

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos Autor.

CICESE@ 2023. Todos los derechos reservados

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



---

**Doctorado en Ciencias  
en Ciencias de la Vida  
con orientación en Biología Ambiental**

---

***Conectividad genética entre provincias del Golfo de México, de  
larvas y adultos de *Bothus robinsi****

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

Presenta:

**José Manuel Morales Pulido**

Ensenada, Baja California, México  
2023

Tesis defendida por  
**José Manuel Morales Pulido**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez**  
Codirectora de tesis

---

**Dra. Sylvia Patricia Adelheid Jiménez Rosenberg**  
Codirectora de tesis

**Dr. Adrián Munguía Vega**

**Dra. María Clara Arteaga Uribe**

**Dra. Paula Pérez Brunius**

**Dr. Axayácatl Rocha Olivares**



---

**Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo**  
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

---

**Dra. Ana Denise Re Araujo**  
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **José Manuel Morales Pulido** como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en Ciencias de la Vida [con orientación en Biología Ambiental](#).

***Conectividad genética entre provincias del Golfo de México, de larvas y adultos de *Bothus robinsi****

Resumen aprobado por:

---

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez  
Codirectora de tesis

---

Dra. Sylvia Patricia Adelheid Jiménez Rosenberg  
Codirectora de tesis

Para generar una visión más completa de la conectividad (intercambio de individuos entre poblaciones) de organismos marinos como peces, es necesario tomar en cuenta los procesos en su historia de vida que incluye la dispersión de larvas y adultos. A partir de las larvas en tránsito, se puede obtener la información genética potencial capaz de influir en la diversidad y estructura genética de la población adulta. A partir de los adultos, se obtiene la información genética resultante de eventos de dispersión larval exitosos de múltiples cohortes. El lenguado *Bothus robinsi* es un organismo cuyas larvas pelágicas permanecen varios meses en el plancton, lo que promueve la conectividad entre provincias del golfo de México (GM). Para abordar su estudio, es necesario generar información ecológica y distinguir taxonómicamente sus larvas, dado que debido a su similitud morfológica con las de *Bothus ocellatus*, éstas no pueden ser identificadas morfológicamente durante el periodo larval. Dado lo anterior, el primer objetivo de este estudio fue generar un registro de distribución y abundancia larval, basado en identificaciones moleculares. Posteriormente, se generó información genética a partir de larvas y adultos para corroborar la existencia de conectividad genética entre provincias, además de probar la hipótesis de dispersión colectiva de larvas. Las larvas fueron muestreadas en el GM, durante el verano (2015 y 2017) y fueron clasificadas como *Bothus* spp, de acuerdo a los caracteres morfológicos. Para la identificación molecular, se secuenció el gen del citocromo oxidasa I (COI) de 126 individuos y se comparó con la secuencia más similar en la base de datos de *GenBank* y del *Barcode of Life Data*. Para la construcción de árboles filogenéticos se utilizó el software MEGA. A través de la técnica de ddRADSEQ se genotiparon 1,034 polimorfismos de nucleótido simple de larvas de *B. robinsi* obtenidas en la bahía de Campeche, en el este y norte del GM, y de adultos de la plataforma continental de Florida. Se realizaron comparaciones de Fst-pareado, análisis de componentes principales (ACP), análisis discriminantes de componentes principales (ADPC), y un análisis en el software *Structure*. Además, se determinó el parentesco, entre larvas y adultos, con el software *COLONY*. Como resultado, se identificaron molecularmente 21 larvas de *B. ocellatus* y 105 de *B. robinsi*. La distribución geográfica de ambas especies fue similar, pero la abundancia de *B. robinsi* fue mayor que la de *B. ocellatus*, lo que contrastó con informes de estudios previos. Se observó una heterogeneidad no significativa (Fst pareados 0.028-0.06, p-values>0.05) entre regiones, se determinó homogeneidad genética (ACP, ADCP y *Structure*), y no se detectó la presencia de parientes en primer o segundo grado. Estos resultados apoyan la existencia de una población panmítica en el GM. Se concluyó que la dinámica oceánica influye de manera positiva a la dispersión larval de *B. robinsi*, propiciando la mezcla entre larvas de diferentes provincias y cohortes, provocando la existencia de una sola población genéticamente homogénea.

**Palabras clave:** Dispersión colectiva, conectividad, pez plano, dispersión larval, Pleuronectiformes.

Abstract of the thesis presented by **José Manuel Morales Pulido** as a partial requirement to obtain the Doctor of Science degree in life sciences [with orientation in environmental biology](#)

***Genetic connectivity between Gulf of Mexico provinces, of *B. robinsi* larvae and adults***

Abstract approved by:

---

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez  
Thesis Co-director

---

Dra. Sylvia Patricia Adelheid Jiménez Rosenberg  
Thesis Co-director

To understand the connectivity (exchange of individuals between populations) of marine organisms like fish, we need to consider their life history and the dispersal as larvae and as adults. Larvae in transit can provide a representation of the genetic information that can potentially influence the genetic diversity and structure of the population. The adults' genetic information summarizes multiple generations and cohorts of successful larval dispersal events. The flounder *Bothus robinsi* has a long pelagic larval duration that lasts for several months and that promotes connectivity between distinct provinces from the Gulf of Mexico (GoM). To study this topic is necessary to generate information about larval ecology and to differentiate the larvae taxonomically because is not possible to morphologically separate them from the larvae of *B. ocellatus*. The first goal of the study was to generate information about the larval distribution and abundance, based on molecular identifications. Additionally, genetic information from larvae and adults was generated to corroborate the existence of genetic connectivity among provinces, besides test the hypothesis of collective larval dispersion. Larvae were sampled in the GoM, during two summer seasons (2015 and 2017), and they were classified as *Bothus* spp, based on the morphological characteristics. The cytochrome oxidase I (COI) gene was sequenced in 126 larvae and compared with the most similar sequences in GenBank and the Barcode of Life Data databases to conduct a molecular identification. Phylogenetic trees were built with the software Mega. ddRADSEQ was used to genotype 1,034 single nucleotides polymorphic sites from *B. robinsi* larvae sampled in the waters from the Bay of Campeche, the eastern and northern GoM, and adults sampled on Floridas' continental shelf. The genetic analysis performed included paired-Fst comparisons, principal components analysis (PCA), discriminant analyses of principal components (DAPC), and Structure analysis. Also, a sibship evaluation was performed with the software COLONY. As a result, 21 larvae were identified as *B. ocellatus* and 105 as *B. robinsi*. Both species' geographic distribution was similar, but *B. robinsi* abundance was higher than *B. ocellatus* in contrast to previous studies. No significant heterogeneity among regions was observed (paired-Fst 0.028-0.06, p-values>0.05), furthermore, the PCA, DAPC, and Structure analysis indicated genetic homogeneity, while full-sibs or half-sibs between larvae and adults were not detected. The results indicated the existence of a panmictic population. It was concluded that the ocean dynamic of the GoM benefits the larval dispersion of *B. robinsi* causing the mix of larvae from different provinces and cohorts, resulting in one single population that is genetically homogeneous.

**Keywords:** Collective dispersal, connectivity, flatfish, larval dispersal, Pleuronectiforms.

## **Dedicatoria**

A todas las personas que me han acompañado en este camino de crecimiento, el cual ha sido largo, bueno, malo, interesante, aburrido, glorioso, humillante, peligroso y gratificante.

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT), por el otorgamiento de la beca de doctorado a través del Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC), la cual me permitió continuar con mis estudios e investigaciones. CVU 691884.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE), por el acceso a sus instalaciones, laboratorios y equipos, además de brindarme una formación de calidad.

Esta investigación ha sido parcialmente financiada por el Fondo Sectorial CONACYT-SENER-Hidrocarburos, proyecto 201441, y es una contribución del Consorcio de Investigación del golfo de México (CIGoM). El autor agradece la solicitud específica de Petróleos Mexicanos (PEMEX) al Fondo de Hidrocarburos para atender los efectos ambientales de los derrames de petróleo en el golfo de México.

Las muestras reportadas en este trabajo fueron recolectadas parcialmente bajo los auspicios del Programa de Acidificación de los Océanos (OAP) de la Administración Nacional Oceánica y Atmosférica (NOAA) durante el crucero GOMECC 3 (permiso de investigación para aguas mexicanas PPFE/DGOPA-137/17, EG0082017). También se agradece a la Dra. Leticia Barbero por la oportunidad de tomar muestras de ictioplancton durante GOMECC-3.

Se agradece por el apoyo recibido por parte del proyecto interno: Efectos de las variaciones ambientales sobre los moluscos: aproximación genómica y transcriptómica. No. Proyecto B0F110.

A mi comité de tesis: Dra. Clara Elizabeth Galindo-Sánchez, Dra. Sylvia Patricia Aldeheid Jiménez-Rosenberg, Dr. Adrián Munguía Vega, Dra. María Clara Arteaga Uribe, Dra. Paula Pérez Brunius y al Dr. Axayácatl Rocha Olivares. Se agradecen su apoyo, comentarios y consejos, los cuales hicieron posible la generación de esta tesis, además que ayudó en mi crecimiento como persona e investigador.

Al posgrado en Ciencias de la Vida, por el apoyo brindado para mi desarrollo como científico, además de agradecer el apoyo económico para un mes de manutención y el apoyo para que fuera posible mi participación en estancias y congresos.

Al laboratorio de Genómica Funcional del departamento de Biotecnología Marina del CICESE, por permitirme trabajar en sus instalaciones.

Al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR)-IPN por permitirme realizar estancias en sus instalaciones.

Al Applied Genomics Lab del Dr. Adrián Munguía Vega, Baja California Sur, por permitirme trabajar en sus instalaciones.

A la Dra. Sharon Zinah Herzka Llona y a su equipo del Departamento de Oceanografía Biológica del CICESE, por el muestreo de los organismos utilizados en esta tesis, además de su apoyo en la identificación y separación de los organismos.

A la M. C. Lourdes Vásquez Yeomans del Departamento de Sistemática y Ecología Acuática del Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), unidad Chetumal. Gracias por su apoyo en la obtención de contactos y seguimiento de la obtención de muestras. Además, de sus recomendaciones y gratas pláticas.

Al Dr. Victor Benjamin del *Ocean Science Foundation*, Irving CA, por la donación de muestras.

Se agradece al *FWC – Fish and Wildlife Research Institute* por hacer posible que los organismos de *Bothus robinsi* estuvieran disponibles para ser utilizados en este estudio. También se agradece a Erick Post, el *Ichthyology Collection manager*, por realizar la logística para hacer entrega de los tejidos de *B. robinsi* del *Florida Fish and Wildlife Conservation Commission (FSBC)*: FSBC 23959, FSBC 24392, FSBC 24578, FSBC 24592, FSBC 25746, FSBC 25785, FSBC 25920, FSBC 26633, FSBC 26656, FSBC 28035, FSBC 28237, FSBC 32399 and FSBC 34057.

Se agradece a la Dra. Edna Sánchez Castrejón, al M. C. Javier Flores y a la M. C. Anaid Saavedra Flores por su apoyo técnico en el laboratorio de Genómica Funcional del departamento de Biotecnología Marina del CICESE.

Se agradece al Dr. Oscar E. Juárez por el apoyo dado en la realización de los análisis genéticos y en la interpretación de los resultados.

A todo el equipo del laboratorio de Genómica Funcional y a todos los participantes de los labmeetings.

Se agradece al equipo de trabajo del Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez y a su equipo de trabajo del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR), por el apoyo otorgado para mi preparación previa al examen predoctoral. Además, por los consejos dados en mi estancia en la Paz.

Se agradece a la Dra. Nicole Reguera-Rouzaud y a la Dra. Tania Valdivia-Carrillo por su apoyo en la elaboración de las librerías genómicas, el análisis de los datos y en los ensayos de la presentación del predoctoral.

Se agradece al Dr. Miguel A. Martínez-Mercado por el apoyo en procesos bioinformáticos.

Se agradece al M. C. Ricardo de Jesús Ehecatl Gómez Reyes por su apoyo en la elaboración de script y el manejo del clúster, además de su apoyo en el aprendizaje del lenguaje Linux.

Se agradece a Xóchilt Rojas por realizar los mapas del capítulo 3 de estas tesis.

Se agradece a Fátima Edith Ordóñez Guillén por su apoyo en la toma de fotografías e identificación de las larvas.

A Santander, que, gracias a la existencia del proyecto de Becas Santander Estudios, fue posible que me pudieran apoyar con la beca de manutención 2022. Esto permitió que me pudiera enfocar en la realización de mis tesis en la etapa final de mi doctorado.

Al INSTITUTO SISCOM Preparatoria, a la directora Lic. Mayra Hernández Higuera y a la Lic. Itzel Ortega Lucido por considerarme para organizar un evento de divulgación científica para sus estudiantes.

Se agradece a todas mis amistades, por los momentos que recreación, ya que fueron totalmente necesarias para poder sobrevivir este proceso.

## Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria .....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	xi
Lista de tablas .....	xiv
Glosario.....	xv
<b>Capítulo 1. Introducción general .....</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo 2. Identificación y distribución de larvas de <i>Bothus ocellatus</i> y <i>B. robinsi</i> .....</b>	<b>6</b>
2.1 Introducción de <i>Bothus</i> .....	6
2.2 Antecedentes .....	9
2.2.1 Registro de larvas de <i>B. ocellatus</i> y <i>B. robinsi</i> dentro del GM .....	9
2.2.2 Aplicación de código de barras en especímenes de <i>B. ocellatus</i> y <i>B. robinsi</i> .....	11
2.3 Justificación .....	12
2.4 Hipótesis.....	13
2.5 Objetivos .....	13
2.5.1 Objetivo general.....	13
2.5.2 Objetivos específicos.....	13
2.6 Metodología .....	14
2.6.1 Colecta de larvas de <i>Bothus</i> spp.....	14
2.6.2 Identificación taxonómica de larvas de peces .....	16

2.6.3	Extracción de ADN de larvas de <i>Bothus</i> spp para la amplificación del gen mitocondrial citocromo c oxidasa I (COI).....	17
2.6.4	Amplificación del gen COI .....	17
2.6.5	Análisis de secuencias COI amplificadas a partir de las larvas de <i>Bothus</i> spp .....	18
2.7	Resultados .....	19
2.7.1	Identificación taxonómica de larvas de <i>Bothus</i> spp.....	19
2.7.2	Identificación molecular de larvas de <i>Bothus</i> spp.....	20
2.7.3	Distribución y abundancia de larvas de <i>B. ocellatus</i> y <i>B. robinsi</i> identificadas utilizando una aproximación molecular.....	22
2.7.4	Discusión .....	28
2.7.5	Conclusiones .....	30
<b>Capítulo 3.</b>	<b>Conectividad genética de larvas y adultos de <i>Bothus robinsi</i> dentro del golfo de México</b> .....	<b>32</b>
3.1	Introducción de conectividad.....	32
3.2	Antecedentes .....	38
3.2.1	Simulaciones de rutas de dispersión de organismos dentro del GM.....	38
3.2.2	Determinación de conectividad genética en el GM.....	41
3.2.3	Dispersión colectiva de larvas y <i>sweepstakes reproductive success</i> .....	43
3.3	Justificación .....	45
3.4	Hipótesis.....	46
3.5	Objetivos .....	46
3.5.1	Objetivo general.....	46
3.5.1.1	Objetivos específicos.....	47
3.6	Metodología .....	47
3.6.1	Muestras de larvas y tejidos de adultos de <i>B. robinsi</i> .....	47
3.7	Elaboración de librerías genómicas para el genotipado de SNP a través de la técnica de <i>Double digest restriction-site DNA</i> (ddRADseq) y secuenciación .....	47

3.8	Análisis bioinformático.....	48
3.8.1	Análisis <i>De novo</i> : Identificación de loci y genotipado <i>In silico</i> .....	48
3.8.2	SNP's outliers .....	49
3.9	Análisis genéticos poblacionales .....	50
3.9.1	Poder estadístico de la base de datos.....	50
3.9.2	Diversidad genética y estructura genética .....	50
3.9.3	Determinación de clústeres genéticos.....	50
3.9.4	Análisis multivariados.....	51
3.9.4.1	Análisis de Componentes Principales (ACP).....	51
3.9.4.2	Análisis Discriminante de Componentes Principales (ADCP) .....	51
3.9.5	Análisis bayesiano <i>Structure</i> .....	52
3.9.6	Determinación de parentesco.....	52
3.10	Resultados.....	53
3.10.1	Análisis genéticos .....	54
3.10.2	Diversidad genética .....	55
3.10.3	Determinación de parentesco.....	57
3.11	Discusión .....	57
3.12	Conclusión .....	60
<b>Capítulo 4.</b>	<b>Discusión general .....</b>	<b>62</b>
<b>Capítulo 5.</b>	<b>Conclusión general .....</b>	<b>64</b>
	<b>Literatura citada .....</b>	<b>66</b>
	<b>Anexos.....</b>	<b>75</b>

## Lista de figuras

Figura	Página
1. Estaciones de muestreo de la campaña oceanográfica XIXIMI-04 dentro del golfo de México (27 de agosto al 16 de septiembre de 2015). La línea gris representa la orilla de la plataforma continental (isobata 200m). .....	15
2. Estaciones de muestreo de la campaña oceanográfica GOMECC- 3 dentro del golfo de México (18 de julio al 21 de agosto de 2017). La línea gris representa la orilla de la plataforma continental (isobata 200 m). .....	15
3. Larvas de <i>Bothus</i> spp en diferentes estadios de desarrollo muestreadas dentro del Golfo de México. (a) Preflexión, longitud estándar (LE) = 2 mm, (b) Flexión, LE = 4.91 MM; (c) Postflexión, LE = 10.22 mm; (d) Preflexión, LE = 3.64 mm; (e) Flexión, LE = 5.84 mm; (f) Postflexión, LE= 8.55 mm. ....	20
4. Árbol filogenético obtenido a partir del análisis del citocromo oxidasa I (COI) y de la reconstrucción filogenética realizada con algoritmo de Máxima verosimilitud. El número a lado de las ramas indica el valor de <i>Bootstrap</i> (basado en 3 000 corridas). Barra de escala 0.050 de la distancia basada en Kimura 2 parámetros. Las secuencias de referencia procedentes del NCBI se marcaron con * y las secuencias de referencia del BOLD <i>Systems</i> se marcaron con **. (a) Adultos de <i>B. ocellatus</i> , foto obtenida de Carvalho Filho Alfredo, Universidad de São Paulo – Museu de Zoologia (MZUSP), Seção de Peixes; (b) Larva en preflexión de <i>B. ocellatus</i> ; (c) Adulto de <i>B. robinsi</i> , foto obtenida de Noble Brandi, <i>National Oceanic and Atmospheric Administration</i> (NOAA), <i>National Marine Fisheries Service</i> ; (d) Larva en preflexión de <i>B. robinsi</i> . .....	21
5. Mapa en donde se muestra la distribución y abundancia de larvas de <i>B. ocellatus</i> y <i>B. robinsi</i> identificadas molecularmente. (a) <i>B. ocellatus</i> ; (b) <i>B. robinsi</i> . Se esquematiza una línea gris que representa la plataforma continental (isobata 200 m). Las larvas se colectaron durante las campañas oceanográficas del XIXIMI-04 (27 de agosto al 16 de septiembre de 2015). .....	22
6. Mapa en donde se muestra la distribución y abundancia de larvas de <i>B. ocellatus</i> y <i>B. robinsi</i> identificadas molecularmente. (a) <i>B. ocellatus</i> ; (b) <i>B. robinsi</i> . Se esquematiza una línea gris que representa la plataforma continental (isobata 200m). Las larvas se colectaron durante la campaña oceanográfica del GOMECC-3 (18 de julio al 21 de agosto de 2017). .....	23
7. Mapa en donde se muestra la distribución y abundancia de larvas de <i>B. ocellatus</i> (identificadas molecularmente) en diferentes estadios. (a) Larvas en preflexión; (b) Larvas en flexión; (c) Larvas en postflexión. Se esquematiza una línea gris que representa la plataforma continental (isobata 200m). Las larvas se colectaron durante la campaña oceanográfica del XIXIMI-04 (27 de agosto al 16 de septiembre de 2015). .....	24
8. Mapa en donde se muestra la distribución y abundancia de larvas de <i>B. robinsi</i> (identificadas molecularmente) en diferentes estadios. (a) Larvas en preflexión; (b) Larvas en flexión; (c) Larvas en postflexión. Se esquematiza una línea gris que representa la plataforma continental (isobata 200m). Las larvas se colectaron durante la campaña oceanográfica del XIXIMI-04 (27 de agosto al 16 de septiembre de 2015). .....	25

9. Mapa en donde se muestra la distribución y abundancia de larvas de *B. ocellatus* (identificadas molecularmente) en diferentes estadios. (a) Larvas en preflexión; (b) Larvas en flexión; (c) Larvas en postflexión. Se esquematiza una línea gris que representa la plataforma continental (isobata 200m). Las larvas se colectaron durante la campaña oceanográfica del GOMECC-3 (18 de julio al 21 de agosto de 2017). ..... 26
10. Mapa en donde se muestra la distribución y abundancia de larvas de *B. robinsi* (identificadas molecularmente) en diferentes estadios. (a) Larvas en preflexión; (b) Larvas en flexión; (c) Larvas en postflexión. Se esquematiza una línea gris que representa la plataforma continental (isobata 200m). Las larvas se colectaron durante la campaña oceanográfica del GOMECC-3 (18 de julio al 21 de agosto de 2017). ..... 27
11. Esquema en que se muestran las provincias registradas dentro del golfo de México (GM). Louisiana-Texas (LaTex). Figura tomada y modificada de Miron et al., (2017)..... 36
12. Mapa del golfo de México que muestra la circulación superficial (0-200 m) durante las temporadas de primavera, verano, otoño e invierno. Esquema basado en Zavala-Hidalgo et al., 2003; Hamilton et al., (2018); Lara-Hernández et al., (2019); Turner y Rabalais (2019); Romero-Centeno et al., (2021)..... 37
13. Rutas de dispersión de las partículas pasivas (representando larvas de *Panulirus argus*) liberadas desde una subpoblación de origen (conformado por datos tomados entre 2006-2010). Las partículas virtuales se liberaron entre marzo 21 hasta junio 18 (2006-2010), estas partículas tenían la capacidad de asentarse desde la edad de 140 días. El 100% corresponde al número máximo de posiciones en un área de aproximadamente 11 km<sup>2</sup>. La línea negra corresponde a la isobata de 200 m. Esquemas tomados y modificados de Lara-Hernández et al. (2019). ..... 40
14. Ubicación de los siete arrecifes de coral en donde se colectaron los especímenes de *Stegastes partitus*. (CB) Banco Chinchorro; (Co) Cozumel; (PM) Puerto Morelos; (AA) Anegada de Adentro; (Bc) Blanca; (Bq) Blanquilla; (Sa) Santiaguillo. Mapa tomado de Villegas Sánchez et al. (2014). ..... 41
15. Ubicación de los puntos de muestreo de especímenes de *Pterois volitans*. Puntos de colecta del noroeste del Atlántico: CW: Noreste de Florida. Florida; CC: Cabo Cañaveral. Florida; BNP: Parque Nacional del Biscayne. Florida; FP: Fort Pierce. Florida; Isl: Islamorada. Florida. Punto de colecta del Golfo de México: Dry Tortugas. Florida; PR: *Pulley Ridge*. Florida; TB: Tampa. Florida; Ap: Apalachicola. Florida; AL: Plataforma de Alabama. Alabama; MS: Delta de Mississippi. Alabama; FG: *Flower Garden Banks*. Texas; GT: Galveston. Texas. Mapa tomado y modificado de Pérez-Portela et al. (2018). ..... 42
16. Mapa con la distribución de las larvas y adultos de *Bothus robinsi* utilizados en la elaboración de librerías genómicas. Estaciones con un solo número, son larvas que pertenecen al crucero del XIXIMI-04. Estaciones con una G en su número, son larvas que pertenecen al crucero del GOMECC-3. Estaciones con una A son localidades donde se realizó el muestreo de un adulto. Estaciones con color azul indica que utilizaron entre 1-2 larvas o adultos; color amarillo entre 5-6 larvas; color anaranjado indicar entre 5-6 larvas; color rojo entre 7-10 larvas..... 54
17. Gráfico de ACP y ADCP obtenido a partir de 1,034 SNPs neutrales. (a) Los puntos dentro del gráfico de ACP representan a los individuos de *Bothus robinsi* (66) provenientes de las tres regiones muestreadas en el Golfo de México; (b) Gráficos de ADCP representan a los individuos

de <i>Bothus robinsi</i> (66) provenientes de las tres regiones muestreadas en el golfo de México. .....	55
18. Valores de la media la Log de la verosimilitud para cada valor de K. Valor óptimo de clústeres detectados de acuerdo con la prueba estadística de $\Delta K$ (k=9). .....	56
19. Gráficas de asignación a clústeres genéticos de <i>Bothus robinsi</i> muestreados en el golfo de México y divididos en tres zonas (centro, norte y sur), utilizando la información de los SNP's genéticos filtrados. ....	56
20. Esquema del método de selección de tamaño de fragmentos de ADN de doble purificación con perlas magnéticas.....	83

## Lista de tablas

Tabla	Página
1. Caracteres merísticos para larvas de <i>Bothus lunatus</i> , <i>Bothus maculiferus</i> , <i>Bothus ocellatus</i> y <i>B. robinsi</i> reportados. ....	16
2. Larvas de <i>Bothus</i> spp clasificadas por estadios de desarrollo y por crucero oceanográfico. ..	19
3. Valores medios y desviación estándar de N=No. De organismos, Na=No. de alelos diferentes, Ne=No. Efectivo de alelos, Ho=Heterocigosidad observada, He=Heterocigosidad esperada y Fis=índice de fijación de cada una de las regiones determinadas para las muestras de larvas y adultos de <i>B. robinsi</i> (central, norte y sur).....	53
4. Volúmenes de cada uno de los reactivos utilizados en la reacción de doble digestión con un volumen final de 60 $\mu$ l. Donde el Buffer de digestión se trabajó en una concentración final de 1X.....	77
5. Volúmenes y concentraciones de los reactivos utilizados en la ligación de adaptadores en muestras previamente digeridas por las enzimas de restricción (EcoRI-HF y MspI). ....	78
6. Volúmenes y concentraciones de reactivos (20 $\mu$ l) para el PCR de enriquecimiento de los fragmentos y la anexión de los adaptadores individuales. ....	80
7. Parámetros utilizados para la obtención de genotipos con el software STACKS.....	84

## Glosario

**Alelos:** Es una de dos o más variantes genéticas de una secuencia de ADN, una base única o un segmento de bases, en una ubicación determinada del genoma. En el caso de SNPs sólo existen dos formas alternativas.

