.
- Excoffier, L. and Lischer, H. 2011 Arlequin. An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. Version 3.5.1.3. Computational and Molecular Population Genetics Lab (CMPG) Berna, Suiza.
- Frisk, M. 2010. Life History Strategies of Batoids. En: Carrier, J. Musick, A and Heithaus, M. *Biology of Sharks and their relatives (2): Physiological Adaptations, Behavior, Ecology, Conservation and Management of Sharks and Their Relatives*. 283-307.

- Figueiredo, J. 1977. Manual de peixes Marinhos do Sudeste do Brasil. I. Introdução. Cações, raias e quimeras (Guide to marine fish from Southeastern Brazil. I. Introduction. Sharks, rays and chimeras). Museu de Zoologia – USP, São Paulo, 104p.
- Grant, W., García, J. and Utter, F. 1999. Defining population boundaries for fishery management. En: Mustafa. M. Genetics in Sustainable Fisheries Management. Fishing News Books, 27-71.
- Griffiths, A., Sims, D., Cotterell, S., Nagar, A., Ellis, J., Lynghammar, A., McHugh, M., Neat, F., Pade, N., Queiroz, N., Serra-Pereira, B., Rapp, T., Wearmouth, V. and Genner, M. 2010. Molecular markers reveal spatially segregated cryptic species in a critically endangered fish, the common skate (*Dipturus batis*). Proceedings of the Royal Society B, 277: 1497–1503.
- Guo, Q., Taper, M., Schoenberger, M. and Brandle, J. 2005. Spatial/temporal population dynamics across species range: from centre to margin. Oikos, 108: 47-57.
- Hagstrum, J., Sawlan, T., Hausback, M., Smith, B. and Grommé, J. 1987. Miocene Paleomagnetism and Tectonic Setting of the Baja California Peninsula, Mexico. Journal of geophysical research, 92 (B3): 2627-2639.
- Hartl, D. and Clark, A. 1997. Principles of population genetics. 3rd. ed Sinauer Associates Inc. Sunderland. M.A. 542p.
- Hedrick, P. 2000. Genetics of Populations. Jones and Bartlett Publishers. Boston. 545p.
- Hellberg, M., Burton, R., Neigel, J. and Palumbi, S. 2002. Genetic assessment of connectivity among marine populations. Bulletin of Marine Science, 70(1): 273–90.
- Hewitt, G. 1999. Post-glacial re-colonization of European biota. Biological Journal of the Linnean Society, 68: 87–112.
- Holden, M. 1975. Fecundity of *Raja clavata* in British waters. Journal International Council for the Exploration of the Marine Science 36(2): 110–118.
- Holt, J., Holt, E., and Stock, J. 2000. An age constraint on Gulf of California rifting from the Santa Rosalía basin, Baja California Sur, Mexico. Bulletin of the geological society, 112: 540–549.
- Levy, J. and Conceição, B. 1989. Biochemical evidences for two sibling species of genus *Myliobatis* (Chondrichthyes: Myliobatidae) in south Brazil.

Comparative Biochemistry and Physiology part B: Comparative Biochemistry, 94(4): 687-90.

- Librado, P. y Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451-1452.
- Lowe, W. and Allendorf, F. 2010. What can genetics tell us about population connectivity? *Molecular Ecology*, 19: 3038-3051.
- Lynn, R. and Simpson, J. 1987. The California Current system: The seasonal variability of its physical characteristics. *Journal of Geophysical Research*, 92: 12947-12966.
- Márquez-Farias, F. 2002. The artisanal ray fishery in the Gulf of California: development, fisheries research and management issues. *Shark News*, 14:1-5p.
- McEachran, J. and Carvalho, M. 2002. Peces batoideos. En: *The Living Marine resources of the Western Central Atlantic. Species Identification Guide for Fishery Purposes and American Society of Ichthyologists and Herpetologists Special publication*. FAO. Carpenter. K. Rome. 508-569p.
- McEachran, J. y Notarbartolo di Sciara. G. 1995. Peces Batoideos. En: Fischer, W., Krupp, F., Schneider, W., Sommer, C., Carpenter, K., and Niem. V. *Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico Central-Oriental. Vol. II. Vertebrados—parte I*. Roma 745-792p.
- Moritz, C. 1994. Defining Evolutionarily Significant Units for conservation. *Trends Ecology and Evolution*, 9:373-375 p
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York. 512 p.
- Phillips, N., Chaplin, J., Morgan, D. and Peverell, S. 2011. Population genetic structure and genetic diversity of three critically endangered *Pristis* sawfishes in Australian waters. *Marine Biology*, 158: 903-915
- Plank, S., Lowe, C., Feldheim, K., Wilson, R. and Bruslan, J. 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: 329-340.
- Reid, J., Schwartzlose, A. and Brown, D. 1963. Direct measurements of a small surface eddy off northern Baja California. *Journal of Marine Research*, 21: 205-218.

- Riddle, B., Hafner, D., Alexander, L. and Jaeger, J. 2000. Cryptic vicariance in the historical assembly of a Baja California peninsular Desert biota. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 14438–14443.
- Roderic, D. 2001. Treeview. V1.6.6. Disponible En: <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>
- Sandoval-Castillo, J., Rocha-Olivares, A., Villavicencio-Garayzar, C. and Balart, E. 2004. Cryptic isolation of Gulf of California shovelnose guitarfish evidenced by mitochondrial DNA. *Marine Biology* 145: 983-988
- Sandoval-Castillo, J. and 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.
- Schluessel, V., Broderick, D., Collin, S. and Ovenden, J. 2010. Evidence for extensive population structure in the white-spotted eagle ray within the Indo-Pacific inferred from mitochondrial gene sequences. *Journal of Zoology*, 281: 46-55.
- Sinclair, M. 1988. *Marine populations: An essay on population regulation and speciation*. University of Washington. Seattle. 252 p.
- Smith, D., Bizzarro, J. and Cailliet, G. 2009. La pesca artesanal de elasmobranquios en la costa oriental de la Baja California, México: Características y consideraciones de manejo. *Ciencias marinas*, 35: 209-236
- Smith, P. 1986. Low genetic variation in shark (Chondrichthyes). *Copeia*, 1968 (1): 202-207
- Soto-Mardones, L., Marione, S. y Parés-Sierra, A. 1999. Variabilidad espaciotemporal de la temperatura superficial del mar en el Golfo de California. *Ciencias Marinas*, 25 (1): 1-30
- Stevens, J., Bonfil, R., Dulvy, N. and Walker, P. 2000. The effects of fishing on sharks, rays, and chimaeras (chondrichthyans), and the implications for marine ecosystems. *ICES Journal of Marine Science*, 57: 476–494.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*.

- Taylor, R. and Turnbull, M. 2005. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature Reviews Genetics*, 6: 389-402
- Valsecchi, E., Vacchi, M. and Di Sciara, G. 2005. Characterization of a new molecular marker for investigating skate population genetics: analysis of three Mediterranean skate species (genus *Raja*) of commercial interest as a test case. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, 35: 225–231.
- Villavicencio-Garayzar, C. 1995. Biología reproductiva de la guitarra pinta, *Zapteryx exasperata* (Pisces: Rhinobatidae), en Bahía Almejas, Baja California Sur, México. *Ciencias Marinas*, 21(2): 141–153.
- Whittamore, J. and McCarthy, I. 2005. The population biology of the thornback ray, *Raja clavata* in Caernarfon Bay, north Wales. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 85: 1089–1094.
- Zar, J. 1984. *Biostatistical analysis*. 2nd. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ. 130p.