**Autoreclutamiento:** Se refiere al hecho de que una larva se asiente en su población de origen en vez de hacerlo en una población nueva.

**Cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC):** Método que se basa en la simulación de un tipo de proceso estocástico para estudiar las propiedades de una distribución de probabilidad que no puede ser estudiada fácilmente por métodos analíticos. Una Cadena de Markov genera una serie de variables aleatorias de manera que la distribución de probabilidad de estados futuros está completamente determinada por el estado actual de la cadena. Bajo ciertas condiciones, la cadena llegará a un estado estacionario de manera que si se ejecuta por un período suficiente la cadena visitará una distribución de probabilidad específica.

**Conectividad demográfica:** Se considera el grado en que el crecimiento de la población y la supervivencia se ven afectadas por la dispersión, la cual depende de la historia de vida de los organismos de la población. Está relacionada a los aspectos como las tasas de inmigración y emigración, y abundancias de cada población.

**Conectividad genética:** Es el grado en que la fuerza evolutiva del flujo genético afecta los procesos evolutivos dentro de las poblaciones. La conectividad genética se deriva de la medición de diferenciación genéticas entre poblaciones a través del análisis de las frecuencias alélicas poblacionales.

**Código de barras:** Técnica genética que se basa en el uso de secuencias cortas de ADN estandarizadas (marcadores moleculares), las cuales por medio de su análisis permiten la discriminación entre taxa, al detectar divergencias entre las secuencias de organismos cercanos y lejanos filogenéticamente.

**Desequilibrio de ligamiento:** Fenómeno que sucede cuando dos o más loci no se recombinan, debido a que se encuentran cercanos espacialmente dentro de un cromosoma, ocasionando bajas frecuencias de recombinación.

**Dispersión:** Proceso ecológico el cual consiste en el movimiento de individuos entre poblaciones, independientemente si los individuos se establecen de manera temporal o permanente en una nueva población.

**Distancia genética:** El grado de variación genética en una población, especie o entre un grupo de especies medido en heterocigosidad o diversidad alélica.

**Duración pelágica larval:** Tiempo en que una larva es capaz de estar en el ambiente pelágico, en donde realiza las metamorfosis necesarias previo a su asentamiento en un nuevo hábitat.

**Enzimas de restricción:** Proteínas aisladas a partir de bacterias, capaces de cortar secuencias de ADN en sitios específicos. Esto produce fragmentos de ADN con una secuencia conocida en cada extremo.

**Equilibrio de Hardy-Weinberg:** Es el equilibrio alcanzado en las frecuencias alélicas en una población panmíctica donde no hay perturbaciones por efecto de la mutación, migración, selección o deriva.

**Estrategia pasiva de dispersión:** Forma por la cual los organismos utilizan la energía de factores ambientales (corrientes marinas, viento, entre otros) para realizar el transporte de especímenes.

**Estructura genética (Diferenciación genética):** Se refiere a la organización de la variación genética en el espacio y tiempo, la cual está determinada por las características ambientales y del hábitat: la distribución de las poblaciones en relación con dicho hábitat y los procesos micro-evolutivos asociados a las fuerzas evolutivas.

**Flexión:** Estadio de desarrollo de las larvas de peces que se caracteriza por la flexión de la punta de la notocorda, aproximadamente  $45^\circ$  con respecto al eje de la notocorda y por la el desarrollo completo de los principales radios de la aleta caudal.

**Flujo genético:** Todos los mecanismos que resultan en el movimiento de genes de una población a otra. En este caso se considera como flujo génico el proceso de dispersión de larvas de una población de origen a una población de destino, en donde la larva se asentará, crecerá y reproducirá.

**Frecuencia alélica:** Representa la incidencia de una variante genética dentro de una población. Esta es calculada al realizar la división del número de veces en que un alelo de interés es observado en una población, entre el total del número de copias de todos los alelos que se encuentran en el locus de interés dentro de la población.

**Genética poblacional:** Es la rama de la genética que se basa en la descripción de las características heredadas observadas o inferidas en las poblaciones a través del espacio y tiempo.

**Heterocigoto:** Se refiere a un organismo que en un locus de interés puede presentar dos o más variantes de alelos. En el caso de los marcadores moleculares SNP's sólo se pueden presentar dos variantes.

**Heterocigosidad:** Proporción de organismos heterocigotos para un locus dividido entre el número total de individuos de la muestra.

**Heterocigosidad esperada:** Proporción de organismos heterocigotos calculada a partir del equilibrio de Hardy-Weinberg. Su cálculo implica la obtención de las frecuencias genotípicas a partir de las frecuencias alélicas siguiendo un binomio al cuadrado  $(p + q)^2$ , en donde p y q son las frecuencias alélicas y  $2pq$  corresponderá a la frecuencia de heterocigotos esperada.

**Heterocigosidad observada:** Proporción de organismos heterocigotos calculada a partir de los genotipos observados en una muestra poblacional.

**Homocigoto:** Individuos con dos copias del mismo alelo en un mismo locus.

**Ictioplancton:** Son los huevos y larvas de peces, las cuales durante su desarrollo forman parte de las asociaciones del plancton. Usualmente se encuentran en las zonas pelágicas, siendo acarreados por el océano e interactúan con predadores pelágicos y presas planctónicas.

**Indicador biológico:** Se puede considerar a una especie o grupo de especies que pueden brindar información sobre características ecológicas y procesos ecológicos con fiabilidad, al registrar su presencia o ausencia y al asociarlos a variables bióticas y abióticas.

**Locus (Plural: loci):** Segmento de ADN en un cromosoma. Este segmento puede codificar un producto, tener una función regulatoria o ser una región de ADN definida por un método molecular.

**Marcadores moleculares:** Son secuencias identificables de ADN que se encuentran en determinados lugares del genoma y que están relacionadas con la herencia de una característica o de un gen vinculado a esta.

**Máxima verosimilitud:** Método estadístico empleado para ajustar un modelo estadístico a los datos en donde se busca maximizar su probabilidad en base a ciertos parámetros.

**Número de alelos efectivos (NE):** Número de alelos que en igual frecuencia que resultarían en la misma homocigosidad que el número de alelos observados. Se obtiene del cálculo:  $n_e = 1 / \sum p_i^2$ , donde  $p_i$  es la frecuencia del  $i$ -ésimo alelo.

**Plancton:** Se considera plancton a cualquier organismo que es transportado por la marea y corrientes, además de que este no tiene la capacidad natatoria suficiente para contrarrestar las fuerzas de la dinámica del agua.

**Preflexión:** Estadio de desarrollo, la cual inicia cuando la larva absorbe completamente el saco vitelino y termina cuando la flexión de la notocorda inicia.

**Polimorfismos:** Es una variación en la secuencia de un lugar determinado del ADN en los cromosomas (locus), hace referencia a la existencia en una población de múltiples alelos de un gen.

**Pool genético:** Es la combinación de todos los genes (incluyendo alelos) presentes en una población reproductiva. Una población con un *pool* genético diverso se considera adecuado para afrontar retos ambientales.

**Provincias dinámicas:** Son cada una de las regiones propuestas por Miron et al., (2017) que dividen la zona superficial del golfo de México. Cada una de estas regiones presentan un grado de aislamiento dinámico entre sí, determinado a partir de una representación oceánica superficial de la dinámica lagrangiana.

**Postflexión:** Estadio de desarrollo de una larva cuando la flexión de la punta de la notocorda y la formación de los principales radios de la aleta caudal ya se han dado. Este estadio concluye con la metamorfosis.

**Reacción en cadena de la polimerada (PCR):** Método utilizado para realizar copias de segmentos específicos de ADN. El ADN es desnaturalizado por temperaturas elevadas, se añaden las regiones flanqueantes (*primers*) y la secuencia es copiada por medio de una enzima polimerasa termoestable (Taq).

**Retención larval:** Es cuando una larva se mantiene al interior de una provincia durante todo su estadio.

**Tamaño efectivo poblacional ( $N_e$ ):** Es el número de individuos reproductivos que pueden aportar sus genes en el *pool* genética de la siguiente generación.

**Transporte larval:** Es el movimiento horizontal de larvas debido a las corrientes oceánicas.

## Capítulo 1. Introducción general

---

La conectividad es el proceso que consiste en el intercambio de individuos entre poblaciones o un conjunto de poblaciones de una misma especie, en una escala espacial definida por fronteras tangibles e intangibles, como las que frecuentemente fraccionan al ambiente pelágico (Cowen, 2006; Truelove et al., 2017). La forma en que se lleva a cabo la conectividad dependerá de la biología de las especies y de las características del ambiente donde habitan (Cowen, 2006; Truelove et al., 2017).

En ambientes marinos es común observar organismos, como los peces, que presentan larvas pelágicas capaces de aprovechar los agentes ambientales para dispersarse hacia nuevas poblaciones (Cowen, 2006; Truelove et al., 2017). En el ciclo de vida de los peces, la fase de dispersión larvaria pelágica es resultado de las estrategias reproductivas y de la interacción con el ambiente físico. Por lo tanto, la conectividad larval se ve influenciada positiva o negativamente por factores biológicos o físicos tales como: la época y sitio de desove, la duración larval pelágica (DLP), dirección y velocidad de los vientos y corrientes marinas, disponibilidad de hábitats de asentamiento, entre otras (Casado-Amezúa, 2013; Kool et al., 2013; Miron et al., 2017).

La presencia de una etapa larval resulta ser importante para estudios de conectividad, ya que es posible modelar la dispersión larvaria mediante el diseño de modelos de dispersión de larvas virtuales, basados en la relación entre las características biológicas de las especies y la dinámica oceánica (Baguette y Van Dyck, 2007; Casado-Amezúa, 2013; Kool et al., 2013). De esta forma, se recrean las rutas de dispersión larval (posibles caminos que una larva podría seguir de acuerdo con la dinámica oceánica) que ayudan a determinar la conectividad demográfica (el grado en que el crecimiento de la población y la supervivencia se ven afectadas por la dispersión) (Calò et al., 2013; Chovanec et al., 2003; Compaire et al., 2021; Hammer y Largier, 2012; Munguia-Vega et al., 2018; Pérez-Portela et al., 2018).

El golfo de México (GM) es un mar semicerrado, con una superficie de 1.6 millones de km<sup>2</sup>. Presenta corrientes heterogéneas que fragmentan el ambiente pelágico en provincias, las cuales se caracterizan por un cierto grado de aislamiento. Estas provincias se determinaron mediante un análisis lagrangiano, basados en métodos de sistemas dinámicos, utilizando la trayectoria de boyas de deriva en la superficie del océano (Miron et al., 2017). En ese trabajo se observó una tendencia de acumulación de boyas dentro del centro de ciertas provincias geográficas del golfo, mientras que pocas boyas se dispersaron a través de los límites de dichas provincias. Estos efectos de retención son el resultado de la circulación y la presencia

de giros ciclónicos y anticiclónicos, sugiriendo que los organismos planctónicos tienden a permanecer dentro de las provincias (Miron et al., 2017).

Los resultados de Miron et al., (2017) sugieren que las provincias identificadas pueden retener partículas dentro de su perímetro por períodos que pueden durar hasta un mes, lo cual indica un limitante en la dispersión de larvas de peces (en especial en peces con una DLP de aproximadamente de 30 días), ya que reduce las probabilidades de éxito de asentamiento en nuevas provincias (Miron et al., 2017). Sin embargo, en modelos de dispersión larval se ha observado que para organismos como la langosta (*Panulirus argus*, Latreille, 1804), con una DLP superior a los 4 meses, la retención existente en cada provincia no es una limitante para que haya conectividad demográfica entre todas las provincias del GM (Lara-Hernández et al., 2019).

Dentro del GM, existen peces costeros que por su biología presentan características que aumentan la probabilidad de presentar conectividad entre provincias. Entre estos peces se encuentran los lenguados del género *Bothus* como son *Bothus ocellatus* (Agassiz, 1831) y *Bothus robinsi* (Topp y Hoff, 1972). Se ha reportado que sus larvas pueden presentar una DLP entre los 5 y 12 meses, debido a su capacidad de retardar su desarrollo larval (lo cual puede ser ocasionado por factores como la temperatura del agua, falta de alimento, la falta de un sitio de asentamiento, etc.) (Evseenko, 2008b; Morato et al., 2007). También se ha observado que el estadio juvenil de *Bothus*, previo a su asentamiento, puede habitar en el ambiente pelágico por un corto período, lo cual es posible debido a su capacidad de alimentarse de las reservas de grasa de su hígado (Evseenko, 2008b; Macpherson y Raventos, 2006; Morato et al., 2007). El período de asentamiento en estos organismos no es claro, pero se ha sugerido que las larvas de *Bothus podas* (Delaroche, 1809) son capaces de asentarse a partir de los tres meses posteriores a su desove, por lo que en este trabajo se tomará en cuenta esa información (Morato et al., 2007).

Aunque la información existente en los modelos de dispersión de las larvas virtuales indica que las especies con las características biológicas de *B. ocellatus* y *B. robinsi* podrían dispersarse entre todas las provincias (Lara-Hernández et al., 2019; Sanvicente-Añorve et al., 2014), existe una limitación al momento de realizar interpretaciones sobre su conectividad. Esto se debe a que los registros sobre la distribución larval y frecuencia de ocurrencia estacional carecen de robustez, limitando la información ecológica del organismo (Morales-Pulido, 2017).

La falta de robustez en los registros de estas especies, se debe a que se han basado únicamente en identificaciones morfológicas entre individuos que no presentan claras características diagnósticas (Flores-

Coto et al., 1991, 2009; Houde et al., 1979; Sanvicente-Añorve et al., 1998, 2000). Se ha reportado que *B. ocellatus* y *B. robinsi* presentan una similitud morfológica que no permite su identificación a nivel de especie, lo cual reduce la precisión de sus registros (Evseenko y Nadtoka, 2003; Morales-Pulido, 2017). Esto ha quedado en evidencia en el hecho de que en el sur de GM, en temporada de verano, se había reportado que las larvas de *B. ocellatus* eran las dominantes (Flores-Coto et al., 1991, 2009; Sanvicente-Añorve et al., 1998, 2000), pero en un estudio posterior de identificación molecular se registró una mayor distribución y abundancia larval de *B. robinsi* que de *B. ocellatus* (Morales-Pulido, 2017; Morales-Pulido et al., 2022).

Debido a la larga DLP de *B. robinsi*, este ha sido considerado como un posible marcador de conectividad (Evseenko, 2008b; Houde et al., 1979), por lo que es importante realizar un estudio sobre su conectividad dentro del GM. Sin embargo, dicho estudio implica una serie de retos entre los que se encuentran su correcta identificación y su correcto registro de distribución geográfica y abundancia larval (Evseenko y Nadtoka, 2003; Morales-Pulido, 2017). Además, de que se debe realizar un estudio de conectividad que complemente lo generado por los modelos de dispersión.

Como complemento a los estudios ecológicos, las aproximaciones genéticas se han convertido en un enfoque ampliamente utilizado, debido a los grandes avances en investigación genética y el desarrollo de nuevas tecnologías que permiten la realización de estudios de diferente índole (Calò et al., 2013). La utilización de las herramientas genéticas ha resultado en la reducción de imprecisiones taxonómicas y el aumento de la precisión de los registros ecológicos sobre la distribución, estacionalidad y frecuencia de ocurrencia de una población (Calò et al., 2013; Garcia-Vazquez et al., 2009; Morales-Pulido, 2017).

Las herramientas moleculares también brindan una mayor resolución en el tema de conectividad al dar información sobre la diversidad genética, estructuración genética, flujo génico, parentesco, entre otros. En estos estudios es común trabajar con especímenes adultos, que normalmente representan múltiples cohortes y generaciones de dispersión de larvas y adultos, los cuales ya han sido sometidos a los efectos de supervivencia durante las etapas de asentamiento y crecimiento (Gagnaire, 2020; Hedgecock et al., 2007). Por lo tanto, con este enfoque es posible obtener información sobre la conectividad realizada en varias generaciones de organismos (Gagnaire, 2020; Hedgecock et al., 2007).

La conectividad genética se puede estudiar utilizando especímenes en estadios larvales que se encuentran en tránsito, aunque son estudios relativamente raros (Ottmann et al., 2016; Riquet et al., 2017; Shima y Swearer, 2016). Sin embargo, la importancia de estos estudios radica en generar información sobre una

etapa importante y compleja en la historia de vida de los peces marinos, ya que se obtiene finalmente información genética con el potencial de influir en la población (Ottmann et al., 2016; Riquet et al., 2017; Shima y Swearer, 2016).

La versatilidad de las herramientas moleculares radica en la variedad de marcadores moleculares disponibles, los cuales permiten que se aborden diferentes tipos de preguntas. Particularmente durante la etapa larvaria, se ha utilizado la técnica de código de barras de ADN para realizar identificaciones precisas (Díaz-Viloria et al., 2013; Hajibabaei et al., 2007; Hebert et al., 2003; Lv et al., 2014; Morales-Pulido, 2017; Wu et al., 2015). Para este tipo de enfoque se ha observado que la utilización de ADN mitocondrial (mtDNA) es el más adecuado, ya que se trata de un marcador de ADN no recombinante y de herencia materna, es decir que no se combina con una molécula homóloga y que sólo se transmite por medio de la madre, por lo tanto, la mutación es la única posibilidad de diversificación genética. Estas características lo hacen un candidato ideal para describir relaciones evolutivas entre especies, ayudando en la identificación de las mismas, aunque sean filogenéticamente cercanas (Calò et al., 2013; Hebert et al., 2003). Sin embargo, por estas mismas particularidades son menos sensibles para estimar diversidad en poblaciones contemporáneas, como revelar el impacto a corto plazo de eventos episódicos (Calò et al., 2013).

Los marcadores moleculares de ADN nuclear a diferencia de mtDNA presentan propiedades recombinantes (se combina con su homólogo), de herencia biparental (es de herencia maternal y paternal) y un menor grado de conservación (Hedgecock et al., 2007; Villegas Sánchez et al., 2014). Por lo cual su análisis hace posible la observación del efecto de eventos derivados de la migración reciente, supervivencia y el asentamiento de larvas en nuevas poblaciones. Por ende, la medición de estos efectos hace posible evaluar la conectividad integrada a lo largo de generaciones (Broquet y Petit, 2009; Hedgecock et al., 2007; Kool et al., 2013; Parker et al., 1998; Villegas Sánchez et al., 2014).

En el GM ambos marcadores moleculares han sido utilizados con éxito. En el caso del ADN mitocondrial ha sido utilizado para la identificación de especímenes adultos y larvas de *B. ocellatus* y *B. robinsi* (Morales-Pulido, 2017; Valdez-Moreno et al., 2010), permitiendo la identificación larval y la generación de secuencias para las bases de datos. Por el otro lado, el uso de marcadores nucleares ha permitido la detección de conectividad genética de poblaciones de la damisela bicolor (*Stegastes partitus*, Poey, 1968), entre zonas del Mar Caribe y del GM (Villegas-Sánchez et al., 2014), además de detección de conectividad entre poblaciones, del pez león (*Pterois volitans*, Linnaeus, 1758), del Pacífico y del GM (Pérez-Portela et al., 2018).

Este estudio se enfoca en determinar la conectividad genética en el GM de *B. robinsi*, con el objetivo de determinar si sus características biológicas, como su amplia capacidad de retardar el desarrollo de sus estadios larvales, distribución geográfica, DLP, entre otras, son suficientes para generar una conectividad genética entre provincias. Para ello se utilizaron diferentes técnicas y marcadores moleculares para afrontar todos los retos que esto involucra. Además, se utilizó como objeto de estudio organismos en estadio larval y en estadio adulto, para generar más información sobre los procesos que podrían estar involucrados en la dispersión larval. El documento se dividió en dos capítulos: en el primero, el enfoque fue información robusta sobre la distribución de larvas de *B. robinsi* dentro del GM, y el segundo se enfocó en la conectividad genética de esta especie.

## Capítulo 2. Identificación y distribución de larvas de *Bothus ocellatus* y *B. robinsi*

---

### 2.1 Introducción de *Bothus*

El género *Bothus* está compuesto por 15 especies de lenguados, peces con una longitud estándar máxima entre 30-40 cm. Generalmente, habitan en la plataforma continental e insular entre profundidades que van desde 0-100 m, en áreas con fondos suaves distribuidas en aguas cálidas de todos los océanos y el Mar Mediterráneo (Blanqueto-Manzanero y Vega-Cendejas, 2018; Evseenko, 2008b; Froese y Pauly, 2022; McEachran, 2009; Munroe, 2003).

En el golfo de México (GM), se registran cuatro especies del género *Bothus*: *B. lunatus* (Linnaeus, 1758), *B. maculiferus* (Poey 1860), *B. ocellatus* (Agassiz, 1831) y *B. robinsi* (Topp y Hoff, 1972) (Froese y Pauly, 2022). Solamente *Bothus ocellatus* (Chueco playón) y *B. robinsi* (Chueco de dos Manchas) se distribuyen en toda la plataforma continental, desde Florida hasta Quintana Roo (Froese y Pauly, 2022; McEachran, 2009).

*Bothus ocellatus* y *B. robinsi*, no son consideradas especies de importancia económica dado su pequeño tamaño. Están catalogadas como especies de acompañamiento de pesquerías importantes como la del camarón; ya que normalmente tienden a enredarse en las redes de los barcos. A menor escala, *B. robinsi* es utilizado para alimento de subsistencia por parte de pescadores artesanales, pero no se encontraron datos de la cantidad de su consumo (Bester, 2017; Snow, 2022; Wakida-Kusunoki et al., 2013).

En el ámbito ecológico, estos lenguados contribuyen con el flujo de nutrientes por su rol de depredador y presa, en donde sus estadios adultos y juveniles son parte del alimento de diversos organismos como anguilas, cangrejos, rayas, tiburones, gaviotas, etc. Además de que sus huevos y larvas contribuyen al alimento de ictioplancton, ctenóforos, camarones, entre otros (Bester, 2017; Snow, 2022).

En lo que respecta a su interacción con el medio, se ha observado que los lenguados, en su etapa adulta, se caracterizan por manifestar una capacidad natatoria limitada, estar enterrados en la arena y presentar una estrategia de depredador de emboscada (Bester, 2017; Snow, 2022). Los lenguados además presentan

una estrategia pasiva de dispersión, la cual depende de la presencia de un huevo y una larva pelágica (Bester, 2017; Evseenko y Nadtoka, 2003; Evseenko, 1976, 2008b; Snow, 2022).

La dispersión de estas especies consiste en la liberación de larvas en la plataforma continental, las cuales son transportadas hacia aguas oceánicas en donde realizarán el proceso de metamorfosis. La estancia en aguas oceánicas brinda beneficios a las larvas, ya que aumenta el potencial de dispersión y a que la probabilidad de supervivencia es mayor en comparación que en las aguas costeras, debido a que existe un menor riesgo de depredación (Evseenko, 2008a; Ghiglione y Laudet, 2020). Después de terminar su desarrollo ontogénico, las larvas transformadas son capaces de asentarse en la plataforma continental. La capacidad de estas especies de realizar varios desoves durante el año aumenta la posibilidad de las larvas de ser influenciadas por corrientes oceánicas con diferente intensidad y dirección, ocasionando el aumento de rutas de transporte y la conectividad con más poblaciones (Duffy-Anderson et al., 2014; Evseenko, 2008b; Garbini et al., 2014).

Lo anterior se ve complementado con el amplio potencial de dispersión larval de *B. ocellatus* y *B. robinsi* derivado de su DLP que, en casos extremos, pueden presentar duración de aproximadamente 5-12 meses. Esto es posible por su capacidad de alimentación activa y a su habilidad para extraer nutrientes acumulados en el hígado hasta el momento de realizar su asentamiento (Evseenko, 1978), permitiéndoles así recorrer largas distancias y aumentar sus probabilidad de asentamiento, disminuyendo la posibilidad de ser retenidos por corrientes o giros, o el riesgo de mortalidad por escasez de alimento (Evseenko, 2008b).

Previamente, la información sobre la distribución y frecuencia de ocurrencia de las larvas de *B. ocellatus* y *B. robinsi* dentro del GM estaba sesgada, ya que existía una percepción de la existencia de una división de hábitat en donde a las larvas de *B. ocellatus* se les consideraba predominantes en las zonas neríticas y oceánicas de la bahía de Campeche y costas de Yucatán, mientras que las larvas de *B. robinsi* se distribuían al norte del GM (Ayala-Pérez et al., 2015; Flores-Coto et al., 1991, 2009; Houde et al., 1979).

Esta percepción se creó, debido a que estas dos especies presentan características morfológicas, morfométricas y merísticas similares en todos sus estadios de desarrollo, siendo la posición de dos melanóforos ubicados en la aleta caudal, el único carácter diagnóstico externo presente en el estadio adulto de estas especies. Sin embargo, la presencia de pigmentos en la aleta caudal no es de utilidad en la identificación de sus estadios larvales, lo cual contribuye a la inexactitud de la discriminación específica (Emery, 2015; Evseenko y Nadtoka, 2003; Evseenko, 2008b; Morales-Pulido, 2017).

Aunque las larvas de la familia Bothidae son traslúcidas y presentan melanóforos amarillos, rojos o negros, en especímenes preservados se puede presentar una escasa o inexistente pigmentación por lo que su identificación depende principalmente de su merística, dificultando su identificación en especies como *B. ocellatus* y *B. robinsi* (Lara, 2006). De acuerdo con Evseenko (2008) y Evseenko y Nadtoke (2003) la incertidumbre de la identificación entre las larvas de *B. ocellatus* y *B. robinsi*, pudo haber ocasionado que existieran una mezcla de especímenes de ambas especies para la elaboración de la descripción morfológica de *B. ocellatus*. Esto afecta a la precisión de la información ecológica, ocasionando que los registros indiquen la presencia o ausencia de alguna de estas dos especies en determinadas temporadas del año (Ayala-Pérez et al., 2015; Flores-Coto et al., 1991, 2009; Houde et al., 1979).

Tomando en cuenta las características biológicas del género *Bothus* (DLP y la capacidad de hacer varios desoves durante el año) y la información recabada sobre la distribución de los estadios adultos de *B. ocellatus* y *B. robinsi* dentro del GM, se esperaría que las larvas de ambas especies compartieran ocurrencia espacial y temporal durante todo el año (Ayala-Pérez et al., 2015; Evseenko, 2008b; Flores-Coto et al., 1991, 2009; Houde et al., 1979). Esta idea se fortaleció con la evidencia encontrada en el trabajo de Morales-Pulido, (2017), que a través del uso de las aproximaciones morfológicas y genéticas de identificación determinó que el análisis de caracteres merísticos (caracteres contables como la cantidad de aletas, radios espinas etc.) no presentan la resolución suficiente para discriminar entre larvas de estas especies (Evseenko y Nadtoke, 2003; Evseenko, 2008b; Fahay, 2007; Lara, 2006; Morales-Pulido, 2017). Además, larvas de ambas especies fueron colectadas en la zona sur (bahía de Campeche), y se observó que larvas de *B. robinsi* presentaron una mayor frecuencia de ocurrencia que de *B. ocellatus*. Finalmente, se enfatizó en la importancia de la utilización de aproximaciones genéticas para la identificación a nivel especie y futuros trabajos de índole ecológica que involucren larvas de *B. ocellatus* y *B. robinsi*.

Una de las aproximaciones genéticas utilizadas para la identificación de especies es el código de barras combinado con el uso de marcadores moleculares de mtDNA. El análisis del marcador citocromo C oxidasa subunidad I (COI) ha arrojado resultados precisos en la identificación, debido a que se trata de una sección de ADN que presenta una tasa de mutación que permite la acumulación de diferencias moleculares. Esto ha aumentado la resolución de la identificación taxonómica en animales, independientemente de que las especies estuvieran estrechamente relacionadas filogenéticamente (Bucklin et al., 2011; Hebert et al., 2004).

El COI se ha utilizado con resultados precisos de identificación a nivel específico (Batta-Lona et al., 2019; Bingpeng et al., 2018; Díaz-Viloria et al., 2013, 2015; Morales-Pulido, 2017) y han ayudado en el

replanteamiento de estrategias de uso de recursos pesqueros, evitando un mal manejo de estos por la identificación errónea de especies (García-Vázquez et al., 2009). En el caso específico de *B. ocellatus* y *B. robinsi*, la técnica de código de barras ya se ha utilizado en organismos adultos, juveniles y larvas con resultados precisos (parte de las larvas de este capítulo fueron identificadas en el trabajo previo de Morales-Pulido, (2017)) y esto ha dado pauta a la alimentación de las bases de datos genéticos como son el GenBank del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) y el *Barcode of Life Data System* (BOLD o BOLD Systems).

En el presente capítulo se establecerán las bases de la distribución de larvas de *B. robinsi* en zonas de la plataforma continental y aguas profundas dentro del GM, a través de la utilización de código de barras sobre larvas identificadas morfológicamente como *Bothus* spp recolectadas en la temporada de verano.

## 2.2 Antecedentes

### 2.2.1 Registro de larvas de *B. ocellatus* y *B. robinsi* dentro del GM

Uno de los registros más completos sobre la abundancia y distribución de *B. robinsi* se documentó entre los años de 1971-1974. Houde et al., (1979) recopilaron la información de 17 cruceros y 869 estaciones en las zonas de aguas profundas frente a las costas de Florida en aguas de GM. *Bothus robinsi* se registró como la especie con mayor abundancia para la familia Bothidae. La mayor abundancia larval para *B. robinsi* se observó durante verano y otoño. Los autores asociaron la ocurrencia de larvas con un tamaño menor a 4 mm a eventos de desoves. Se determinó que el desove de larvas de *B. robinsi* se da durante todo el año. En invierno sólo se registraron larvas de menor tamaño al sur de la latitud 26° N, indicando que los eventos de desoves se restringieron en la zona sureste de Florida durante los meses más fríos. En primavera y verano, se observó una distribución de larvas de menor tamaño en toda la plataforma del Florida, indicando la presencia de desoves. Ellos hicieron énfasis de que en la temporada de primavera y verano encontraron una distribución amplia de larvas con tamaños mayores (a los considerados como larvas recién desovadas), por lo que atribuyeron a que esas larvas pudieron ser desovadas en temporadas pasadas (otoño e invierno), con lo que sugirieron la posibilidad de que *B. robinsi* presenta una DLP amplia. Las larvas se distribuyeron en estaciones costeras y oceánicas. Del total de larvas de *B. robinsi*, el 49% de la ocurrencia fueron en estaciones en zonas con profundidades menores de 50 m, y el 51% en estaciones en zonas con más de 100 de profundidad. Las larvas muestreadas en este estudio mostraron una

ocurrencia del 56% entre 31-70 m de profundidad y un 26% a profundidades mayores de 71 m. Estas larvas se encontraron en temperaturas superficiales entre 17-32°C, obteniendo una mayor ocurrencia en temperatura mayores a los 23°C. Houde et al., (1979) mencionaron que en el este del GM hay diversas especies de larvas de peces que pueden considerarse especies clave, debido a su ocurrencia en varios meses del año y amplia distribución. Por lo que la frecuencia de ocurrencia de estas especies, en muestreos futuros, puede funcionar para determinar si han ocurrido cambios de abundancia y diversidad en esta zona del golfo. Esto podría inferir la existencia de cambios en el éxito de desove, áreas de desove o supervivencia larval. Finalmente mencionan que en la familia Bothidae existen larvas con los atributos necesarios para ser utilizadas como especies de referencia, como es el caso de *B. robinsi*.

En el sur del GM se han realizado estudios enfocados en la determinación de la distribución espacio temporal de las larvas. Sanvicente-Añorve et al., (2000) recopiló la información de trabajos previos realizados en laboratorio del laboratorio de zooplancton del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (UNAM). Los registros abarcaban las zonas de aguas neríticas y oceánicas de la bahía de Campeche, donde se utilizaron muestras de tres estaciones; primavera de 1983 (45 estaciones de muestreo), verano de 1987 (67) e invierno de 1984 (29). Las muestras del verano e invierno se obtuvieron de zonas neríticas y oceánicas, mientras que para primavera sólo fueron de la zona nerítica. Del género *Bothus* sólo se registró larvas de *B. ocellatus* identificadas morfológicamente, las cuales mostraron ocurrencias en las tres estaciones (primavera, verano e invierno). Esta especie se asoció con los peces de zonas neríticas, donde en invierno presentó un mayor porcentaje de frecuencia de ocurrencia por estación (60%) y una mayor abundancia media en verano e invierno.

En el 2009 se realizó una compilación de información de más de 120 campañas realizadas en lagunas costeras y áreas marinas del sur del GM durante los años de 1976-2003 (Flores et al. Coto 2009). El área de estudio comprendió la bahía de Campeche, la laguna de Términos y la laguna de Alvarado. Se colectaron 5,318 muestras a través del uso de redes Bongo con una técnica de arrastre doble oblicuo de superficie al fondo y hasta 200 m en las localidades más profundas, también se utilizaron redes de apertura-cierre en donde se hicieron muestreos por estratos lo que permitió definir la posición de las especies en la columna de agua. El muestreo se realizó en las cuatro estaciones del año, donde en total se identificaron 306 especies, distribuidas en 283 géneros y 120 familias. Dentro de estos géneros se encontraba el género *Bothus*, del cual sólo tuvieron registros de larvas de la especie de *B. ocellatus* y de *Bothus* spp identificadas morfológicamente. La información recabada para *B. ocellatus* fue que tuvo ocurrencia en las cuatro estaciones del año, que fueron muestreadas en la zona superficial de la columna de agua (3-100 m de profundidad), además de pertenecer a las comunidades: costera, costera nerítica interna y costera nerítica

externa. En las comunidades neríticas interna y externa se registró a las larvas de *B. ocellatus* dentro de las especies más frecuentes y abundantes.

### 2.2.2 Aplicación de código de barras en especímenes de *B. ocellatus* y *B. robinsi*

El BOLD *Systems* es uno de los repositorios en el cual se tienen guardadas secuencias COI de *B. ocellatus* y *B. robinsi*. Dentro de este repositorio se tienen registrados 85 organismos (entre estadios larvales y adultos) de *B. ocellatus* con secuencias COI, colectados en las costas de Florida, de la península de Yucatán, de Cuba y Brasil. Para *B. robinsi* sólo se tiene el registro de 6 organismos con secuencias COI, los cuales fueron muestreados en las costas de Florida, la Península de Yucatán y el océano Atlántico (Bold *Systems* v4).

Valdez-Moreno et al. (2010) muestrearon huevos y larvas de peces en las zonas costeras de Quintana Roo y fuera de la costa de entre Quintana Roo y Belice, además de coleccionar especímenes juveniles y adultos de peces de diferentes ambientes costeros de la Península de Yucatán. El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad de la técnica de código de barras y el marcador molecular COI para identificar especies marinas y conectar los diferentes estadios de desarrollo (huevo, larvas, juveniles y adultos). En total 610 adultos y Juveniles, 757 larvas y 25 huevos fueron secuenciados correspondiendo a 181 especies. El 1.8% de los organismos juveniles y adultos no pudieron ser identificados utilizando las técnicas morfológicas y/o moleculares, debido a que desconocían los caracteres diagnósticos de los especímenes, aunado a la inexistencia de secuencias COI de referencia. Un total de 137 especímenes de huevos y larvas no lograron ser identificados por la inexistencia de secuencias COI de referencia en las bases de datos. Este estudio reforzó la información sobre la capacidad de la identificación molecular en huevos y larvas de peces, además de resaltar que la limitación de la técnica del código de barras radica en la falta de secuencias de referencia en las bases de datos genéticas.

Morales-Pulido (2017) realizó un estudio enfocado en el uso de aproximaciones morfológicas y moleculares para la identificación de larvas de especies de *Bothus* del GM. El objetivo fue determinar la existencia de caracteres diagnósticos y si la técnica molecular del código de barras era necesaria para discriminar entre larvas de las especies *B. ocellatus* y *B. robinsi*. Las muestras se obtuvieron de aguas profundas del GM. En total, 17 larvas en diferentes estadios de desarrollo se identificaron morfológicamente como *B. ocellatus*. Posteriormente con el análisis de las secuencias COI de las larvas, solamente se corroboró a una como *B. ocellatus*, mientras que las restantes se identificaron como *B.*

*robinsi*. Por lo que se concluyó que para identificar entre larvas de *B. ocellatus* y *B. robinsi* es necesario utilizar la técnica molecular de código de barras, además se corroboró lo indicado por Evseenko (2008) y Evseenko y Nadtoka (2003), lo cual era que estas especies en sus estadios larvales carecen de caracteres diagnósticos externos.

### 2.3 Justificación

En trabajos ecológicos, la utilización de las aproximaciones morfológicas y moleculares de identificación brindan información complementaria, la cual puede usarse para generar información ecológica de los organismos. La aproximación morfológica permite la identificación de los organismos, además de la obtención de información sobre estadios de desarrollo, determinación de caracteres diagnósticos, longitudes de las larvas, etc. Sin embargo, en ocasiones la inexistencia de caracteres diagnósticos o la degradación de las larvas dificultan la identificación de especies, reduciendo la obtención de información ecológica de los organismos.

En los casos en que la identificación morfológica es insuficiente, el uso de la aproximación molecular de identificación es necesaria. La identificación molecular se puede realizar incluso a partir de pequeñas cantidades de tejido, lo cual hace posible la identificación de un organismo incompleto. Además, de que en los casos en que se trabaje con un organismo completo, existe la posibilidad de mantener la mayor cantidad del espécimen intacto. Esto permite que la información obtenida, a partir de los análisis morfológicos, pueda ser corroborada o complementada.

La información generada a partir de la aproximación morfológica ha permitido entender sobre la ecología de las larvas de diversas especies. Sin embargo, existen larvas, como es el caso de *B. ocellatus* y *B. robinsi* que presentan similitudes merísticas y dificultan su identificación, lo que reduce la precisión de su información (frecuencia de ocurrencia, abundancia, distribución, etc.). Por lo tanto, es necesario realizar un estudio que utilice ambas aproximaciones para obtener información ecológica que permita entender la historia de vida de las larvas de *B. ocellatus* y *B. robinsi* de una manera precisa.

Es importante obtener información robusta sobre las larvas de *B. ocellatus* y *B. robinsi*, debido a que tienen un rol ecológico importante dentro del GM, por que presentan una amplia distribución, gran abundancia y son alimento de varios grupos de organismos (ictioplancton, crustáceos, peces, entre otros). Sin embargo, la falta de precisión en la identificación morfológica puede generar la incorrecta evaluación de

su hábitat de desove, transporte, conectividad poblacional y reclutamiento. Por lo tanto, en este capítulo se busca discriminar entre larvas de estas dos especies para mejorar la información biológica y ecológica específica, lo cual es un prerrequisito para generar información robusta para estadios tempranos de vida.

## 2.4 Hipótesis

Las similitudes morfológicas y merísticas inherentes a las especies del género *Bothus* y la falta de caracteres diagnósticos reconocidos para las larvas de *B. ocellatus* y *B. robinsi*, provocan falta de claridad en la diagnosis de sus larvas y, por consecuencia, una mala evaluación de su ecología poblacional y aspectos de conectividad. La utilización de técnicas moleculares permitirá una precisa identificación y una base para correctas interpretaciones ecológicas de ambas especies.

## 2.5 Objetivos

### 2.5.1 Objetivo general

Registrar la distribución geográfica y abundancia de larvas de *B. ocellatus* y *B. robinsi* dentro del GM para generar información base que pueda ser utilizada para elaborar interpretaciones sobre conectividad, a través de la aplicación de técnicas morfológicas y moleculares de identificación en larvas de estas dos especies, las cuales presentan imprecisiones en su diagnosis.

### 2.5.2 Objetivos específicos

Aplicar técnicas de taxonomía morfológica en larvas que presenten características de *B. ocellatus* y *B. robinsi*, con el fin de proponer caracteres diagnósticos de identificación, en sus distintos estadios de desarrollo.

Aplicar técnicas moleculares de identificación, posteriores a la aproximación morfológica, para realizar la identificación precisa entre larvas de *B. ocellatus* y *B. robinsi*, para así corroborar o refutar los caracteres diagnósticos propuestos.

Corroborar la distribución de larvas en diferentes estadios larvarios de *B. ocellatus* y *B. robinsi* en la zona sureste y noreste del GM, durante la temporada de verano, a través de registro de ocurrencia basado en las larvas identificadas molecularmente.

## 2.6 Metodología

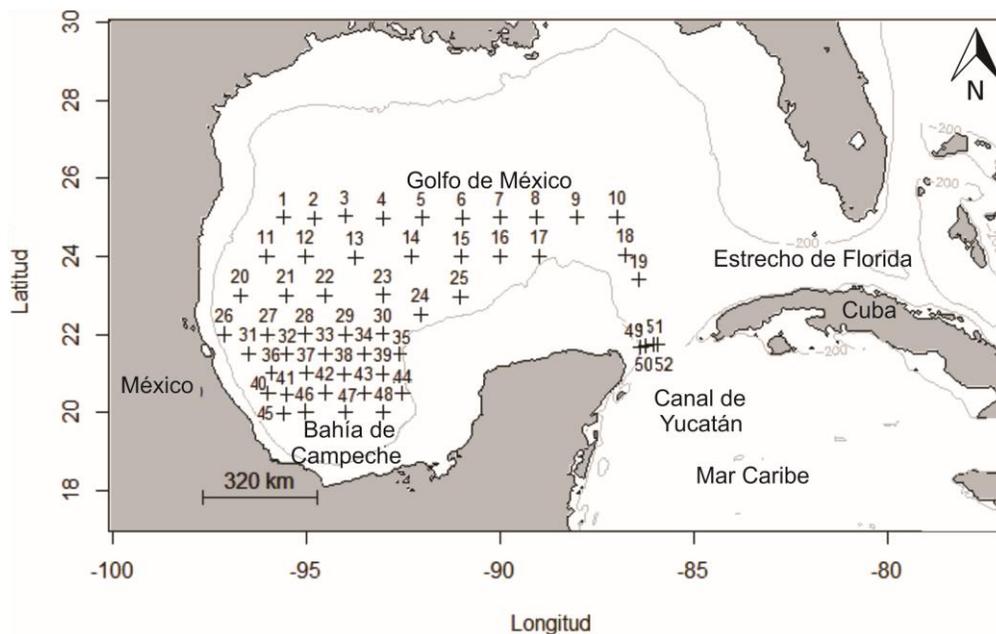
### 2.6.1 Colecta de larvas de *Bothus* spp

Las larvas utilizadas en este estudio provienen de muestras de zooplancton colectadas en las campañas oceanográficas realizadas en la temporada de verano en el GM. Los cruceros se realizaron del 27 de agosto al 16 de septiembre de 2015 (Campaña oceanográfica XIXIMI-04, patrocinada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México – Secretaría Mexicana de Energía – Hidrocarburos Fondo del Proyecto 201441) y del 18 de julio al 21 de agosto de 2017 (Campaña oceanográfica GOMECC-3, auspiciada el *National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA)*, en el *Ocean Acidification Program*).

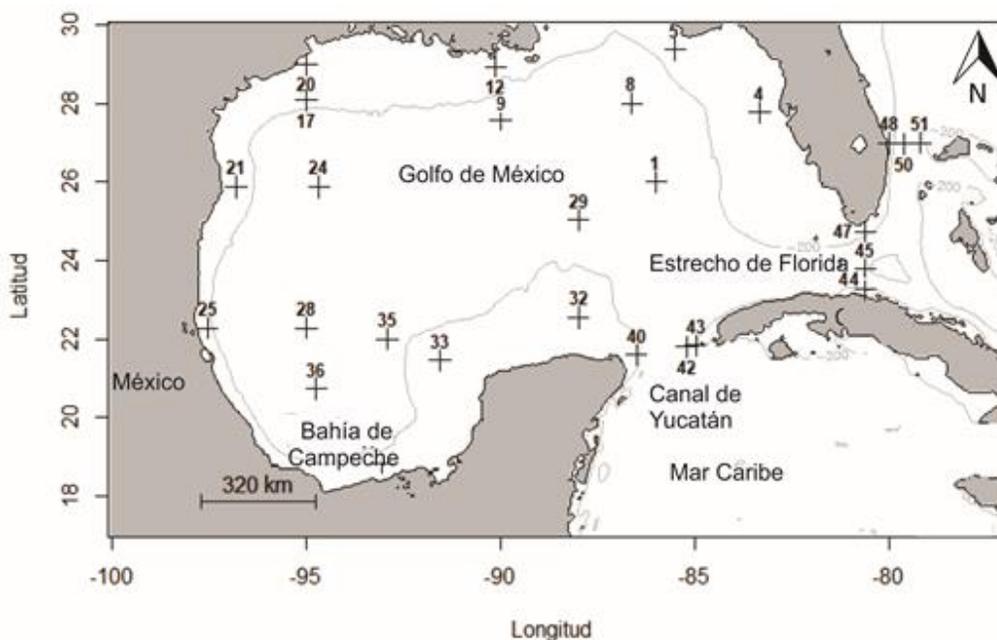
La campaña oceanográfica XIXIMI-04 se realizó a bordo del Buque Oceanográfico Justo Sierra de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). La colecta de zooplancton se realizó en 57 estaciones (Figura 1), utilizando una estructura doble tipo bongo, con dos redes de luz de malla de 333  $\mu\text{m}$ , con boca de apertura de 60 cm y copos de colecta. Se realizaron arrastres oblicuos desde la superficie hasta una profundidad máxima de 200 m, siguiendo la metodología de Smith y Richardson (1977). Las muestras obtenidas en una de las redes fueron concentradas en frascos de medio litro y fijadas con etanol al 96% con recambio a las 48 horas.

La campaña oceanográfica GOMECC-3 se realizó a bordo del Buque Oceanográfico R/V *Ronald H. Brown*. El muestreo consistió en estaciones costeras y de aguas oceánicas (Figura 2). La colecta de zooplancton se realizó utilizando una estructura doble de tipo bongo, con dos redes de luz de malla de 335  $\mu\text{m}$ , cada una con una boca de apertura de 60 cm y copos de colecta. Se realizaron arrastres oblicuos desde la superficie

hasta una profundidad máxima de 200 m (o hasta 15 m por encima del fondo en zonas someras). El arrastre se realizó a una velocidad aproximada de 1.5 nudos.



**Figura 1.** Estaciones de muestreo de la campaña oceanográfica XIXIMI-04 dentro del golfo de México (27 de agosto al 16 de septiembre de 2015). La línea gris representa la orilla de la plataforma continental (isobata 200m).



**Figura 2.** Estaciones de muestreo de la campaña oceanográfica GOMECC-3 dentro del golfo de México (18 de julio al 21 de agosto de 2017). La línea gris representa la orilla de la plataforma continental (isobata 200 m).

Una vez en el laboratorio se estimó la biomasa zooplanctónica de las muestras mediante el método de volumen húmedo desplazado, excluyendo a los organismos considerados no planctónicos, como peces juveniles y adultos, calamares y pulpos grandes, cangrejos pelágicos adultos, así como medusas y tunicados de tallas mayores, cuyo volumen individual excedió los 5 ml. Posteriormente se procedió a la separación de las larvas de peces de cada muestra.

## 2.6.2 Identificación taxonómica de larvas de peces

Se utilizaron guías con descripciones morfológicas (Fahay, 1983, 2007; Lara, 2006) para realizar la identificación de un total de 126 larvas de *Bothus*, las cuales se encontraban distribuidas entre las estaciones muestreadas en las campañas oceanográficas del XIXIMI-04 y GOMECC-3. Todas las larvas que presentaron caracteres merísticos de *B. ocellatus* y/o *B. robinsi* se asignaron como *Bothus* spp (Tabla 1) y fueron separadas para su posterior identificación molecular.

**Tabla 1.** Caracteres merísticos para larvas de *Bothus lunatus*, *Bothus maculiferus*, *Bothus ocellatus* y *B. robinsi* reportados.

Especies	Radios dorsales	Radios anales	Miómeros pre-caudales	Miómeros post-caudales	Radios caudales	Referencias
<i>B. ocellatus</i>	76-91	58-68	10	26(25-22)	17	Evseenko (2008); Evseenko y Nadtoke (2003); Fahay (1983); Lara (2006); Randall (1968)
<i>B. robinsi</i>	78-90	58-68	10	27(26-28)	17	Evseenko (2008); Evseenko y Nadtoke (2003); Lara (2006)
<i>B. maculiferus</i>	90-98	70-76	10	29-30	17	Lara (2006)
<i>B. lunatus</i>	91-99	71-76	10	30	17	Lara (2006)

Simultáneamente a la identificación morfológica, se registró el número de individuos por estación de muestreo y estadio de desarrollo. Para asignar los estadios de desarrollo, se utilizó el método propuesto por Ahlstrom et al., (1976), tomando en cuenta la base de la flexión de la notocorda en el caso de las larvas, dividiendo al desarrollo en tres estadios: preflexión, que inicia desde que la larva ha consumido su reserva

del saco vitelino, hasta el inicio de la flexión de la notocorda; flexión, que culmina con la flexión total de la notocorda, cuando la placa hipúrica y los elementos primarios de la aleta anal se han desarrollado; y postflexión, que culmina cuando la larva ha desarrollado todos los elementos de las aletas. Posteriormente, las larvas entran en el estadio de transformación, este se caracteriza por la migración del ojo derecho, el cual se desplaza hacia el plano izquierdo del cuerpo a través del orificio de la cabeza entre el cuarto y octavo pterigióforo. También en este estadio la aleta pectoral del lado derecho se reduce o desaparece (Evseenko, 2008a; Lara, 2006).

### 2.6.3 Extracción de ADN de larvas de *Bothus* spp para la amplificación del gen mitocondrial citocromo c oxidasa I (COI)

Se extrajo el ojo del plano lateral derecho de las larvas (en caso necesario se extrajo el ojo del plano lateral izquierdo o se homogeneizó la cabeza entera). Esto se hizo con el objetivo de mantener el plano lateral izquierdo para posteriormente tomar fotografías del espécimen, debido a que por convención los peces se fotografían del plano izquierdo (BioBlitz, 2014). Además, se trató de mantener la mayor cantidad del espécimen intacto para posteriores observaciones morfológicas.

El ADN se obtuvo a partir de la homogeneización del ojo o tejido, a partir del uso del kit de extracción de ADN DNeasy Blood & Tissue Kits Qiagen (Qiagen Hilden, DE). Se siguieron los pasos redactados en el manual de usuario del kit. El ADN obtenido se resuspendió en 20 µL de buffer AL.

La integridad del ADN extraído se determinó mediante el uso de un gel de Agarosa-Synergel al 1%, el cual fue revelado a través del uso de un fototransiluminador de luz UV. Se tomaron fotos con un fotodocumentador marca BIO-RAD ChemiDoc™ MP Imaging System, modelo Universal Hood III. La cantidad y calidad de ADN se midió con un equipo NanoDrop ND1000 (Nanotechnologies), el cual utiliza espectrometría de luz, para esto se agregó 1 µL de ADN se obtuvieron los datos a utilizar la longitud de onda de absorción para el ADN (260 nm), para proteínas (280 nm) y fenoles (230 nm).

### 2.6.4 Amplificación del gen COI

El gen COI fue el marcador molecular seleccionado para la identificación molecular de las larvas, debido a su resolución y efectividad en larvas de peces (Batta-Lona et al., 2019; Bingpeng et al., 2018; Valdez-

Moreno et al., 2010). A partir del ADN extraído de los ojos de las larvas, se amplificó el gen COI utilizando reacciones de PCR. Para obtener secuencias del gen COI de aproximadamente 595 pb, en las reacciones se utilizaron los *primers* descritos por Ward et al., (2005): FishF1: 5'TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC3', FishF2: 5'TCG ACT AAT CAT AAA GAT ATC GGC AC3', FishR1: 5'TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA30'.

Las reacciones de PCR se realizaron con una mezcla total de 20 µL compuesta de 11.275 µL de agua ultrapura, 4 µL de buffer de PCR (5X), 2.8 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 Mm), 0.4 µL de dNTP's (10 µM), 0.2 µL de cada *primer* (10 µM), 0.2 µL de *Taq* polimerasa (5 U), 2 µL de ADN de concentraciones entre 12 ng a 41 ng. El programa del termociclador consistió en un paso inicial de 2 min a 95°C seguido por 35 ciclos de 0.5 min a 94°C, 0.5 min a 54°C, y 1 min a 72°C, seguido por 10 minutos a 72°C y un paso de espera a 4°C.

Para evaluar la integridad y tamaño de los amplicones de COI obtenidos a partir de las reacciones de PCR, se sembraron 5 µL en un gel de Agarosa-Synergel al 2%. Si los amplicones presentaban un tamaño aproximado entre 550-600 pb, eran seleccionados para ser enviados y secuenciados con la técnica Sanger a los laboratorios SEQXCEL INC., en San Diego California y Eton *Bioscience Inc.*

#### 2.6.5 Análisis de secuencias COI amplificadas a partir de las larvas de *Bothus spp*

Se evaluó la calidad de las secuencias forward obtenidas del marcador molecular COI utilizando el software Geneious 4.8.4. Con esto se detectaron las secciones de los extremos de las secuencias con baja calidad, para posteriormente cortarlas.

Después del corte las secuencias limpias se alinearon utilizando el algoritmo Clustal W, para compararlas con las secuencias de referencias encontradas en la *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) el GenBank (Benson et al., 2012). Para el alineamiento se utilizó la herramienta del *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul et al., 1990). Utilizando los valores resultantes de la alineación (e-value, porcentaje de cobertura y similitud) se realizó la asignación taxonómica. Los valores con los que se basaron para realizar una asignación taxonómica fueron un e-value igual a 0 y valores de similitud entre 98-100%.

Posterior a la identificación molecular, las 126 secuencias COI se agruparon por especies. Utilizando el software MEGA X.10.8 (Kumar et al., 2018) y el modelo de sustitución de Kimura 2 parámetros se calculó

la distancia genética por pares de las secuencias obtenidas y secuencias de referencia de *B. lunatus*, *B. maculiferus*, *B. ocellatus* y *B. robinsi*. El modelo de sustitución nucleotídica apropiado para representar las secuencias se determinó utilizando el MEGA X.10.8 y la función *Find Best DNA/Protein Model*. Para escoger el modelo de sustitución se tomó en cuenta el valor calculado del Criterio Bayesiano de Información (BIC), el cual indica qué modelo se adapta mejor a las secuencias ingresadas. Además, se calculó el Criterio de Información de Akaike (AIC), el cual indica qué modelo es el que menor información pierde.

También se realizó un árbol filogenético para dar mayor robustez a las identificaciones moleculares. Se incluyeron secuencias obtenidas de ADN de *B. ocellatus* y *B. robinsi* (Anexo A), además de secuencias de referencia de estas especies (Anexo A) y de *Syacium papillosum* (las cuales se utilizaron como grupo externo. Anexo A). El árbol se realizó utilizando el MEGA X.10.8, su topología se generó utilizando el modelo de sustitución de Kimura 2 parámetros. El soporte de las ramas se evaluó con una confianza de 3000 réplicas de *Bootstrap*; los valores del *Bootstrap* se indicaron en las ramas. Para enraizar los árboles filogenéticos se utilizaron secuencias de una especie de una familia diferente al estudiado, pero lo más cercana filogenéticamente posible. Las secuencias de referencia fueron de un representante de la familia Paralichthyidae, *Syacium papillosum* (Linnaeus, 1758) (obtenidas del GenBank, con los números de acceso JX887479 y KY402433). Finalmente, todas las secuencias utilizadas en todos los análisis se introdujeron a la base de datos de GenBank. Las secuencias se nombraron de acuerdo con los resultados del BLAST.

## 2.7 Resultados

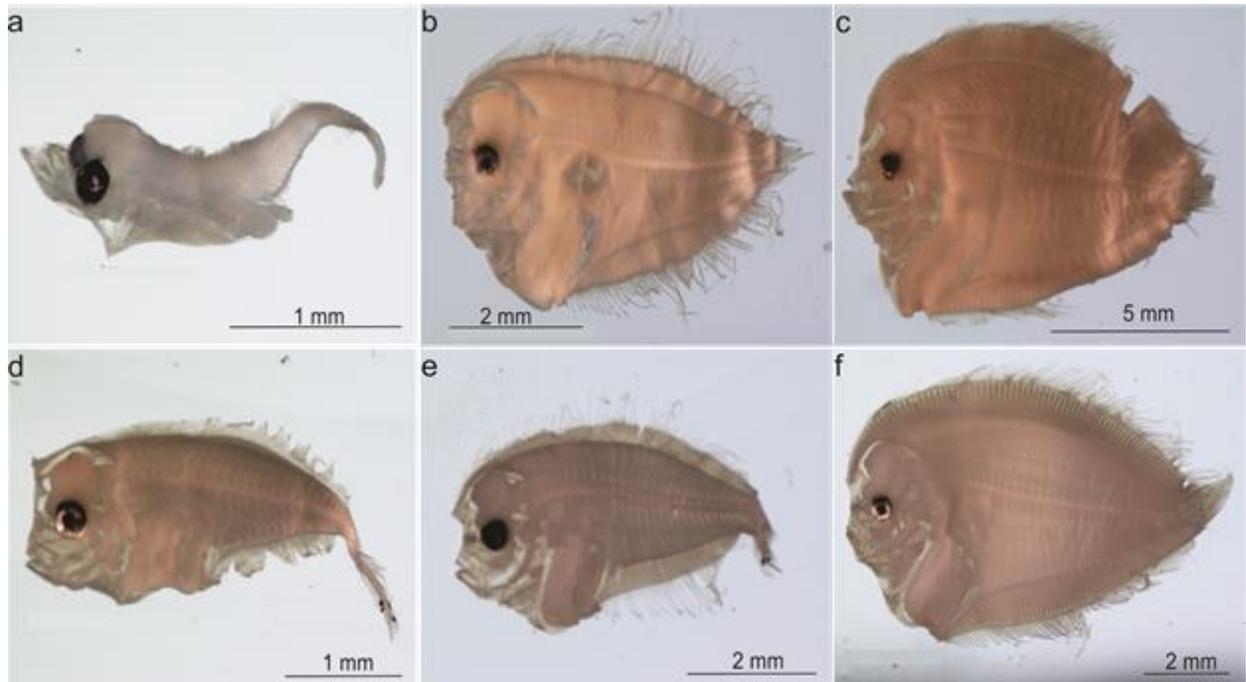
### 2.7.1 Identificación taxonómica de larvas de *Bothus* spp

Las larvas se clasificaron entre sus estadios de desarrollo: preflexión (55), flexión (36) y postflexión (35) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Larvas de *Bothus* spp clasificadas por estadios de desarrollo y por crucero oceanográfico.

	XIXIMI-04	GOMECC-3	Total
Preflexión	44	11	55
Flexión	33	3	36
Postflexión	31	4	35
Total	108	18	126

Todos los estadios de desarrollo mostraron superposición dentro de los rangos de los caracteres merísticos registrados para *B. ocellatus* y *B. robinsi*. Debido a esto y a la inexistencia de caracteres diagnósticos morfológicos y de pigmentación entre las larvas de ambas especies, llevó a la conclusión de clasificar a los organismos sólo hasta el nivel de género (*Bothus* spp). En la Figura 3 se detalla esta problemática. Se observa que la característica de pigmentación en la punta de la notocorda, que se ha detallado previamente para larvas de *B. ocellatus*, es ambigua ya que no es consistente entre las larvas de un mismo estadio.

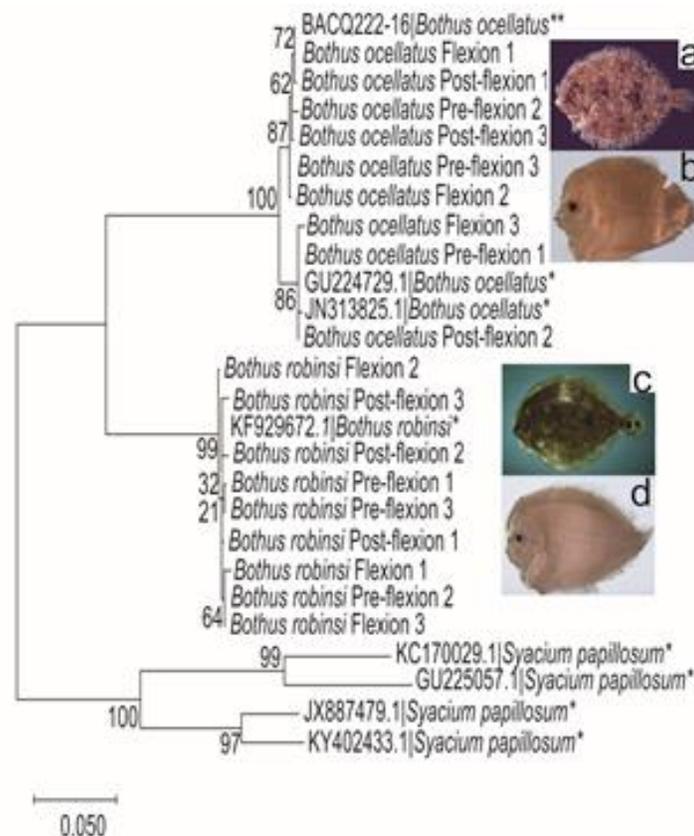


**Figura 3.** Larvas de *Bothus* spp en diferentes estadios de desarrollo muestreadas dentro del Golfo de México. (a) Preflexión, longitud estándar (LE) = 2 mm; (b) Flexión, LE = 4.91 MM; (c) Postflexión, LE = 10.22 mm; (d) Preflexión, LE = 3.64 mm; (e) Flexión, LE = 5.84 mm; (f) Postflexión, LE= 8.55 mm.

### 2.7.2 Identificación molecular de larvas de *Bothus* spp

Se obtuvieron un total de 126 secuencias (564 pb) a partir de las 126 larvas de *Bothus* spp morfológicamente identificadas. Las secuencias COI permitieron la distinción entre las dos especies de *Bothus*: *B. ocellatus* (21) y *B. robinsi* (105). El análisis BLAST que comparó las secuencias COI obtenidas con las secuencias de referencias del GenBank, mostró porcentajes de identidad entre el 98-99% (e-value = 0); mientras que el porcentaje de identidad obtenido a partir del análisis BLAST que comparó las secuencias COI obtenidas con las secuencias de referencia del BOLD Systems mostraron valores entre el 99-100%. El porcentaje de identidad esperado en peces (para una correcta identificación) es entre el 98-100%, algo que se observó con los alineamientos realizados con ambas bases de datos.

La reconstrucción filogenética se realizó con dos grupos, uno de 26 secuencias y otro de 134 secuencias (*B. ocellatus*, *B. robinsi* y *S. papillosum*) de aproximadamente 593 bp incluyendo gaps (Figura 4). Se construyó un árbol filogenético con 26 secuencias, el cual está incluido en esta tesis y funge como un ejemplo del árbol construido con 134 secuencias (Figura 4), debido a que este último árbol filogenético presenta un gran tamaño que no permite que sea visualizado en el formato de esta tesis (el árbol se puede visualizar en el material suplementario del artículo de Morales-Pulido et al., (2023). El árbol filogenético de 26 secuencias indicó la existencia de tres clados: el primero corresponde a *B. ocellatus* (valor de *Bootstrap* 100%), el segundo fue de *B. robinsi* (valor de *Bootstrap* 99%) y el tercero fue *S. papillosum* (valor de *Bootstrap* 100%). En el árbol de 134 secuencias, también se formaron tres clados: el primero corresponde a *B. ocellatus* (valor de *Bootstrap* 100%), el segundo fue de *B. robinsi* (valor de *Bootstrap*, 77%) y el tercer grupo fue *S. papillosum* (valor de *Bootstrap*, 100%).

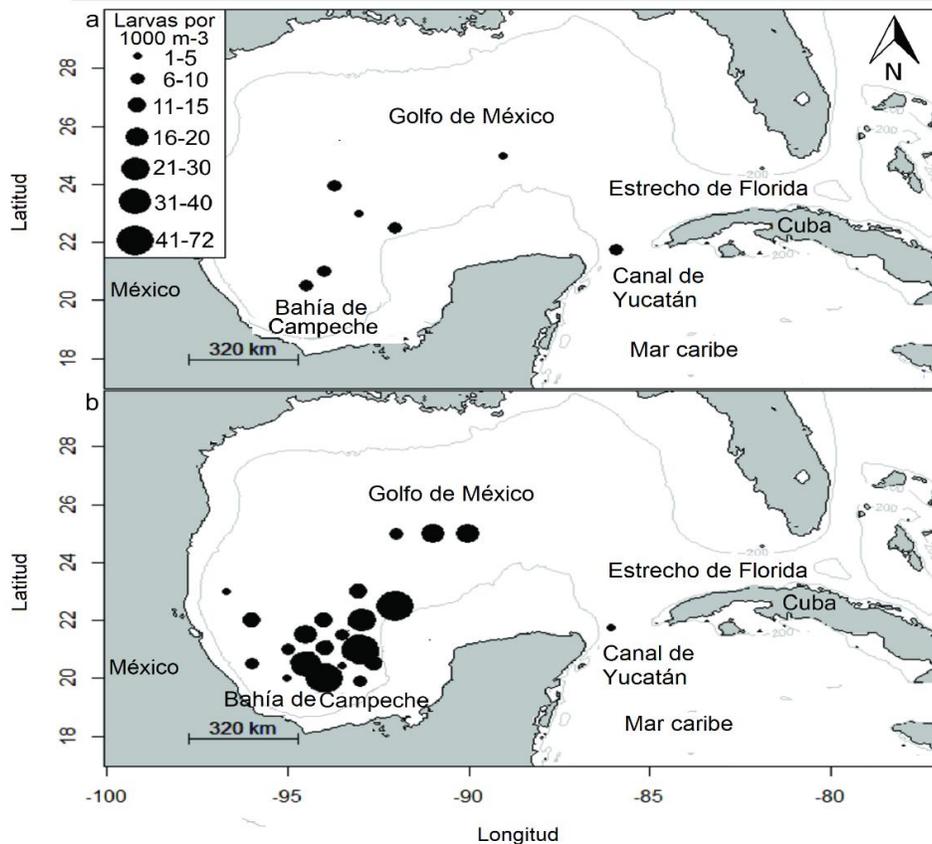


**Figura 4.** Árbol filogenético obtenido a partir del análisis del citocromo oxidasa I (COI) y de la reconstrucción filogenética realizada con algoritmo de Máxima verosimilitud. El número a lado de las ramas indica el valor de *Bootstrap* (basado en 3 000 corridas). Barra de escala 0.050 de la distancia basada en Kimura 2 parámetros. Las secuencias de referencia procedentes del NCBI se marcaron con \* y las secuencias de referencia del BOLD Systems se marcaron con \*\*. (a) Adultos de *B. ocellatus*, foto obtenida de Carvalho Filho Alfredo, Universidad de São Paulo – Museu de Zoologia (MZUSP), Seção de Peixes; (b) Larva en preflexión de *B. ocellatus*; (c) Adulto de *B. robinsi*, foto obtenida de Noble Brandi, National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA), National Marine Fisheries Service; (d) Larva en preflexión de *B. robinsi*.

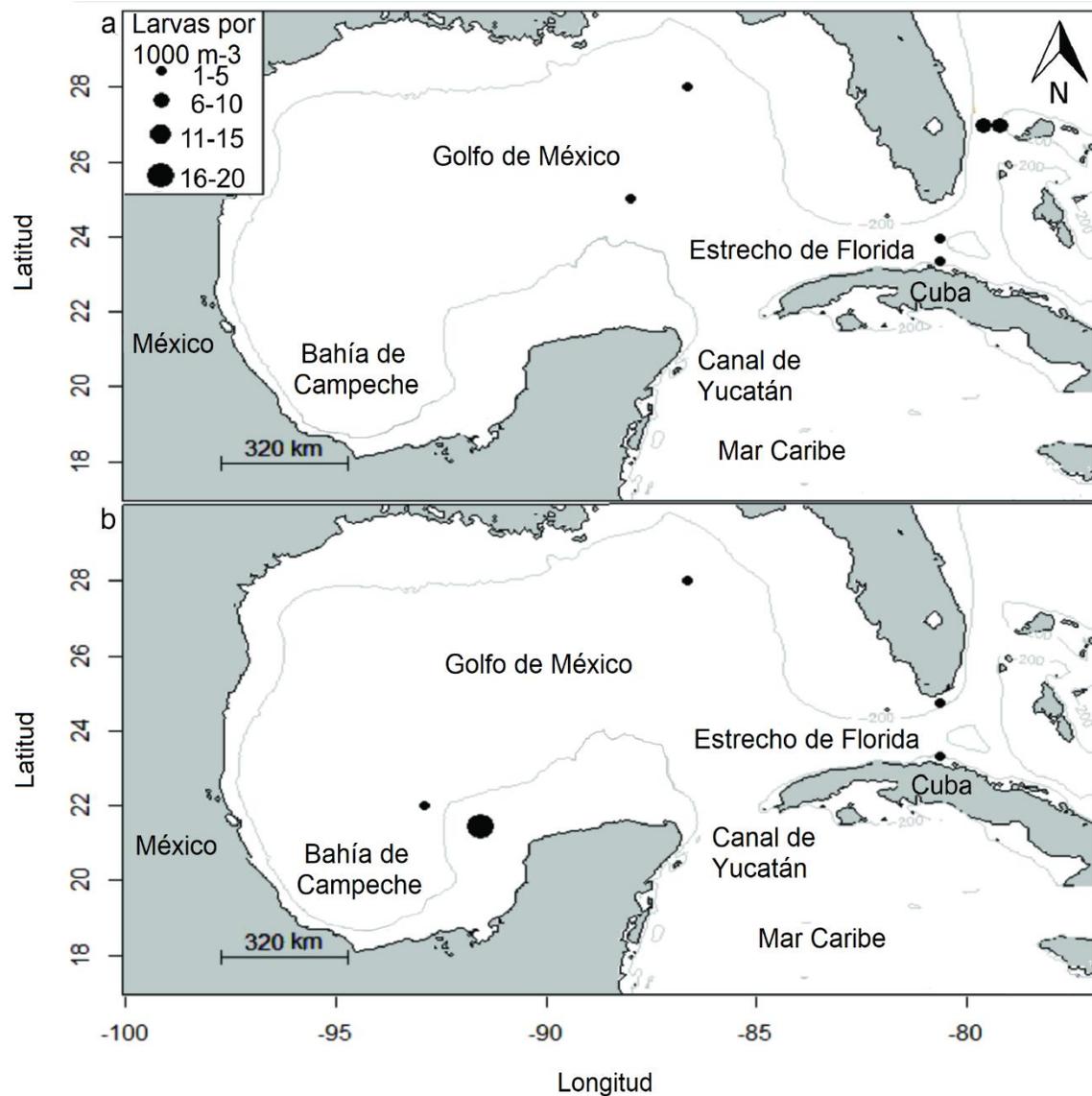
### 2.7.3 Distribución y abundancia de larvas de *B. ocellatus* y *B. robinsi* identificadas utilizando una aproximación molecular

Las larvas de ambas especies de *Bothus* se distribuyeron en la bahía de Campeche, el centro del GM, el estrecho de Florida y el Canal de Yucatán (Figura 5, 6). La especie más abundante en ambos cruceros fue *B. robinsi*, siendo el sureste de la bahía de Campeche la zona con mayor abundancia.

Se registró la distribución geográfica de los estadios larvales de cada especie, en estos mapas no se observó ningún patrón especial de distribución (Figuras 7, 8, 9, 10). En lo que respecta a *B. ocellatus* se observó que las larvas en preflexión eran las más abundantes, ubicadas en el canal de Yucatán, centro del GM, el estrecho de Florida y al este de Florida; las larvas en estadio de flexión sólo se registraron al norte del GM enfrente de las costas de Florida; las larvas en estadio de postflexión se registraron en la bahía de Campeche, el estrecho de Yucatán, el norte del GM y en el estrecho de Florida (Figuras 7, 9).

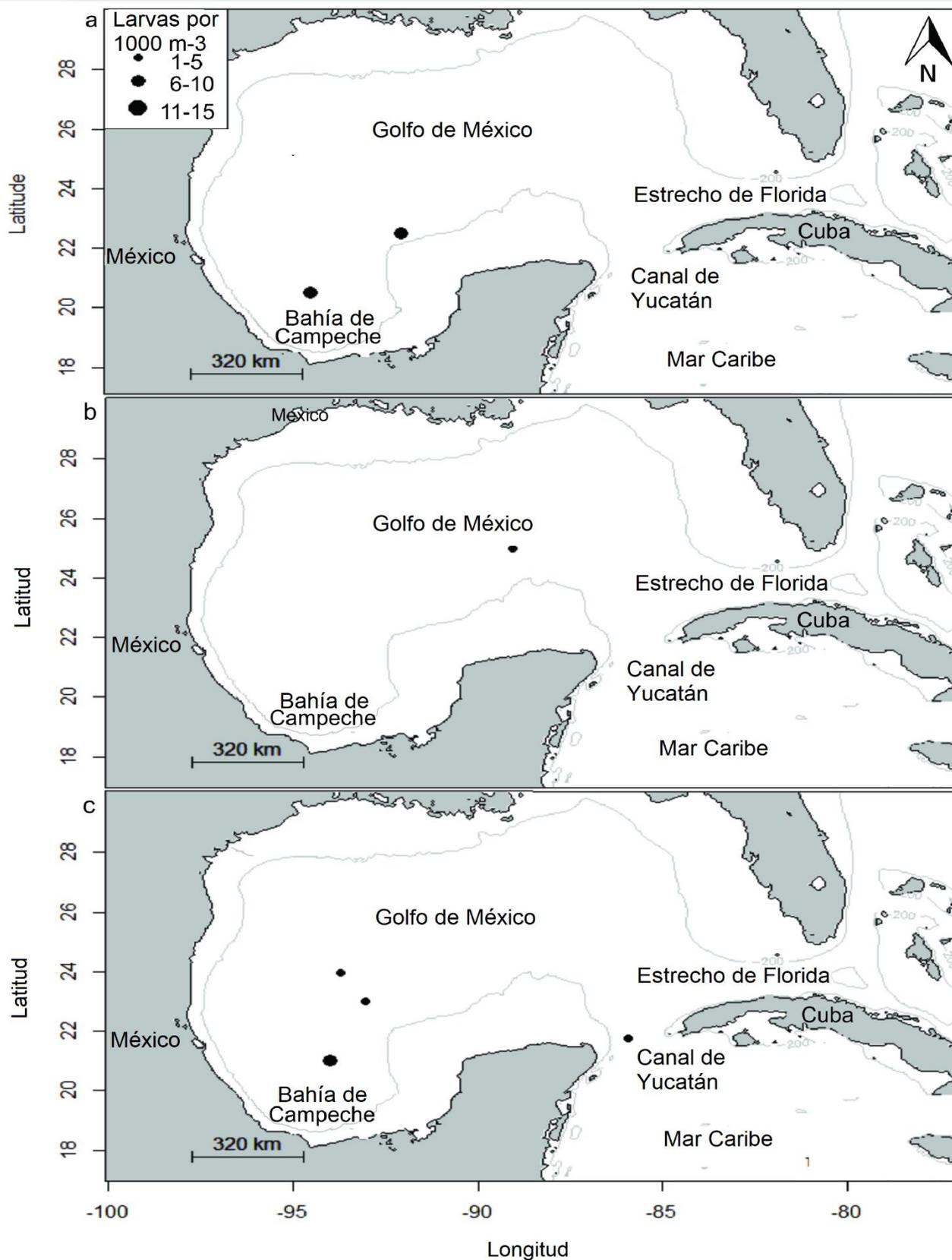


**Figura 5.** Mapa en donde se muestra la distribución y abundancia de larvas de *B. ocellatus* y *B. robinsi* identificadas molecularmente. (a) *B. ocellatus*; (b) *B. robinsi*. Se esquematiza una línea gris que representa la plataforma continental (isobata 200 m). Las larvas se colectaron durante las campañas oceanográficas del XIXIMI-04 (27 de agosto al 16 de septiembre de 2015).

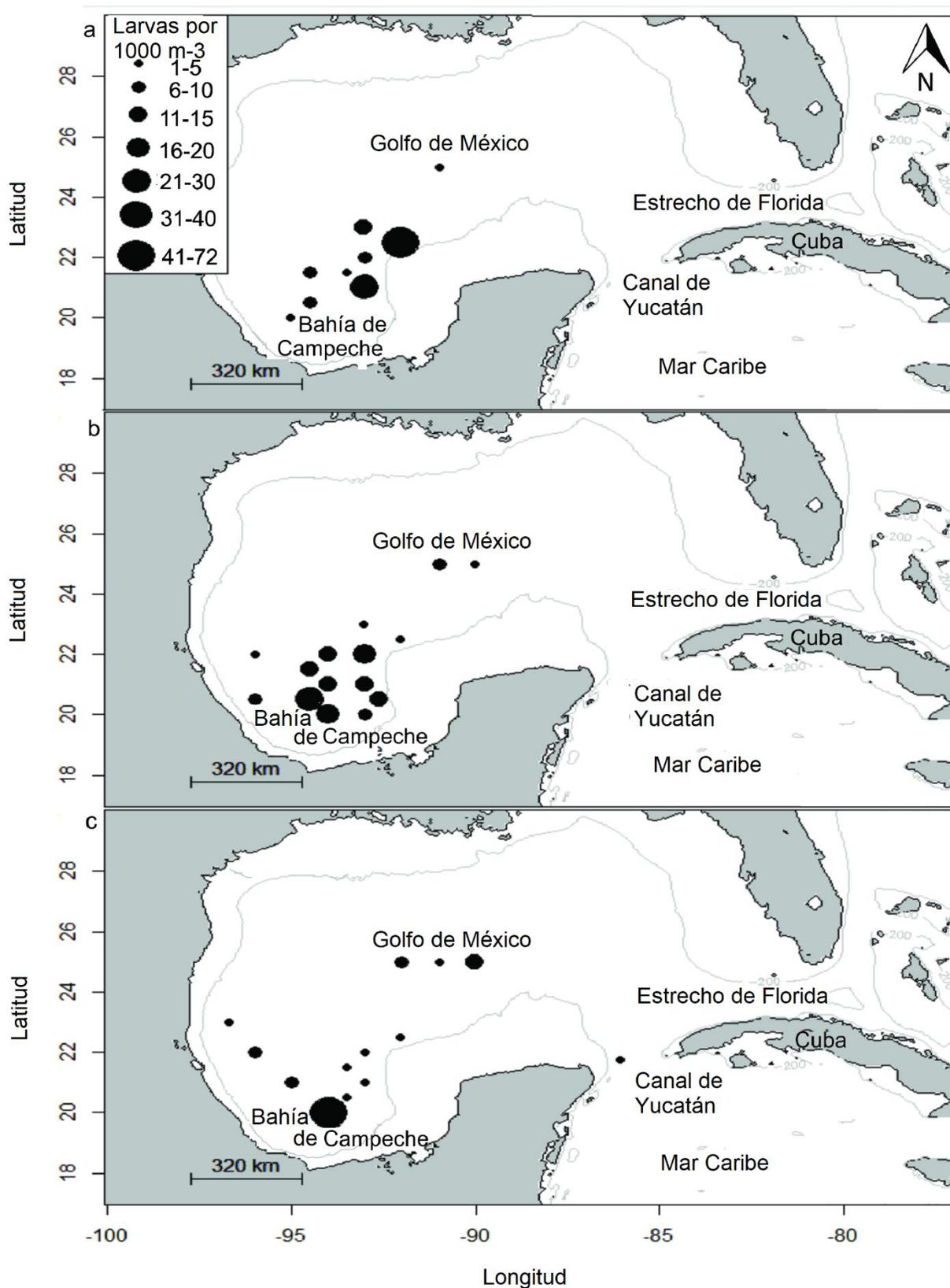


**Figura 6.** Mapa en donde se muestra la distribución y abundancia de larvas de *B. ocellatus* y *B. robinsi* identificadas molecularmente. (a) *B. ocellatus*; (b) *B. robinsi*. Se esquematiza una línea gris que representa la plataforma continental (isobata 200m). Las larvas se colectaron durante la campaña oceanográfica del GOMECC-3 (18 de julio al 21 de agosto de 2017).

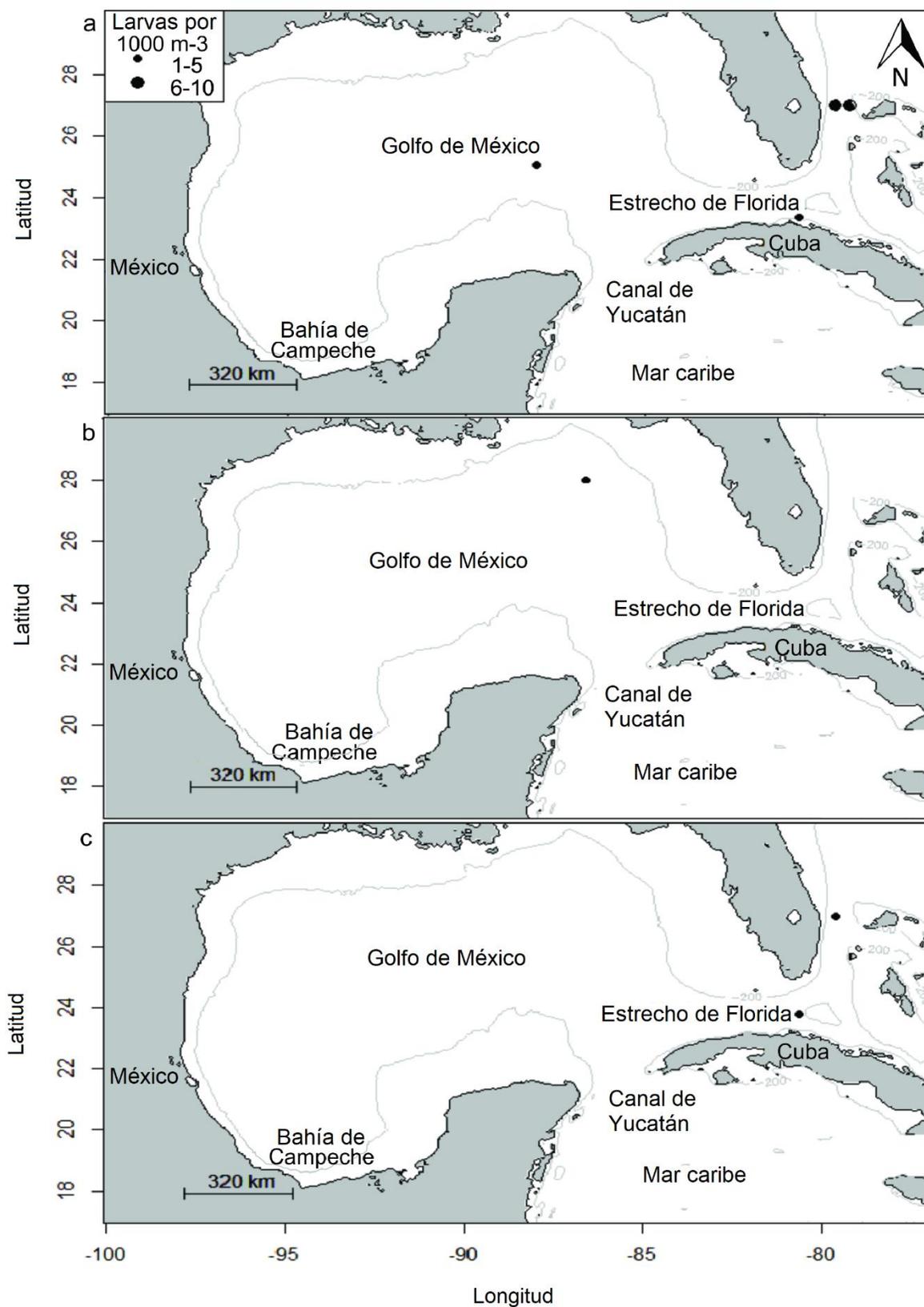
En el caso de *B. robinsi* presentó la mayor abundancia en larvas en estadios de preflexión, siendo la bahía de Campeche la zona con mayor abundancia, también se registraron larvas en el estrecho de Florida. Los estadios flexión y postflexión se encontraron en mayor abundancia en la bahía de Campeche, además las larvas en estadios en postflexión también se reportaron en el estrecho de Yucatán, el estrecho de Florida y el norte del GM enfrente de la costa de Florida (Figura 8, 10).



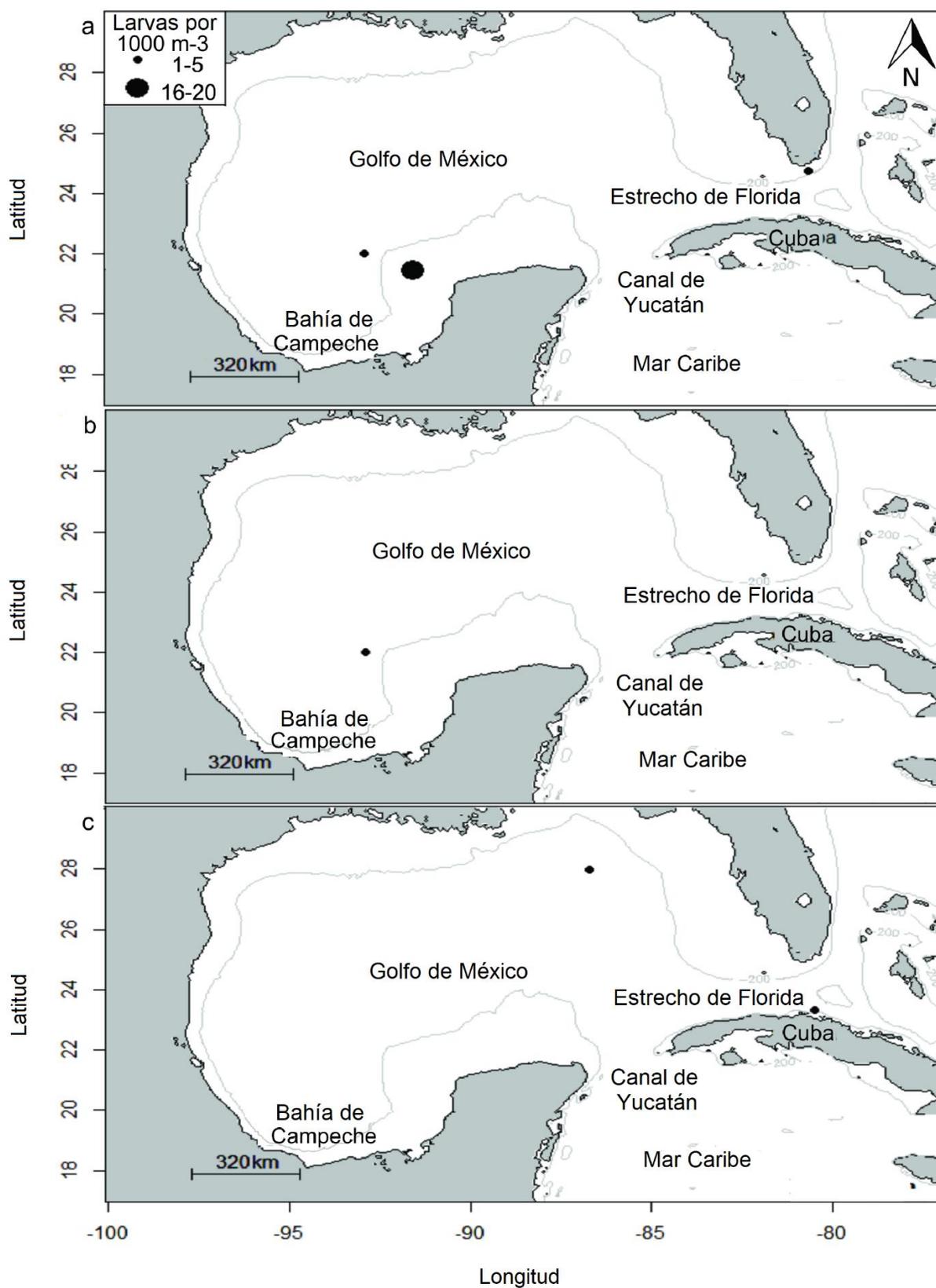
**Figura 7.** Mapa en donde se muestra la distribución y abundancia de larvas de *B. ocellatus* (identificadas molecularmente) en diferentes estadios. (a) Larvas en preflexión; (b) Larvas en flexión; (c) Larvas en postflexión. Se esquematiza una línea gris que representa la plataforma continental (isobata 200m). Las larvas se colectaron durante la campaña oceanográfica del XIXIMI-04 (27 de agosto al 16 de septiembre de 2015).



**Figura 8.** Mapa en donde se muestra la distribución y abundancia de larvas de *B. robinsi* (identificadas molecularmente) en diferentes estadios. (a) Larvas en preflexión; (b) Larvas en flexión; (c) Larvas en postflexión. Se esquematiza una línea gris que representa la plataforma continental (isobata 200m). Las larvas se colectaron durante la campaña oceanográfica del XIXIMI-04 (27 de agosto al 16 de septiembre de 2015).



**Figura 9.** Mapa en donde se muestra la distribución y abundancia de larvas de *B. ocellatus* (identificadas molecularmente) en diferentes estadios. (a) Larvas en preflexión; (b) Larvas en flexión; (c) Larvas en postflexión. Se esquematiza una línea gris que representa la plataforma continental (isobata 200m). Las larvas se colectaron durante la campaña oceanográfica del GOMECC-3 (18 de julio al 21 de agosto de 2017).



**Figura 10.** Mapa en donde se muestra la distribución y abundancia de larvas de *B. robinsi* (identificadas molecularmente) en diferentes estadios. (a) Larvas en preflexión; (b) Larvas en flexión; (c) Larvas en postflexión. Se esquematiza una línea gris que representa la plataforma continental (isobata 200m). Las larvas se colectaron durante la campaña oceanográfica del GOMECC-3 (18 de julio al 21 de agosto de 2017).

#### 2.7.4 Discusión

El análisis del marcador molecular COI, en larvas de *B. ocellatus* y *B. robinsi*, permitió la exacta identificación taxonómica, de forma que fue posible registrar estaciones con presencia de una o ambas especies. Con estos registros se generó información sobre la distribución y abundancia de individuos de *B. ocellatus* y *B. robinsi* en diferentes estadios de desarrollo larval, indicando su presencia en la zona centro, sur y noreste del GM, durante la temporada de verano. La distribución observada y abundancia calculada contrastan con los reportes previos realizados por otros grupos de trabajo, como se describe a continuación.

En estudios sobre la distribución de *Bothus* spp, se mencionó que, durante la temporada de verano, la distribución larval de *B. ocellatus* se limita a la zona sur del GM, dentro de la bahía de Campeche principalmente (Espinosa-Fuentes et al., 2013; Flores-Coto et al., 1991, 2009; Sanvicente-Añorve et al., 1998, 2000), mientras que la distribución de las larvas de *B. robinsi* se limitaba al noreste del GM, principalmente frente a la costa de Florida (Houde et al., 1979). Sin embargo, la precisión de estos trabajos es reducida, debido a que sus registros de distribución se basaron en individuos identificados morfológicamente.

La falta de claridad en la identificación morfológica entre larvas de estas especies ha provocado que se produzcan imprecisiones en el registro de su distribución y el énfasis sobre la utilización de una aproximación molecular para su identificación (Evseenko, 2008b; Morales-Pulido, 2017). Por eso, en este trabajo, con la implementación de la identificación molecular, uno de los principales resultados es el cambio en la percepción regionalizada de las larvas de estas dos especies de *Bothus*, ya que, como antes se concluyó Morales-Pulido, (2017) para la bahía de Campeche, las larvas de ambas especies presentan una amplia distribución por los menos en las aguas mexicanas el GM.

Se sugiere que la capacidad de dispersión de *B. ocellatus* y *B. robinsi* es similar, ya que ambas especies realizan varios desoves durante el año y presentan una larva pelágica con una prolongada DLP (se deben hacer estudios enfocados en este aspecto para su corroboración). Debido a que ambas especies presentan la misma distribución, los sitios de desove son los mismos, por lo que sus larvas al dispersarse en aguas oceánicas tienen probabilidades de distribuirse en las mismas zonas (Evseenko, 2008b; Froese y Pauly, 2022; Houde et al., 1979; Lara-Hernández et al., 2019; McEachran, 2009). Por lo tanto, el registro obtenido en el presente trabajo refleja de manera más precisa la distribución de las larvas de estas especies y se

corroborar que al utilizar una técnica de identificación molecular existe una gran probabilidad de registrar larvas de ambas especies en un mismo tiempo y espacio.

En lo referente a la abundancia se observó una predominancia de *B. robinsi*, representando el 83.33% de las larvas recolectadas. Esto es contrastante con los datos de la zona sur, donde a *B. ocellatus* se le había considerado como predominante y a *B. robinsi*, en algunos casos reportada como inexistente (Flores-Coto et al., 1991, 2009; Sanvicente-Añorve et al., 2000). Esto se debe tener en consideración, ya que por estos registros de abundancia y distribución se ha sugerido que *B. ocellatus* tenía una mayor actividad reproductiva en verano y otoño, con un pico de desove en otoño (Garbini et al., 2014). Sin embargo, con los resultados obtenidos, podemos determinar que esta sugerencia para el verano carece de robustez, además de que para esta especie aún faltan estudios sobre madurez gonadal que evidencien una determinada temporada de pico de desove (Flores-Coto et al., 1991, 2009; Garbini et al., 2014). Debido a esto, se sugiere que la información se debe reconsiderar. Este es un caso en que la baja precisión de las identificaciones de las larvas de estas dos especies lleva a la generación de interpretaciones ecológicas sesgadas.

Es importante mencionar que en este trabajo se realizó un muestreo que presenta limitaciones en la generación de información suficiente para explicar las razones de la distribución geográfica de las larvas identificadas. Esto se debe principalmente a que es necesaria una red de muestreo con una mayor cantidad de estaciones y que abarque un área mayor del GM, además de que es necesario una mayor cantidad de campañas oceanográficas (varios años y varias estaciones del año) que presenten la misma red de muestreo. Es por lo anterior, que se decidió formular una explicación que se basa en la relación de los datos obtenidos sobre la distribución larval y la información registrada sobre la dinámica oceánica del GM, que servirá como una primera aproximación en la interpretación de la acumulación de larvas en ciertas zonas (Lara-Hernández et al., 2019).

En el caso de la campaña oceanográfica del XIXIMI-04 se observó que la mayor abundancia de larvas y la mayor cantidad de estaciones positivas para *B. robinsi* y para *B. ocellatus* se localizaron al sureste de la bahía de Campeche. De acuerdo con lo expuesto en trabajos de simulaciones de dispersión larval, la zona oeste de la bahía de Campeche presenta una tendencia de retención larval derivada de las corrientes costeras. Estas corrientes retienen a las larvas en la franja de la plataforma continental y las dispersan hacia el norte o al sureste dependiendo de las características hidrológicas derivadas de la estación climática. Las larvas desovadas pueden acceder a zonas de aguas profundas si son transportadas hasta la zona sureste de la bahía de Campeche, donde se ha descrito una zona de transición de aguas neríticas y

aguas profundas en donde existe eyección de larvas. Por lo que la tendencia es que las larvas desovadas, en la plataforma continental de la bahía de Campeche, sean transportadas a través de esta zona de transición, generando una zona de acumulación de larvas que pudieran ser desovadas desde diferentes zonas de la franja de la plataforma continental (Lara-Hernández et al., 2019; Miron et al., 2017).

En lo que respecta a la zona del estrecho de Florida y el estrecho de Yucatán, se encontró una menor cantidad de larvas. De acuerdo con los trabajos de modelación larvas, se considera que el estrecho de Florida y el estrecho de Yucatán son zonas con una alta influencia de la corriente de Lazo, la cual desde el estrecho de Yucatán transporta a larvas del Mar Caribe a gran velocidad, como sucede desde la zona del estrecho de Florida que transporta a las larvas hacia al Atlántico, evitando la acumulación de las mismas (Lara-Hernández et al., 2019; Miron et al., 2017; Pérez-Portela et al., 2018).

Por último, la distribución geográfica de los tres estadios de desarrollo fue similar. En general no se observó ningún patrón especial en la distribución de los estadios larvales, esto se podría explicar por la larga DLP y la capacidad de estas especies de hacer varios desoves al año, lo cual permite que larvas de diferentes estadios puedan transportarse en diferentes tiempos, mezclándose con larvas de diferentes desoves, ocasionando esta homogeneidad en la distribución de los estadios larvarios (Evseenko, 2008b; Houde et al., 1979; Ottmann et al., 2016). En lo que respecta la abundancia, se observó una mayor abundancia de larvas en estadio de preflexión, esto se atribuye a los múltiples desoves que se dan durante el año que contribuyen con larvas en los primeros estadios de desarrollo larval. Sin embargo, se recomienda realizar estudios, que incluyan muestreos con una mayor cantidad de estaciones y en diferentes estaciones del año, que puedan corroborar esta información.

### 2.7.5 Conclusiones

Este capítulo sienta nuevas bases sobre la distribución y abundancia de las larvas de *B. ocellatus* y *B. robinsi* dentro del GM, basando su precisión en la utilización de herramientas moleculares de identificación.

Se corroboró la inexistencia de una distribución geográfica regionalizada por parte de las larvas de *B. ocellatus* y *B. robinsi*, durante la temporada de verano. Además, se obtuvieron indicios de que las larvas de *B. robinsi* presentan una mayor abundancia en la temporada de verano a comparación de *B. ocellatus*, cambiando la perspectiva sobre la predominancia de larvas de *B. ocellatus* en la bahía de Campeche.

La utilización de la identificación molecular para realizar futuros registros de distribución y abundancia larval durante primavera, otoño y verano, permitirá definir las temporadas en que cada especie presenta una predominancia en distribución geográfica y abundancia larval. Esto podrá brindar información suficiente para definir las temporadas de picos de abundancia larval de cada especie.

Se ha obtenido un primer acercamiento sobre el posible patrón de distribución de los diferentes estadios de desarrollo de las larvas de *B. ocellatus* y *B. robinsi* dentro del GM durante la temporada de verano, sugiriendo la posibilidad de una distribución homogénea de los estadios de desarrollo: preflexión, flexión y postflexión. Sin embargo, es necesario realizar un estudio con un mayor número de estaciones que abarque una mayor área del GM, y en donde los muestreos se realicen durante las cuatro estaciones del año, para obtener así una idea sobre la tendencia de la distribución de los estadios larvales. Con lo anterior se podrá corroborar que la distribución de los estadios larvales (preflexión, flexión y postflexión) se mantiene homogénea durante todo el año y en todo el GM.

Finalmente, se considera que la información obtenida en este capítulo presenta la robustez necesaria para realizar los primeros acercamientos para evaluar y complementar la información sobre procesos como son la dispersión y conectividad larval.

A partir de este capítulo se publicó el artículo:

Morales-Pulido, J. M., Galindo-Sánchez, C. E., Jiménez-Rosenberg, S. P. A, Arteaga, M. C., Batta-Lona, P. G. y Herzka, S. Z. (2022). Identification of *Bothus ocellatus* and *B. robinsi* larvae using morphological and molecular approaches leads to a distribution record for the Gulf of Mexico. *Environmental Biology of Fishes*, 106(1), 43-59. <https://doi.org/10.1007/s10641-022-01370-1>

## Capítulo 3. Conectividad genética de larvas y adultos de *Bothus robinsi* dentro del golfo de México

---

### 3.1 Introducción de conectividad

La conectividad demográfica es la vinculación entre poblaciones locales, a través de la dispersión de individuos en etapa larvaria, juvenil o adulta (Cowen y Sponaugle, 2009; Kendrick et al., 2017). En organismos marinos, las interacciones entre factores bióticos (temporada de desove, duración larval pelágica (DLP), distribución, etc.) y abióticos (barreras físicas, corrientes marinas, distancia entre poblaciones, etc.) son clave para entender la probabilidad de éxito de su conectividad (Baguette y Van Dyck, 2007; Casado-Amezúa, 2013; Kool et al., 2013).

Al estudiar la conectividad poblacional de peces se ha detectado una variedad de interacciones bio-físicas, debido a la presencia de diversas estrategias de dispersión. Estas estrategias van desde la presencia de una larva pelágica, capaz de aprovechar los agentes ambientales para su dispersión (estrategia pasiva), hasta el desplazamiento por propia fuerza del organismo (estrategia activa), normalmente observada en estadios juveniles y adultos (Calò et al., 2013; Chovanec et al., 2003; Compaire et al., 2021; Hamner et al., 2007; Pérez-Portela et al., 2018).

En escala espacial la dispersión larval es generalmente de varios órdenes de magnitud mayor que en etapas juveniles o adultas. Siendo, el transporte larval a través de las corrientes oceánicas el principal impulsor de la conectividad biológica de varios peces marinos (Green et al., 2015). La presencia de larvas pelágicas es de utilidad para entender procesos de conectividad poblacional. Este tipo de estudios permiten la integración de factores bióticos y abióticos para generar información ecológica de las especies (éxito reproductivo, potencial de dispersión y las variaciones demográficas de sus poblaciones) (Baguette y Van Dyck, 2007; Casado-Amezúa, 2013; Kool et al., 2013).

La conectividad se puede estimar a través de modelajes de corrientes marinas y del transporte de larvas virtuales, obteniendo así información sobre la conectividad demográfica, la cual se define como la contribución relativa de la dispersión larval a la dinámica demográfica (Marandel et al., 2018). Esta aproximación permite la caracterización de rutas de dispersión de organismos planctónicos, a partir de la combinación de escalas espaciales y temporales de amplia magnitud, desde un enfoque bio-físico. Donde

se toman en cuenta desde las corrientes marinas, vientos, mareas, temporada de desove, duración del estadio larval, hasta la capacidad del organismo de realizar migraciones verticales y horizontales, además de su preferencia de sitios de asentamientos (Compaire et al., 2021; Lara-Hernández et al., 2019; Sanvicente-Añorve et al., 2014; Werner et al., 2007). Este tipo de modelación ha permitido obtener información sobre la conectividad potencial, además de registrar como la variación estacional de las corrientes influye en las rutas de dispersión, resultando en la conectividad entre diferentes poblaciones en diferentes temporalidades (Lara-Hernández et al., 2019; Sanvicente-Añorve et al., 2014).

Otro enfoque para entender los procesos de dispersión es a través del estudio de la conectividad genética. Esta se define como el grado en que el flujo genético (efecto de la migración) afecta a los procesos evolutivos dentro de las poblaciones (Marandel et al., 2018). El flujo genético consiste en el proceso de dispersión, supervivencia y asentamiento de larvas en nuevas poblaciones, para que posteriormente las larvas se desarrollen hasta su estadio adulto y sean capaces de reproducirse. Lo anterior trae como consecuencia la contribución de información genética al *pool* genético de la población (Gagnaire, 2020; Hedgecock et al., 2007; Villegas-Sánchez et al., 2014). Esta se puede medir a través de la comparación de la diferencias genéticas entre poblaciones (Hedgecock et al., 2007).

Para medir la conectividad genética es necesario el análisis de marcadores moleculares (los cuales pueden ser de regiones específicas del ADN), en donde se buscará detectar variaciones o polimorfismos entre individuos de las poblaciones (Parker et al., 1998; Reitzel et al., 2013). A partir de estas variaciones se calculan las frecuencias alélicas, las cuales serán comparadas entre poblaciones. Donde la similitud de las frecuencias alélicas de dos o más poblaciones indicarán el grado de flujo genético (Hedgecock et al., 2007; Villegas-Sánchez et al., 2014).

La eficiencia de estos marcadores para evaluar la conectividad genética, depende de su amplia distribución en el genoma, alta variabilidad, herencia estable (baja tasa de mutación) y elevada reproductividad. Estas características elevan la probabilidad de muestreo de polimorfismos, lo cual hace posible la obtención de la resolución suficiente para contestar preguntas a nivel poblacional (Aranguren-Méndez et al., 2005; Morin et al., 2004).

Los polimorfismos de nucleótido simple (*single nucleotide polymorphisms*, SNP's) son marcadores moleculares que han sido utilizados en estudios de conectividad por presentar una distribución en regiones codificantes y no codificantes (Aranguren-Méndez et al., 2005; Morin et al., 2004). Sus ventajas no sólo se restringen a sus características basales, sino también a las otorgadas por las nuevas técnicas de

obtención de SNP's y de secuenciación, las cuales consisten en la capacidad de obtener información genética de especies sin información previa de su genoma (*de novo*), y en la obtención de miles de SNP's a través de un balance positivo entre costos y esfuerzos (Morin et al., 2004). Todas estas características han dado pauta a que los SNP's presenten una mayor resolución que otros marcadores moleculares previamente usados, como es el caso de los microsatélites que, a diferencia de los SNP's, necesitan información previa del genoma del organismo de estudio, con lo que la capacidad de muestreo de polimorfismos depende del conocimiento que se tenga del mismo, reduciendo la cantidad de microsatélites en los análisis poblacionales (Villegas-Sánchez et al., 2014).

La mayoría de los estudios de conectividad genética se enfocan en el muestreo de individuos adultos, que normalmente representan múltiples cohortes y generaciones de dispersión de larvas y adultos que han sido sometidos a los efectos de supervivencia durante el asentamiento y el crecimiento. Dando como resultado la representación de todos estos procesos en la estructura genética y la conectividad (Gagnaire, 2020; Hedgecock et al., 2007). Los estudios de genética poblacional, de larvas en tránsito, son relativamente raros. Aun así, pueden dar información sobre una etapa importante, pero compleja en la historia de vida de los peces marinos, que eventualmente influye en el proceso genético de la población (Ottmann et al., 2016; Riquet et al., 2017; Shima y Swearer, 2016).

La disponibilidad de información genética sobre los grupos de larvas es un desafío logístico. La composición y el destino del reservorio larval depende de diferentes factores físicos y biológicos del medio ambiente (Otwoma et al., 2018; Pineda et al., 2007). Se plantea que la imprevisibilidad ambiental provoca la muerte de una gran proporción de larvas, que finalmente no logran asentarse ni sobrevivir. Por lo que, sólo un pequeño subconjunto de larvas sobrevive y finalmente se reproduce en su estadio adulto (Shima y Swearer, 2016). Este fenómeno se denomina *sweepstakes reproductive success*, el cual disminuye el tamaño efectivo poblacional e incrementa la probabilidad de la deriva genética y las diferencias en las frecuencias alélicas entre las subpoblaciones (Ottmann et al., 2016). Sin embargo, algunos estudios han contradicho esta hipótesis al mostrar homogeneidad genética entre múltiples eventos larvarios (Domingues et al., 2011).

El proceso de mezcla en la etapa de dispersión es esencial para que los reservorios larvales mantengan una alta diversidad genética (Yearsley et al., 2013). Sin embargo, se ha registrado que, en algunas especies, las larvas no presentan el proceso de mezcla y muestran una dispersión colectiva. Esto implica que la dispersión larval no es del todo independiente entre sí (Yearsley et al., 2013). En el escenario de dispersión colectiva, las larvas de un mismo evento de desove, tienden a viajar juntas, ya sean impulsadas por el

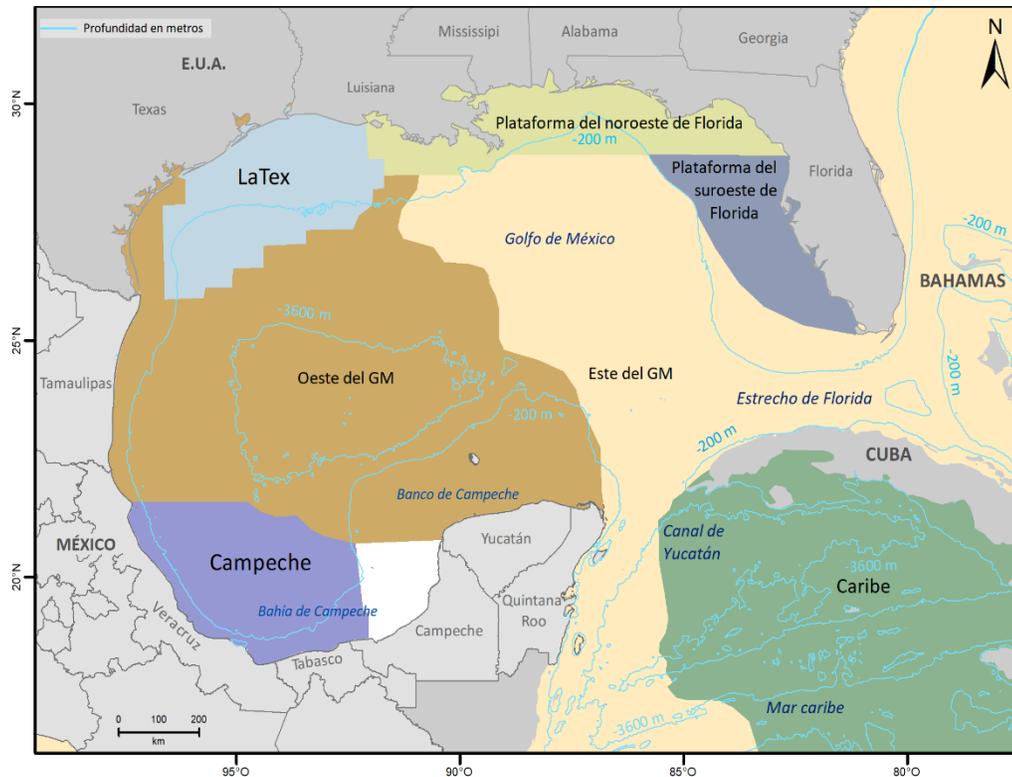
comportamiento de las larvas o por procesos oceanográficos físicos. La dispersión colectiva permite que los parientes permanezcan juntos durante la fase de dispersión, lo que aumenta las medidas de endogamia en los *pools* larvales (Riquet et al., 2017).

El lenguado *Bothus robinsi* es un pez pequeño (longitud máxima 30-40 cm) que habita en la plataforma continental e insular entre 0-100 m de profundidad. En el golfo de México (GM), *B. robinsi* se distribuye desde la plataforma continental de Florida hasta la de Quintana Roo (Blanqueto-Manzanero y Vega-Cendejas, 2018; Evseenko, 2008b; McEachran, 2009; Munroe, 2003). Debido a su pequeño tamaño, este lenguado no es considerado de pesca comercial. Sin embargo, presenta importancia ecológica, ya que contribuye al flujo de nutrientes, actuando como depredador y presa (en todas sus etapas de desarrollo) de diferentes crustáceos, ctenóforos, peces, entre otras especies (Wakida-Kusunoki et al., 2013). Además, de que las larvas del género *Bothus*, entre ellas las de *B. robinsi*, tienen el potencial de ser un bioindicador debido a su alta abundancia y distribución en aguas neríticas y oceánicas en todas las estaciones del año (Flores-Coto et al., 2009; Houde et al., 1979; Sanvicente-Añorve et al., 2000).

La principal estrategia de dispersión en los peces depende de la presencia de huevos y larvas pelágicas. *Bothus robinsi* presenta un alto potencial de dispersión, debido a su capacidad de desovar durante todo el año y larga DLP (Evseenko, 2008b; Houde et al., 1979). Al igual que otros lenguados del género *Bothus* son capaces de extender su etapa de desarrollo larvario. Un estudio de *B. podas* indica que sus larvas podrían asentarse a los tres meses, dependiendo de las características ambientales (Morato et al., 2007). Para *B. robinsi*, hay un registro que sugiere la posibilidad de que su DLP sea de 5-12 meses (Evseenko, 2008b). Los peces del orden Pleuronectiformes se caracterizan por presentar una DLP larga, por ejemplo, el lenguado pardo (*Citharichthys spilopterus*; Gunther, 1862) con 70 días (Joyeux et al., 1995), y 4-7 meses para el rodaballo (*Hippoglossus hippoglossus*; Linneo, 1758) (Sadorus et al., 2021).

El potencial de dispersión de *B. robinsi* no termina al concluir su estado larvario. Su etapa juvenil puede sobrevivir un periodo (el tiempo exacto no está registrado) en el ambiente pelágico hasta el asentamiento, porque, para evitar la inanición, utilizan la reserva de nutrientes almacenados en su masivo hígado (Evseenko, 1978, 2008b). Además, mantienen una coloración transparente y poco visible que les permite mimetizarse en el ambiente pelágico, evitando a los depredadores, y aumentando su probabilidad de asentamiento (Evseenko, 2008b). La capacidad de dispersión de *B. robinsi* se traduce en un alto potencial de conectividad en el golfo de México (GM).

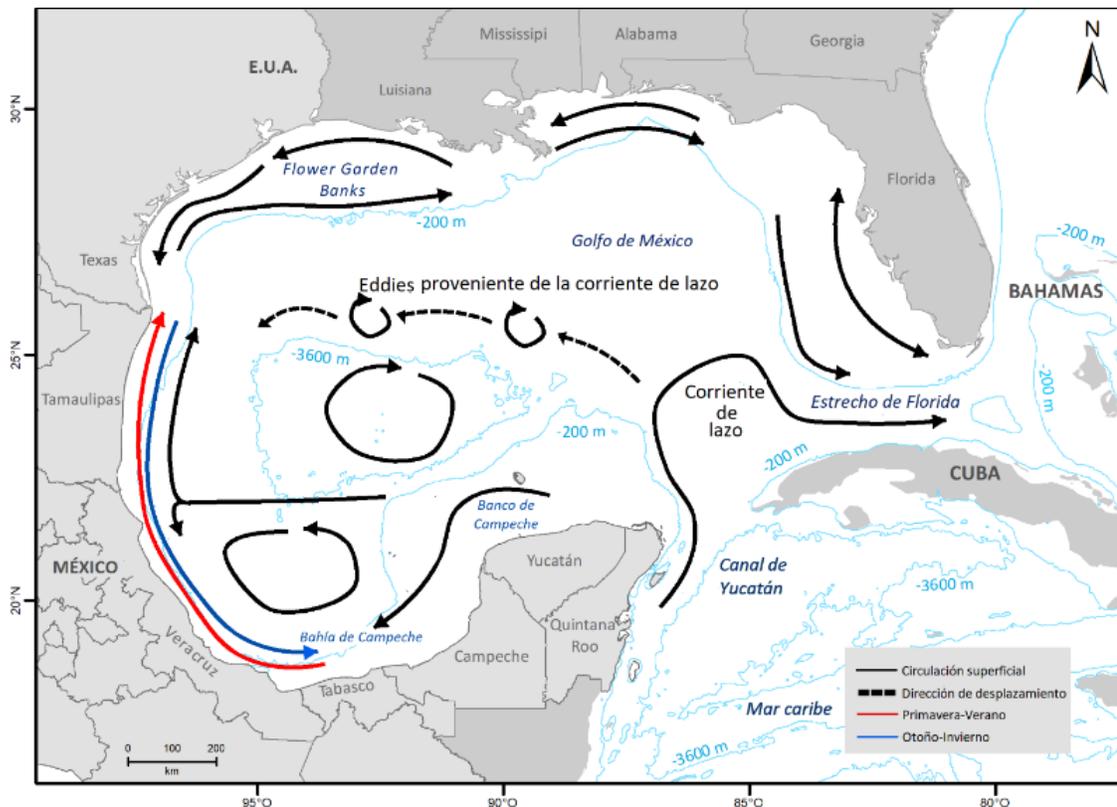
El GM es un mar semicerrado con una superficie de 1.6 millones de km<sup>2</sup>. Es un sistema dinámico, debido a la presencia de corrientes heterogéneas que fragmentan el ambiente pelágico en provincias (Figura 11) caracterizadas por algún grado de aislamiento (Miron et al., 2017). Los giros ciclónicos y anticiclónicos provocan la retención temporal de plancton, lo cual restringe la conectividad entre lugares distantes del GM, manteniendo a los organismos planctónicos dentro de las provincias, como se observa debido al giro ciclónico de la bahía de Campeche (Díaz-Flores et al., 2017; Miron et al., 2017).



**Figura 11.** Esquema en que se muestran las provincias registradas dentro del golfo de México (GM). Louisiana-Texas (LaTex). Figura tomada y modificada de Miron et al., (2017).

La principal característica oceanográfica del GM es la corriente de Lazo y sus giros relacionados. Esta corriente ingresa al GM por el canal de Yucatán, gira anticiclónicamente hacia el este y sale del GM por el estrecho de Florida (Figura 12) (Díaz-Flores et al., 2017; Lara-Hernández et al., 2019). Giros anticiclónicos pueden ser desprendidos de la corriente de Lazo (en cualquier mes del año) como resultado de múltiples procesos estacionales y estocásticos. Los giros se desplazan hacia el oeste o noroeste hasta llegar a la plataforma continental entre el norte de Veracruz y el sur de Texas (Figura 12) y disiparse luego de 2-4 meses (Díaz-Flores et al., 2017; Herzka et al., 2021; Muller-Karger et al., 2015). Estos giros anticiclónicos (200-300 km) interactúan con la plataforma continental, generando surgencias costeras en toda la región.

Aunque la circulación anticiclónica es general en el GM, existen zonas con circulación ciclónica, incluida la plataforma continental entre Texas y Luisiana, la plataforma continental al oeste de Florida y el giro ciclónico en la bahía de Campeche (Figura 12). Sobre la plataforma continental (es decir, Tamaulipas y Veracruz), los vientos estacionales impulsan la dirección de las corrientes hacia el norte durante mayo-agosto y hacia el sur o sureste durante septiembre-marzo (Herzka et al., 2021; Lara-Hernández et al., 2019). La interacción entre giros ciclónicos y anticiclónicos permite el transporte y partículas entre provincias (Herzka et al., 2021; Lara-Hernández et al., 2019; Muller-Karger et al., 2015).



**Figura 12** Mapa del golfo de México que muestra la circulación superficial (0-200 m) durante las temporadas de primavera, verano, otoño e invierno. Esquema basado en Zavala-Hidalgo et al., 2003; Hamilton et al., (2018); Lara-Hernández et al., (2019); Turner y Rabalais (2019); Romero-Centeno et al., (2021).

Varios estudios en el GM han modelado trayectorias lagrangianas de partículas (larvas virtuales o propágulos) impulsadas por las corrientes oceánicas utilizando el modelo *Hybrid Coordinate Ocean Model* (HYCOM) (Johnson et al., 2013; Sanvicente-Añorve et al., 2014). Por lo general, las partículas se rastrean durante un período basado en la DLP de la especie en cuestión, para estimar la proporción de partículas que se asientan en distintas regiones y los patrones de conectividad potencial (Johnson et al., 2013; Lara-Hernández et al., 2019; Sanvicente-Añorve et al., 2014). Según simulaciones de transporte larval (Johnson

et al., 2013; Lara-Hernández et al., 2019; Salas-Monreal et al., 2018), la DLP influye en la probabilidad de que las larvas escapen de su provincia oceanográfica natal. La provincia de Campeche (Figura 11) se encuentra al sur del GM dentro de la bahía de Campeche, rodeada en tres lados por los estados mexicanos de Veracruz, Tabasco y Campeche. Esta provincia tiende a retener plancton como resultado de la dinámica nerítica estacional, que consiste en un giro ciclónico y la influencia de un giro anticiclónico ubicado al norte sobre aguas oceánicas (Díaz-Flores et al., 2017; Lara-Hernández et al., 2019; Sanvicente-Añorve et al., 2014).

Los estudios que modelan el transporte larval en el GM sugieren que los peces con DLP corta (16 días) tienen un alto grado de conectividad entre las subpoblaciones cercanas (separadas por ~ 56 km dentro de la bahía de Campeche), sin embargo, las subpoblaciones ubicadas en la plataforma de Veracruz y Campeche (separadas por ~ 460 km) exhiben menor conectividad (Lara-Hernández et al., 2019; Sanvicente-Añorve et al., 2014). Las especies con una mayor DLP (31 días) muestran conectividad potencial entre subpoblaciones de distintas provincias, incluidas Campeche y la plataforma suroeste de Florida, separadas por 1280 km (Johnson et al., 2013; Lara-Hernández et al., 2019). Organismos con una DLP de 4-7 meses, como la langosta espinosa del Caribe (*Panulirus argus*), muestran conectividad entre subpoblaciones distantes de diferentes provincias, separadas por 1,680 km (norte de Veracruz y sur de Florida) (Lara-Hernández et al., 2019).

En este capítulo, se contrastan las frecuencias alélicas entre grupos de larvas de múltiples ubicaciones alrededor del GM, y peces adultos de *B. robinsi* del norte del GM. También se evaluó la diversidad genética en el grupo de larvas de *B. robinsi* y se probó si las larvas tendían a mezclarse o si mostraban evidencia de dispersión colectiva. Finalmente, se evaluó la conectividad genética utilizando larvas y adultos de *B. robinsi* de todo el GM.

## **3.2 Antecedentes**

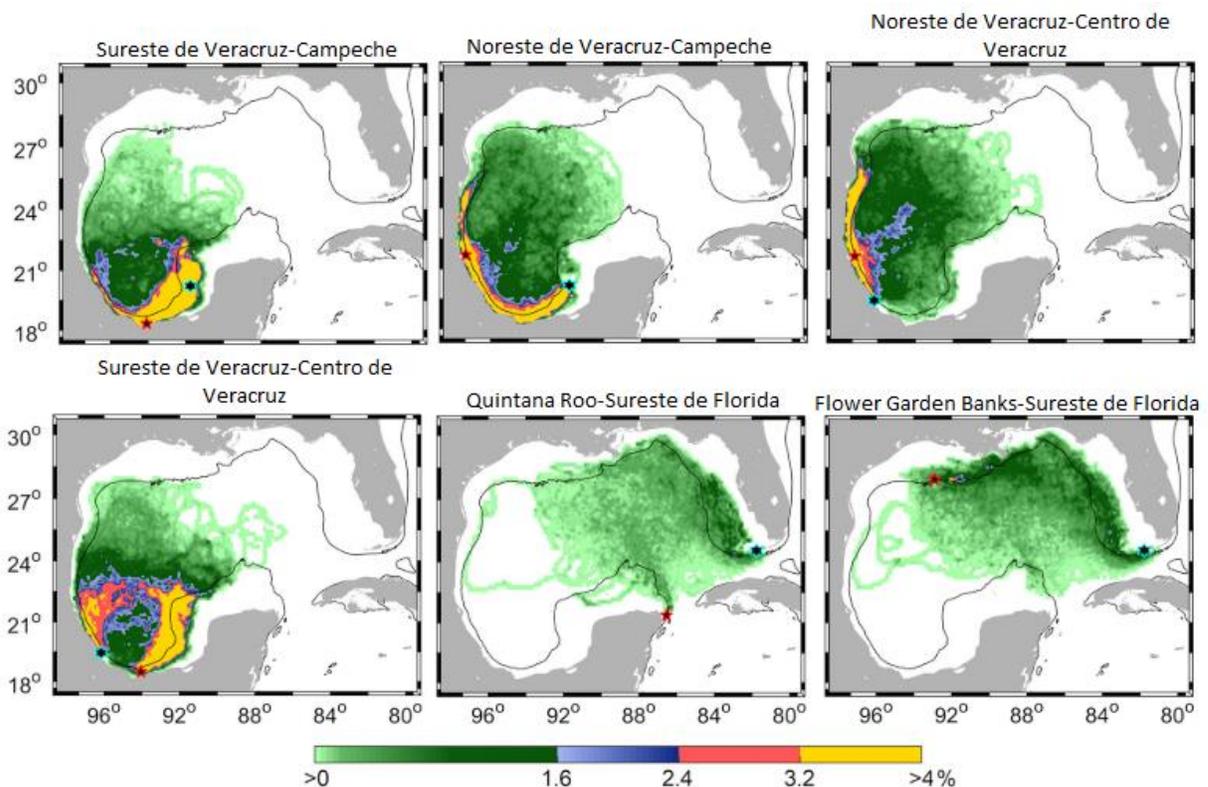
### **3.2.1 Simulaciones de rutas de dispersión de organismos dentro del GM**

A través de los modelos de dispersión larval se ha observado que los cambios estacionales en la dinámica oceánica afecta la dirección de la dispersión larval dentro del GM y que, dependiendo de las características biológicas de las especies, estos cambios favorecen la dispersión larval hacia diversos puntos del GM (Lara-

Hernández et al., 2019; Salas-Monreal et al., 2018). Salas-Monreal et al. (2018) observaron que la dirección de las rutas de transporte de larvas de peces coralinos varía en el transcurso del año. Esto se determinó al recrear las rutas de transporte larval utilizando los siguientes parámetros: DLP de 30 días y datos mensuales (durante 2015) de velocidades geostroficas, temperatura superficiales y concentraciones de clorofila. Se tomaron como puntos de desove y de asentamiento los sistemas arrecifales del sur (Campeche, Veracruz y Tuxpan-Lobos) y del norte del GM (*Flower Garden Banks*). Se concluyó que la conectividad entre todos los sistemas arrecifales del sur se mantiene durante todo el año, mientras que la conectividad entre el sur y el norte se produce en los meses de enero, febrero, mayo, julio, agosto y septiembre. Esto se explica principalmente por el esfuerzo del viento sobre las corrientes marinas, las cuales afectan la dirección de las rutas de dispersión. Durante primavera y verano existe un viento dominante del sur permitiendo el transporte desde la plataforma continental de la Península de Yucatán hasta la plataforma continental de Texas-Louisiana; mientras que en otoño e invierno existe un viento dominante del norte que permite el transporte de larvas desde la plataforma continental de Texas-Louisiana hacia la plataforma continental de la Península de Yucatán. Haciendo que la conectividad entre las zonas del GM tienda a variar dependiendo de las condiciones del viento, y por ende, la de las corrientes que se dan estacionalmente. Esta información indica cómo las rutas de transporte de las larvas pueden variar dependiendo de la ubicación y temporalidad del desove.

Actualmente, en este sistema oceánico no existen trabajos sobre simulaciones de trayectorias larvales de peces con una DLP mayor a los 30 días, pero sí de otros grupos taxonómicos. Uno de estos fue elaborado por Lara-Hernández et al., (2019), donde utilizaron como objeto de estudio a la langosta espinosa *Panulirus argus* (Latreine, 1804). Su desarrollo pelágico comprende 10 estadios larvales (filosomas) y un estadio post-larval (puerulo), permitiendo que su ciclo de vida larval tenga una duración entre cinco y siete meses (150-210 días). Para estudiar los alcances de su dispersión, se utilizaron 12 puntos de origen y asentamiento, de los cuales dos se ubicaron en el Banco de Campeche y *Flower Garden Banks* y otros diez puntos se repartieron dentro de la plataforma continental frente a las costas del Noroeste de Cuba, Quintana Roo, Campeche, sureste de Veracruz, centro de Veracruz, noroeste de Veracruz, Texas, y noreste, Centro y sureste de Florida (Figura 13). La parametrización de este modelo se alimentó de datos hidrodinámicos de cinco años (2006-2010), tomados del *Hybrid Coordinate Ocean Model* (HYCOM) y el *Navy Coupled Ocean Data Assimilation* (NCODA). Se determinó que la liberación de las partículas pasivas iniciaría en los meses de marzo 21 a junio 18 de los años 2006, 2007, 2008, 2009 y 2010. Las partículas se rastrearon durante un período de 140 hasta un máximo de 198 días, y se consideró que la etapa de asentamiento ocurriera después de los 140 días, entre los meses de agosto a diciembre. Se clasificaron como sitios de asentamiento, las zonas con una profundidad mayor de 5 m. Este modelo permitió observar

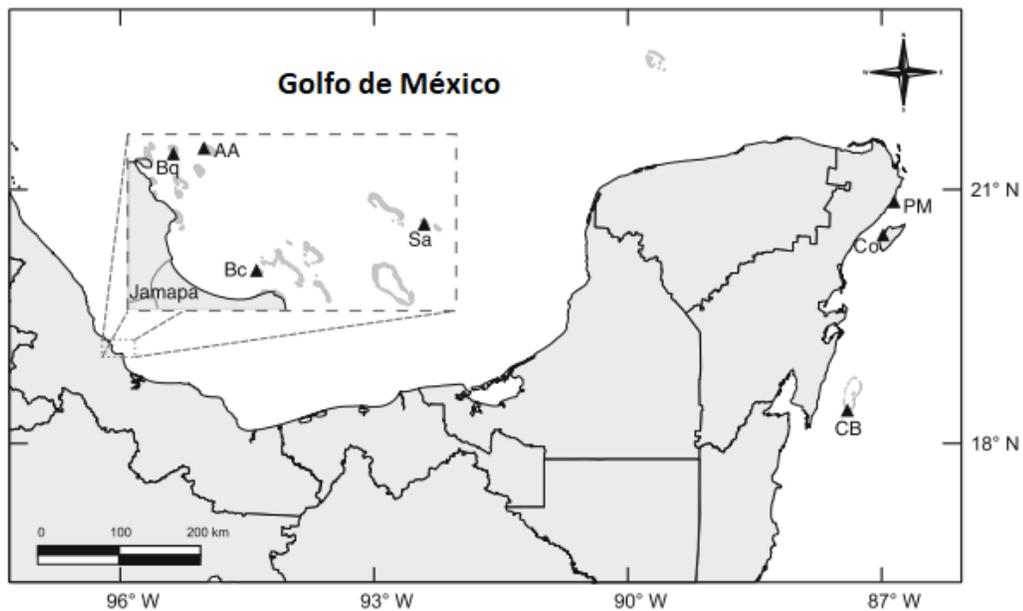
que las zonas con mayor conectividad y autorreclutamiento fueron las ubicadas en la bahía de Campeche (Campeche, sureste de Veracruz, centro de Veracruz y noreste de Veracruz). Los pares de zonas con mayor conectividad fueron dentro de la bahía de Campeche, con Campeche-Centro de Veracruz y Campeche-sureste de Veracruz, seguidas por centro de Veracruz-sureste de Veracruz, noreste de Veracruz-centro de Veracruz y noreste de Veracruz-Campeche, derivada de la retención larval ocasionada por el giro ciclónico de la zona (Figura 13). Quintana Roo, el sureste de Florida y el noroeste de Cuba fueron los sitios con menores cantidades de autorreclutamiento, debido a que la corriente de Lazo transporta a las larvas hacia el Océano Atlántico a través del estrecho de Florida de una manera rápida, evitando la probabilidad de asentamiento. Con esta simulación se determinó cuántos días mínimos y máximos son necesarios para realizar el transporte larval desde cualquiera de los 12 puntos del GM seleccionados. Se observó que un intervalo de entre 1-200 días era necesario para llegar de manera directa a cualquiera de los puntos. Indicando que puede existir una conectividad en todo el GM, mientras se tenga una DLP suficiente.



**Figura 13.** Rutas de dispersión de las partículas pasivas (representando larvas de *Panulirus argus*) liberadas desde una subpoblación de origen (conformado por datos tomados entre 2006-2010). Las partículas virtuales se liberaron entre marzo 21 hasta junio 18 (2006-2010), estas partículas tenían la capacidad de asentarse desde la edad de 140 días. El 100% corresponde al número máximo de posiciones en un área de aproximadamente 11 km<sup>2</sup>. La línea negra corresponde a la isobata de 200 m. Esquemas tomados y modificados de Lara-Hernández et al. (2019).

### 3.2.2 Determinación de conectividad genética en el GM

Existen trabajos con aproximaciones genéticas enfocados en la determinación de conectividad entre poblaciones de peces arrecifales, donde se ha observado cómo la dinámica oceánica puede afectar la interconexión entre diferentes zonas del GM. El estudio de Villegas-Sánchez et al. (2014) se enfocó en la conectividad de poblaciones del pez arrecifal *Stegastes partitus* (damisela bicolor). En este estudio se trabajó con muestras de siete arrecifes: tres localizados en el caribe mexicano (Banco Chinchorro, Cozumel y Puerto Morelos) y cuatro dentro del Sistema Arrecifal Veracruzano (Anegada de Adentro, Blanca, Blanquilla y Santiaguillo) (Figura 14).

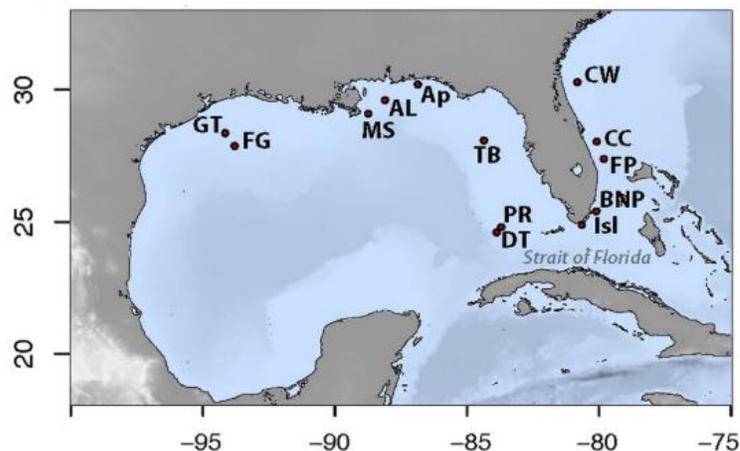


**Figura 14.** Ubicación de los siete arrecifes de coral en donde se colectaron los especímenes de *Stegastes partitus*. (CB) Banco Chinchorro; (Co) Cozumel; (PM) Puerto Morelos; (AA) Anegada de Adentro; (Bc) Blanca; (Bq) Blanquilla; (Sa) Santiaguillo. Mapa tomado de Villegas Sánchez et al. (2014).

Los datos obtenidos se analizaron: 1.- considerando dos regiones (región del caribe y región del Sistema Arrecifal Veracruzano); y 2.- considerando las 7 subpoblaciones, siendo estas cada uno de los arrecifes. Se comparó la estructuración genética con base en las frecuencias alélicas entre las poblaciones, utilizando microsatélites como marcadores moleculares. A partir del valor estadístico del  $F_{st}$  de Wright se evaluó la estructuración genética entre poblaciones. Este estadístico presenta valores entre el cero y uno, donde el cero indica que las poblaciones carecen de estructuración genética (las poblaciones son genéticamente homogéneas entre sí) y un valor de uno indica una estructuración genética máxima (las poblaciones son genéticamente diferentes entre sí). Se obtuvo que el valor entre regiones fue de un  $F_{st} = 0.011$ . Mientras

que en la comparación entre subpoblaciones se obtuvieron valores entre 0.008 a 0.059  $F_{st}$  (significativos estadísticamente). Se obtuvo que el valor de  $F_{st}$  pareado más bajo fue entre arrecifes de diferentes regiones (Anegada de Adentro y Puerto Morelos);  $F_{st}=0.008$ , y se observó que el valor más alto de estructuración se registró entre subpoblaciones de diferentes regiones: Banco Chinchorro y Santiaguillo ( $F_{st}=0.059$ ). Estos resultados indicaron la existencia de un grado de flujo genético entre regiones. Para explicar esto se evaluó el aislamiento por distancia, pero este salió no significativo, por lo que las diferencias entre los  $F_{st}$  se explicaron considerando la ubicación de cada subpoblación y la dinámica de dispersión. Se comprobó si existía la posibilidad de que una larva con una DLP de 30 días de viajar entre regiones. Para ello se utilizó una simulación que demostró que las larvas podrían viajar 1000 km (distancia aproximada entre estas dos regiones) en un período menor a los 25 días, utilizando como transporte la corriente de Lazo. Posteriormente para explicar la variación de  $F_{st}$  intra e inter-regiones, se argumentó que la cantidad de larvas que podrían viajar se vería disminuida por la mortalidad larval y la retención de los giros, con lo cual pocas larvas, o ninguna, podrían asentarse en cada uno de los arrecifes.

También se ha utilizado este enfoque en la especie invasora *Pterois volitans* (pez león), la cual ha aumentado su distribución desde el norte del GM con el paso del tiempo. Pérez-Portela et al. (2018) realizaron un muestreo en 13 localidades, esparcidas entre el norte del GM, noreste del GM y en el noreste del Atlántico (Figura 15), durante un periodo de 20 meses entre junio de 2013 y febrero de 2015.



**Figura 15.** Ubicación de los puntos de muestreo de especímenes de *Pterois volitans*. Puntos de colecta del noroeste del Atlántico: CW: Noreste de Florida. Florida; CC: Cabo Cañaveral. Florida; BNP: Parque Nacional del Biscayne. Florida; FP: Fort Pierce. Florida; Isl: Islamorada. Florida. Punto de colecta del Golfo de México: Dry Tortugas. Florida; PR: Pulley Ridge. Florida; TB: Tampa. Florida; Ap: Apalachicola. Florida; AL: Plataforma de Alabama. Alabama; MS: Delta de Mississippi. Alabama; FG: Flower Garden Banks. Texas; GT: Galveston. Texas. Mapa tomado y modificado de Pérez-Portela et al. (2018).

Los análisis poblacionales se realizaron a partir de la información de los marcadores moleculares SNP's (1,220 SNP's). Se observaron valores de  $F_{st}$  entre -0.03926 y 0.00136, dando sólo dos valores significativos 0.00211 (AL-Isl) y 0.00136 (AL-BNP), que fueron entre una localidad ubicada frente a la costa de Mississippi (AL) con dos localidades de la costa oeste de Florida (Isl y BNP). En general se observó homogeneidad genética entre las poblaciones del GM con las poblaciones del Atlántico. Para la explicación de esta situación los autores consideraron la información sobre esta especie. De acuerdo con la literatura, la invasión de esta especie inició en el Atlántico con un sólo evento de introducción en el ambiente. Dado esto, se hipotetizó que las poblaciones de pez león del GM son resultado de la dispersión de especímenes de generaciones posteriores a la de los especímenes introducidos, indicando la existencia de flujo genético entre las poblaciones muestreadas. Los autores indicaron que, aunque esta especie tiene una ventaja de supervivencia en el medio por no presentar ningún depredador natural y por realizar varios desoves durante todo el año, se debe considerar que esta homogeneidad podría cambiar al paso de las generaciones. Se cree que esta homogeneidad se debe principalmente a que esta especie tuvo una población efectiva inicial con un tamaño pequeño, lo que indica que en el *pool* genético no había gran diversidad genética por la poca cantidad de especímenes colonizadores en el inicio de la invasión. Adicionalmente, hay registros de que las poblaciones de esta especie (dentro del GM y el Atlántico) han sufrido cuellos de botella (disminución drástica de miembros de la población), lo que ha ocasionado la disminución de diversidad genética. Se concluye que, esta homogeneidad puede ser resultado de estas condiciones descritas anteriormente y no tan sólo por la capacidad de dispersión de la especie, pudiendo cambiar esta tendencia en lo futuro.

### 3.2.3 Dispersión colectiva de larvas y *sweepstakes reproductive success*

En organismos marinos, la dispersión de larvas a través de largas distancias se ha registrado con la presencia de fases larvales pelágicas de larga duración. Lo esperado en estos procesos de dispersión, es la generación de un alto grado de flujo génico a través de diversas escalas espaciales, la mezcla de larvas de diferente procedencia y la presencia de un alto grado de diversidad genética entre los *pools* larvales. Sin embargo, fenómenos como la dispersión colectiva y la estocasticidad ambiental, que puede afectar el éxito reproductivo (*sweepstakes reproductive success*), minimizan el efecto de mezcla, reducen la diversidad genética de los *pools* larvales y evitan la homogeneización genética entre diferentes sitios. La utilización de herramientas moleculares permite estudiar los fenómenos antes mencionados. Domingues et al., (2011) investigaron la estructura genética temporal y evaluaron la hipótesis *sweepstakes* en muestras larvas, en el estadio de desarrollo megalopa (última fase larvaria planctónica previa a la transición a la vida

adulta bentónica de los cangrejos) del cangrejo común *Carcinus maenas* (Linnaeus, 1758). Este organismo se caracteriza por presentar un ciclo de vida con estadio bentónico en su etapa adulta (habitando costas rocosas y zonas estuarinas), y una vida planctónica en aguas poco profundas en sus estadios larvales (DLP entre 4-6 semanas). Se muestrearon larvas de eventos de suministro larval (cada evento duró entre 3-5 días) ocurridos en la laguna costera Ría de Aveiro (noroeste de Portugal), durante marzo-junio de 2006 y 2007. En total muestrearon ocho eventos, cuatro por año, donde se registraron 2800 larvas en el año 2006 y 1106 larvas en el 2007, además se muestrearon especímenes adultos durante el verano de 2006 y 2007. Se genotiparon 10 microsatélites para realizar los análisis genéticos. En general la diferenciación genética global entre los eventos larvales fue muy baja (Global  $F_{st}=0.0003$ ) y no significativa ( $P=0.164$ ). Las comparaciones pareadas indicaron también valores bajos ( $-0.0017$  a  $0.0063$ ) y no significativos de  $F_{st}$ . Tampoco se encontró diferenciación genética entre los adultos y las larvas de los diferentes eventos ( $F_{st}$  entre  $-0.0007$  a  $0.0014$ ), ni parentesco entre los individuos muestreados. Los autores mencionaron que los resultados obtenidos no indican ninguna tendencia de variabilidad genética temporal ni estacional. También, que la inexistencia de parentesco entre las muestras, sugiere que las larvas provienen de una población efectiva muy grande. El hecho de no encontrar una reducción en la diversidad genética en las larvas y no encontrar parentesco entre los individuos muestreados, además de la homogeneidad genética presente entre adultos y larvas, sugiere que el fenómeno de *sweepstakes reproductive success* no afectó la diversidad genética de las larvas encontradas en los eventos de suministro larval. Concluyen que la homogeneidad observada indica la existencia de conectividad entre las poblaciones de *C. maenas*.

Riquet et al., (2017), estudiaron la dispersión colectiva a través de la comparación de la diversidad genética entre etapas larvales y postlarvales. Para esto, se utilizaron larvas, juveniles y adultos de la lapa zapatilla común, *Crepidula fornicata* (Linnaeus, 1758). El muestreo se realizó en la Bahía de Morlaix, Bahía de Brest y Bahía de Saint-Brieuc (Francia). Ellos muestrearon, en cada sitio, de tres a cuatro *pools* larvales, durante la temporada reproductiva (abril-septiembre), por tres años. Para obtener diferentes cohortes se muestrearon en intervalos de 4 meses. Los adultos y juveniles fueron muestreados durante diferentes temporadas del año (abril y enero, agosto, septiembre, respectivamente) durante 3 años (2006, 2007 y 2010). La información genética se generó a través del análisis de 16 loci micro satelitales. Se comparó la información genética entre *pools* de larvas con juveniles y adultos muestreados en el mismo año y sitio. Los resultados no mostraron reducción de diversidad genética de las larvas de cada evento reproductivo con respecto a los adultos. Mostraron existencia de heterogeneidad genética entre cohortes larvales sucesivas y de parentesco entre larvas y entre estadios juveniles, y la potencial existencia de larvas endogámicas. Los resultados indican que cada evento reproductivo es producido por un número limitado de reproductores, sin embargo, esto no reduce la diversidad genética en las poblaciones, ya que durante

toda la temporada reproductiva diferentes grupos de reproductores participan. Debido a que los *pools* larvales mostraron diversidades genéticas similares a los de los adultos, los autores indicaron la inexistencia de la influencia del efecto de *sweepstakes reproductive success*. En lo que respecta a la dispersión colectiva, ellos muestrearon larvas con parentesco, además de juveniles. Este hecho fue contrario a lo esperado, ya que *C. fornicata* presenta una duración larval de entre 2-4 semanas (14-28 días) o, si la temperatura del agua lo permite, hasta 7 semanas (49 días). Se sugirió que la mezcla de larvas en el tiempo de dispersión no era el óptimo, o que incluso podría deberse a un proceso de dispersión colectiva.

### 3.3 Justificación

La dispersión y conectividad larval son procesos que involucran la combinación de factores bio-físicos. Su estudio adecuado permite entender cómo la historia de vida de los organismos, al ser influenciada por los factores físicos (como la dinámica oceánica), aumenta o disminuye la conectividad entre poblaciones.

El estudio de la conectividad de especies con una estrategia de dispersión larval, hace posible la realización de planes de manejo eficientes en ámbitos de conservación y pesquerías. Permite entender cómo el ciclo de vida de los organismos es afectado por los procesos ambientales pelágicos y no sólo por los costeros. Además, esta información facilita la detección de las poblaciones conectadas entre sí, y la determinación de si su conectividad es unidireccional o bidireccional.

El GM se ha considerado un sistema con baja probabilidad de éxito de conectividad, para organismos con DLP cortas, debido a los eventos de retención larval ocasionados por las corrientes y giros presentes en las provincias. Estos eventos de retención hacen que la DLP sea un factor importante para disminuir o aumentar el éxito de conectividad entre provincias.

Dado que la dinámica oceánica del GM puede ser una limitante para la existencia de conectividad entre provincias, ya que puede influir de manera negativa en la dispersión larval. En este trabajo se evaluó si la dinámica oceánica afectaría la dispersión de un organismo, con una larga DLP, al grado de provocar la inexistencia de conectividad genética entre las provincias del GM.

Este trabajo es uno de los pocos que utilizan larvas en tránsito. Por lo que se obtuvo información sobre este estadio de vida, evidencia que indicara la existencia o inexistencia de dispersión colectiva y la

información genética disponible en *pools* larvales. La comparación de información genética de individuos en estadios tempranos de desarrollo y adultos, permitirá entender más sobre los procesos de conectividad de esta especie y de otras especies con historias de vida similares.

En este estudio, se contrastaron las frecuencias alélicas entre *pools* de larvas de múltiples ubicaciones alrededor del GM y peces adultos de *B. robinsi* del norte del GM. También se evaluó la diversidad genética en el grupo larval de *B. robinsi* y se probó si las larvas tendían a la mezcla o mostraban evidencia de dispersión colectiva. Finalmente, se evaluó la conectividad genética utilizando larvas y adultos de *B. robinsi* entre las provincias de Campeche, del oeste del GM, de la plataforma del noroeste de Florida y de la plataforma del suroeste de Florida, contrastando estos resultados con información registrada en literatura sobre simulaciones de dispersión larval.

### **3.4 Hipótesis**

Las características ecológicas y biológicas de *B. robinsi*, como lo son la amplia distribución de sus estadios adultos en la plataforma continental del GM, la capacidad de realizar múltiples desoves durante el año, y la presencia de larvas con una DLP amplia como estrategia de dispersión, son suficientes para que esta especie presente el potencial de dispersión necesario para generar mezcla larval y conectividad entre las provincias dinámicas lagrangianas del GM.

### **3.5 Objetivos**

#### **3.5.1 Objetivo general**

Evaluar la diversidad y estructura genética entre individuos en diferentes estadios de desarrollo (larvas y adultos) de *B. robinsi* ubicados en múltiples provincias del GM, para determinar tendencia de dispersión larval y la existencia de conectividad genética entre poblaciones de varias provincias dinámicas lagrangianas.

### 3.5.1.1 Objetivos específicos

Estimar la diversidad y estructura poblacional entre larvas y adultos de *B. robinsi* colectadas en cuatro provincias dinámicas lagrangianas (de Campeche, del oeste del GM, de la plataforma del suroeste de Florida y de la plataforma noroeste de Florida), a través del análisis de los marcadores moleculares SNP's.

Determinar la cantidad de clústeres genéticos existentes entre larvas y adultos de *B. robinsi* colectadas en cuatro provincias dinámicas lagrangianas, mediante el análisis de la diversidad de los marcadores moleculares SNP's.

Determinar la existencia de mezcla larval en el proceso de dispersión a través de la interpretación de datos de diversidad genética y la presencia de parentesco dentro de cada *pool* larval.

## 3.6 Metodología

### 3.6.1 Muestras de larvas y tejidos de adultos de *B. robinsi*

Se utilizaron las 105 larvas de *B. robinsi* muestreadas en el GM e identificadas a través del análisis de las secuencias COI (capítulo 2 de esta tesis). También se utilizaron 16 tejidos de adultos, empleando músculo y radios de aletas caudales con un tamaño aprox. de cm<sup>2</sup> (fijados en alcohol al 96%), los cuales pertenecieron a individuos muestreados en la plataforma continental de Florida. Estos tejidos fueron donados e identificados, molecularmente al analizar sus secuencias COI, por parte del FWC – *Fish and Wildlife Research Institute* (códigos de los tejidos donados: FSBC 23959, FSBC 24392, FSBC 24578, FSBC 24592, FSBC 25746, FSBC 25785, FSBC 25920, FSBC 26633, FSBC 26656, FSBC 28035, FSBC 28237, FSBC 32399 and FSBC 34057.) y el *Ocean Science Foundation*, Irvine CA.

## 3.7 Elaboración de librerías genómicas para el genotipado de SNP a través de la técnica de *Double digest restriction-site DNA (ddRADseq)* y secuenciación

La extracción de ADN se realizó mediante el uso del kit *Dneasy Blood and Tissue*. Para su ejecución se siguieron los pasos descritos en el manual del kit hasta el paso de la elución de ADN. En el paso de elución,

en vez de realizar una sola elución con el buffer AE, se efectuaron tres con los siguientes volúmenes: 20  $\mu$ l, 100  $\mu$ l y 200  $\mu$ l.

El ADN extraído se cuantificó mediante el fluorómetro *Qubit* (Thermo Fisher SCIENTIFIC, USA). La integridad y el peso molecular del ADN se evaluó mediante un gel de Agarosa-*Synergel Diversified Biotech* al 1%, el gel fue revelado a través del uso de un foto-transiluminador de luz UV.

La construcción de las librerías genómicas se realizó con el protocolo del *Double digest restriction-site associated DNA* (ddRADseq), descrito por Peterson et al., (2012). Este protocolo consiste en muestrear fracciones del genoma de múltiples individuos y obtener miles de SNPs a través del uso de dos enzimas de restricción. Se utilizaron las enzimas de restricción EcoRI (5' GAATTC) y MspI (5' CCGG).

Este proceso consiste en cinco pasos: 1.- La selección de ADN genómico; 2.- Doble digestión; 3.- Ligación de adaptadores, 4.- *Pooling* y selección de tamaño; 5.- Enriquecimiento de las librerías genómicas y anexión del index poblacional (Anexo B, C, D).

## 3.8 Análisis bioinformático

### 3.8.1 Análisis *De novo*: Identificación de loci y genotipado *In silico*

Las lecturas crudas con doble terminación (*Paired-end raw reads*) fueron analizadas y filtradas utilizando el software STACKS V2.0 (Catchen et al., 2011). Este software funciona con un algoritmo de máxima verosimilitud para identificar los polimorfismos en fragmentos de ADN (*RAD tags*). El algoritmo, al comparar los *RAD tags* de diferentes organismos, es capaz de determinar loci putativos con lo cual determina haplotipos.

El filtrado de calidad y la demultiplexación se realizó por medio de la función *process\_radtags*, tomando en cuenta un *Phred score* de 30 y un corte (*trimming*) de las últimas diez bases localizadas en la terminación de cada lectura y así determinar los *rad tags* de la librería (Anexo E). Los *rad tags* determinados se ensamblaron en loci putativos (*stacks*) por medio de la función *ustacks*. Se exploraron diferentes combinaciones de parámetros para ejecutar el *script* de *ustacks*, la combinación que generó una mayor cantidad de *stacks* fue la seleccionada: mínima profundidad de cobertura requerida para crear un stack

( $m$ ) = 5 y un máximo número de diferencias permitidas entre *rad tags* dentro de cada stack ( $M$ )=4 (Anexo E).

Los catálogos de los *rad loci* se construyeron con la función *cstacks*, con un parámetro de número de diferencias permitidas entre *rad tags* ( $n$ ) = 6. Los *rad loci* y SNP's se seleccionaron utilizando la función *population* y con los siguientes parámetros:  $-r = 90\%$ ,  $\text{min\_maf} = 0.05$  y  $-p = 1$ . Se debe mencionar que todas las muestras obtenidas se consideraron como una sola población, esto se realizó con el objetivo de efectuar un filtro más estricto de los SNP's resultantes. Los *rad loci* y los SNP's filtrados se exportaron en un archivo vcf.

El archivo vcf se cargó en el software VCFtools (Ambiente Linux) para realizar un filtrado de calidad utilizando un *script* basado en [www.ddocent.com/filtering/](http://www.ddocent.com/filtering/). Los parámetros utilizados fueron  $\text{--max-missing} = 0.5$  (excluye los loci que tengan una proporción de *missing-data* entre 0 – 0.5),  $\text{--mac} = 3$  (excluye a los loci con un conteo de alelos menor a tres),  $\text{--min DP} = 40$  (incluye a los loci con una profundidad media igual o mayor que 40) y  $\text{--maf} = 0.05$  (excluye a los loci con alelos con una frecuencia menor a 0.05) (Anexo F). Al final de todos los filtros, sólo se conservó la información genética de 66 individuos para lo posteriores análisis.

Para determinar a los loci en equilibrio de *Hardy-Weinber* (EHW) se utilizó el software R con la paquetería *pegas* y la función *hw-test*. Los niveles de significancia obtenidos de la prueba de Hardy Weinber se ajustaron con la prueba *False Discovery Rate* (FDR). Los loci en desequilibrio de ligamiento se detectaron con ayuda del software Tassel Versión V5.0 (Bradbury et al., 2007).

### 3.8.2 SNP's outliers

Para generar una base de datos construida con loci neutrales, la cual se utilizaría para inferir estructura poblacional y conectividad, primero se identificaron y filtraron loci que potencialmente pudieran estar sometidos bajo la fuerza evolutiva de la selección (loci *outliers*). Las muestras fueron separadas por regiones para su análisis. Para minimizar la posibilidad de obtener falsos positivos en la detección de loci *outliers* se realizaron dos pruebas. Una prueba basada con los  $F_{st}$  que se realizó con el software *Arlequin* (Excoffier y Lischer, 2010b) y otra utilizando un método Bayesiano realizado con el software Bayescan v2.1 (Foll y Gaggiotti, 2008). El análisis con el software Bayescan fue corrido con la parametrización por *default*: 5,000 iteraciones, 10 intervalos de calentamiento, 20 corridas piloto (cada una con 5,000 iteraciones).

### 3.9 Análisis genéticos poblacionales

Los individuos de *B. robinsi* que se mantuvieron en la base de datos, posterior a los filtros de calidad, se agruparon dentro de tres regiones (central, sur y norte) para el análisis de diversidad y estructura genética. Estas regiones se basaron en la delimitación de las provincias lagrangianas del GM descritas por Miron et al., (2017).

#### 3.9.1 Poder estadístico de la base de datos

Se estimó el poder estadístico de los loci finales para detectar niveles reales de diferenciación genética. Para esto se utilizó el método de simulación implementado por el software POWSIM 4.1; Powsim\_b (Ryman y Palm, 2006). Las simulaciones se realizaron con 1034 loci provenientes de 66 individuos de *B. robinsi*. Las corridas se realizaron con los valores de los parámetros predeterminados por el ejecutable: *dememorizations* = 1000, *batches* = 100 e *iterations per batch* = 1000, tomando en cuenta un escenario de tres subpoblaciones con una población efectiva ( $N_e$ ) de 2000 y una deriva génica de  $t = 4$ ,  $t = 10$  y  $t = 20$ . Se utilizó una prueba estadística de Chi cuadrada (1000 réplicas), y se determinó si la base de datos aporta la suficiente información para detectar valores mínimos de  $F_{st}$ :  $F_{st}=0.001$ ,  $F_{st}=0.0025$  y  $F_{st}=0.005$ .

#### 3.9.2 Diversidad genética y estructura genética

Con el software GenAlEx 6.5 (Peakall y Smouse, 2012) se calcularon los descriptores generales de diversidad genética de cada región: heterocigosidad observada ( $H_o$ ), heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) y coeficiente de endogamia ( $F_{is}$ ). Las distancias de  $F_{st}$  pareadas (Weir y Cockerham, 1984) basadas en las frecuencias alélicas entre regiones se calcularon con el software Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier y Lischer, 2010a). El nivel de significancia ( $\alpha = 0.05$ ) se ajustó después de múltiples pruebas de  $F_{st}$  pareado con el ajuste secuencial de Bonferroni (Rice, 1988).

#### 3.9.3 Determinación de clústeres genéticos

Se utilizaron dos enfoques (multivariado y bayesiano) para determinar la cantidad de clústeres genéticos que componen a las tres zonas delimitadas.

### 3.9.4 Análisis multivariados

#### 3.9.4.1 Análisis de Componentes Principales (ACP)

Cómo análisis exploratorio se utilizó el ACP, el cuál es una visión simplificada en dos dimensiones sobre la diversidad genética observada entre individuos y grupos de individuos. Para esto se utilizaron las paqueterías *ade4* versión 1.7 y *adeget* versión 2.15 del software R.

Antes de iniciar el ACP se utilizó la función *scaleGen* para reemplazar los *missing data* de los alelos muestreados por valores de la media de las frecuencias alélicas. El gráfico se elaboró con la función *plot* del software R utilizando los dos eigenvalores con el mayor porcentaje de varianza explicada.

#### 3.9.4.2 Análisis Discriminante de Componentes Principales (ADCP)

Para este análisis se utilizaron los datos a los cuales se reemplazó los *missing data* utilizando la función *scaleGen*. A diferencia del ACP, el ADCP se basa en la determinación *a priori* de la K (poblaciones). El ADCP es un método multivariado que se utiliza para inferir el número de clústeres de individuos genéticamente relacionados. En esta aproximación la varianza de una muestra es particionada en dos componentes (entre grupos y dentro de grupos) con el objetivo de maximizar la discriminación entre grupos. En un principio los datos son transformados usando un ACP para que posteriormente los clústeres sean identificados a través de un análisis discriminante.

Se trató de identificar el número más probable de poblaciones (para definirlo como una K *a priori*) aplicando el algoritmo de agrupamiento de individuos mediante la función *find\_cluster* de la paquetería *adeget* (Jombart y Ahmed, 2011) del software R, evaluado mediante el criterio bayesiano de información (BIC). Con este método no fue posible obtener un K *a priori*, por lo que se mantuvo la k=3 (centro, norte, sur).

Se realizó un análisis de los SNP's neutrales de las tres zonas determinadas. Para iniciar se ejecutó una validación cruzada con la función *xcalDapc*, con esta función se retuvieron los componentes principales (PC) suficientes para obtener la mayor varianza explicada. En total se retuvieron 20 PC y 2 eigenvalores

para las tres poblaciones definidas. A su vez se obtuvieron las probabilidades de asignación cada localidad, las cuales indicaron que tan precisa fue la asignación de los grupos genéticos.

### 3.9.5 Análisis bayesiano *Structure*

Se implementó un método Bayesiano por medio del programa *Structure* (Pritchard et al., 2000). Este es un modelo basado en *clustering*, el cual utiliza información de marcadores moleculares no ligados. Mediante este modelo es posible inferir la presencia de estructuración poblacional, la identificación de poblaciones genéticas y la asignación probabilística a una población o a la conjunción de dos o más poblaciones.

El modelo trabaja a partir de la distribución de probabilidad  $Pr(Z, P|X) \propto Pr(Z) Pr(P) Pr(X|Z, P)$ , donde se utilizan Cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) para inferir Z y P en base a las probabilidades a posteriori. Donde X denota a los genotipos de los individuos colectados, Z a las poblaciones de origen de los individuos y P representa las frecuencias alélicas en todas las poblaciones.

En la corrida se utilizó el modelo de *ADMIXTURE* (el cual considera que cada individuo posee en su genoma una fracción de cada una de las poblaciones existentes), con 100,000 MCMC de período de calentamiento, 200,000 MCMC para el análisis. En las corridas se utilizaron valores de K=1 hasta K=11. Esto se realizó para evaluar la posibilidad de la existencia de varios clústeres entre dos y 10 (cada valor fue corrido por quintuplicado).

El número más probable de poblaciones se identificó con el método de  $\Delta K$  (Evanno et al., 2005), implementado en el sitio web *Structure Harvester* (<http://taylor0.biology.ucla.edu/-structureHarvester/>). Los resultados se graficaron con el software CLUMPAK (Kopelman et al., 2015).

### 3.9.6 Determinación de parentesco

Se realizó un análisis de parentesco con los 66 individuos. Se utilizó el software *COLONY* para determinar la existencia de parentesco de primer grado (hermanos o medios hermanos). Los parámetros fueron un *mating system* -1 de poligamia para hembras y machos, *mating system* -2 sin endogamia, especie dioica y diploide, además de utilizar un análisis de *Full-likelihood*, número de descendientes en la muestra = 66., número de corridas = 5, tamaño de la corrida = *Long* y frecuencia alélica = *unknow*. Para complementar la

información obtenida con el *COLONY*, se utilizó el software de *VCFTools* y la herramienta *relatedness* (Manichaikul et al., 2010). El resultado se graficó con la paquetería *ggplot2* del software R.

### 3.10 Resultados

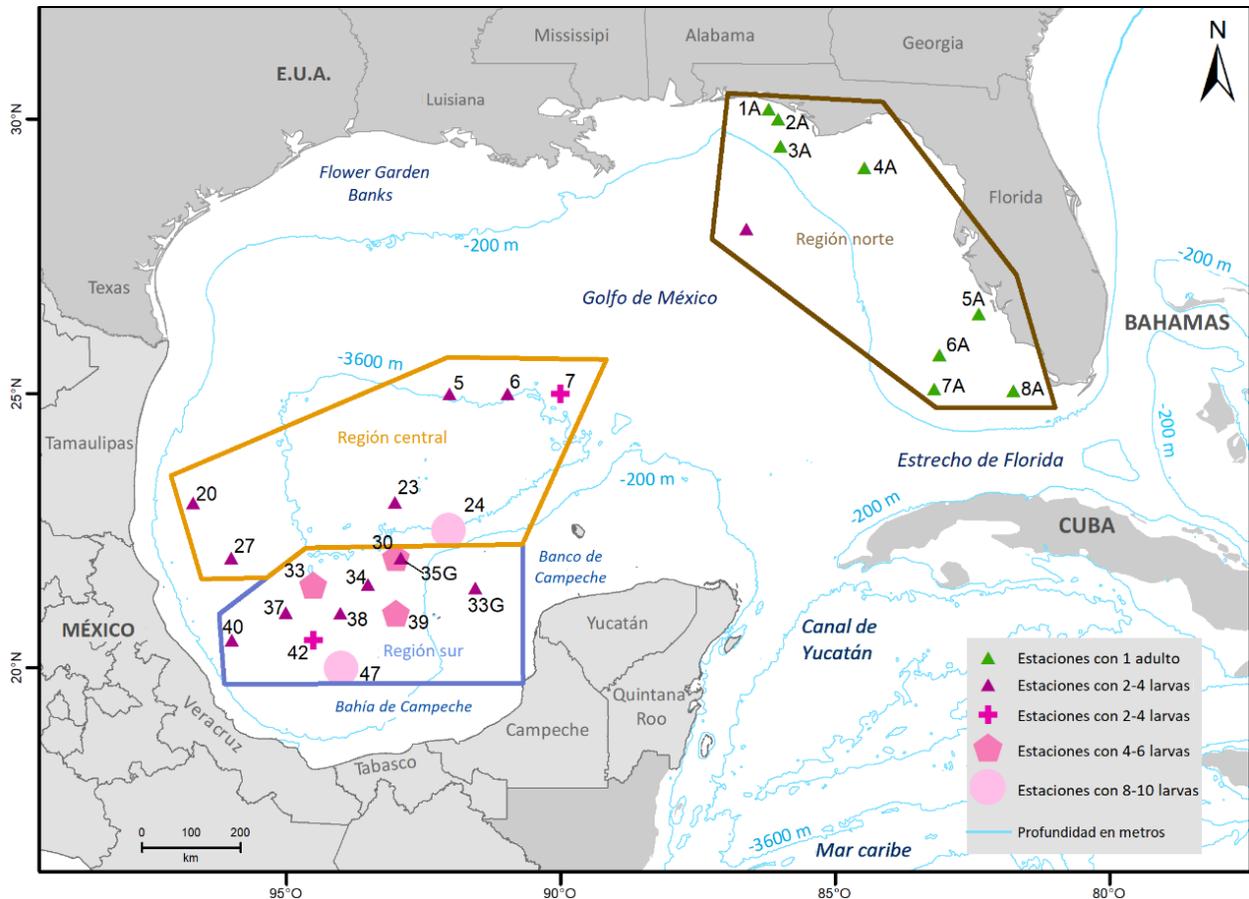
Un total de 105 larvas (Tabla 3) en diferentes estadios de desarrollo (preflexión, flexión y postflexión) y 16 tejidos de adultos, 76 individuos y 11,912 loci pasaron los filtros de *stacks*. Posterior a los filtros realizados en el software *VCFTools* 1,140 loci y 66 individuos fueron retenidos. Todos los loci determinados fueron neutrales (ninguno fue *outlier*), mientras que 97 fueron eliminados por presentar una desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg significativa. Nueve pares de loci presentaron un desequilibrio de ligamiento significativo, por lo que un locus de cada par fue eliminado.

**Tabla 3.** Valores medios y desviación estándar de N=No. De organismos, Na=No. de alelos diferentes, Ne=No. Efectivo de alelos, Ho=Heterocigosidad observada, He=Heterocigosidad esperada y Fis=índice de fijación de cada una de las regiones determinadas para las muestras de larvas y adultos de *B. robinsi* (central, norte y sur).

Región		N	Na	Ne	Ho	He	Fis
Central	Media	18.659	1.973	1.391	0.250	0.249	-0.008
	SD	0.017	0.005	0.009	0.005	0.005	0.007
Norte	Media	7.670	1.833	1.380	0.255	0.238	-0.070
	SD	0.017	0.012	0.010	0.007	0.005	0.010
Sur	Media	38.385	1.998	1.396	0.253	0.255	0.003
	SD	0.023	0.001	0.009	0.005	0.004	0.005

Un total de 1,034 loci provenientes 66 individuos pasaron los filtros del ddRAD y fueron utilizados para los análisis bioinformáticos: XIXIMI-04 = 55 LARVAS, GOMECC-3 = 3 larvas y de tejidos donados = 8 adultos. Estos individuos fueron separados dentro de las tres regiones: sur = 39, central = 18 y norte = 9 (Figura 16). Se registraron *missing data* en la base de datos final. En los datos de la región sur se registró el 12% de *missing data* en 18 loci; en la región central hubo 20% de *missing data* en 31 loci; en la región norte se registró el 12% de *missing data* en 282 loci, 25% de *missing data* en 25 loci y 37% *missing data* en tres loci.

Se registró que el valor medio de *missing data* en cada individuo fue de 1.91% (con un valor mínimo = 0.19% y un valor máximo de 15.86%).



**Figura 16.** Mapa con la distribución de las larvas y adultos de *Bothus robinsi* utilizados en la elaboración de librerías genómicas. Estaciones con un solo número, son larvas que pertenecen al cruce del XIXIMI-04. Estaciones con una G en su número, son larvas que pertenecen al cruce del GOMECC-3. Estaciones con una A son localidades donde se realizó el muestreo de un adulto. Estaciones con color azul indica que utilizaron entre 1-2 larvas o adultos; color amarillo entre 5-6 larvas; color anaranjado indicar entre 5-6 larvas; color rojo entre 7-10 larvas.

### 3.10.1 Análisis genéticos

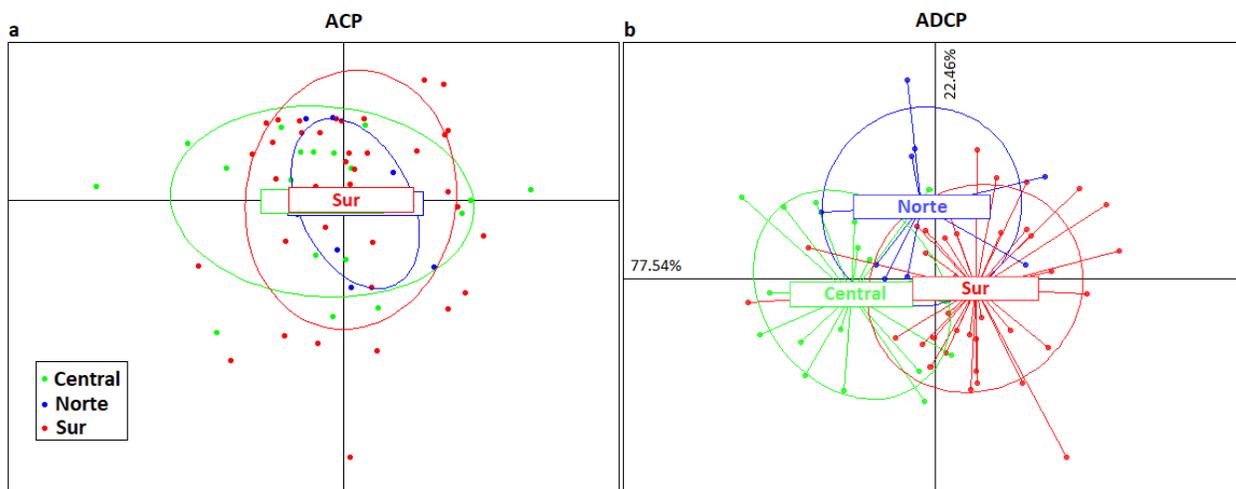
Las simulaciones realizadas en POWSIM sugirieron que la base de datos posee el suficiente poder estadístico para detectar valores de  $F_{st}$  de 0.0025 (Chi cuadrada = 0.907; poder del 92.70%), 0.0050 (Chi cuadrada = 1; poder del 100%) y 0.0099 (Chi cuadrada; poder del 100%).

### 3.10.2 Diversidad genética

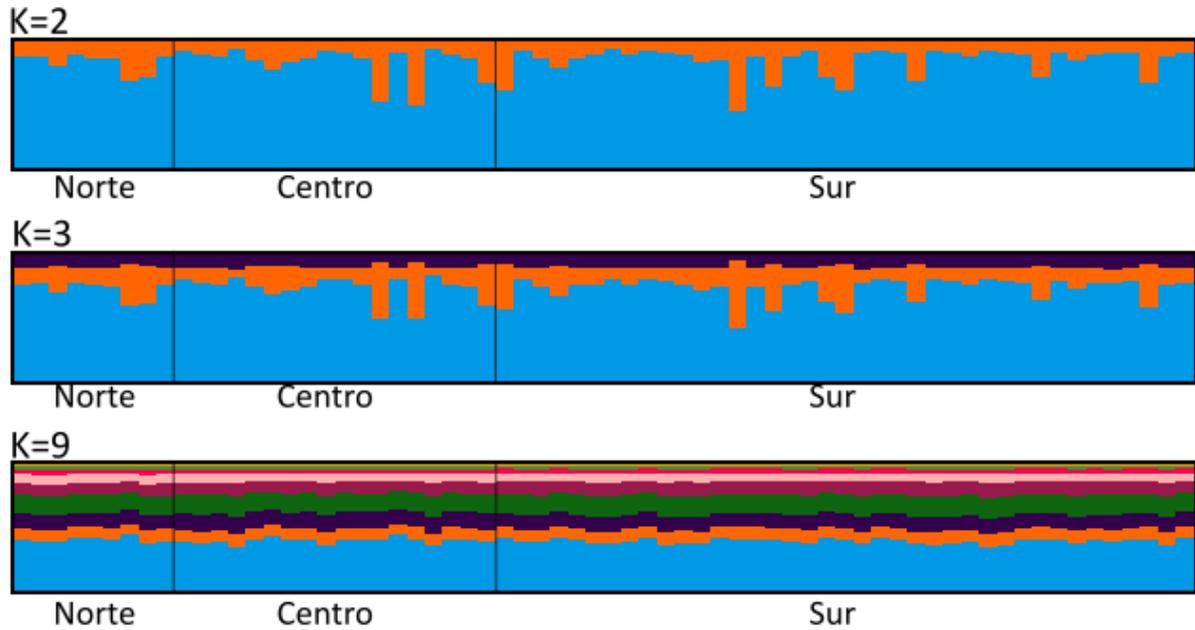
La diversidad genética ( $H_e$ ) fue similar en las regiones, con valores desde el 0.238 hasta el 0.255; de la misma manera, el número de alelos efectivos fue similar entre las tres regiones con una variación entre 1.38 – 1.39 (Tabla 4). La región central y región norte mostraron valores ligeramente más altos de  $H_o$  en comparación con los valores de  $H_e$ , además de presentar valores negativos de  $F_{is}$  (Tabla 4). En la región norte, 97.78% de los loci estaban en EHW ( $p$ -value = 0.07 - 1), el 97.1% en la región central ( $p$ -value = 0.06 - 1) y el 98.36% en la región sur ( $p$ -value = 0.06 - 1). Los valores de  $F_{is}$  fueron cercanos a cero (desde el -0.07 hasta 0.003) (Tabla 4).

Los estadísticos de  $F_{st}$  pareados calculados fueron: 0.028 entre la región sur y central ( $p$ -value = 0.197), 0.049 entre la región sur y norte ( $p$ -value = 0.108) y 0.068 entre la región central y norte ( $p$ -value = 0.067). Ninguna comparación de  $F_{st}$  fue significativa ( $p > 0.05$ ), sugiriendo la inexistencia de estructura genética.

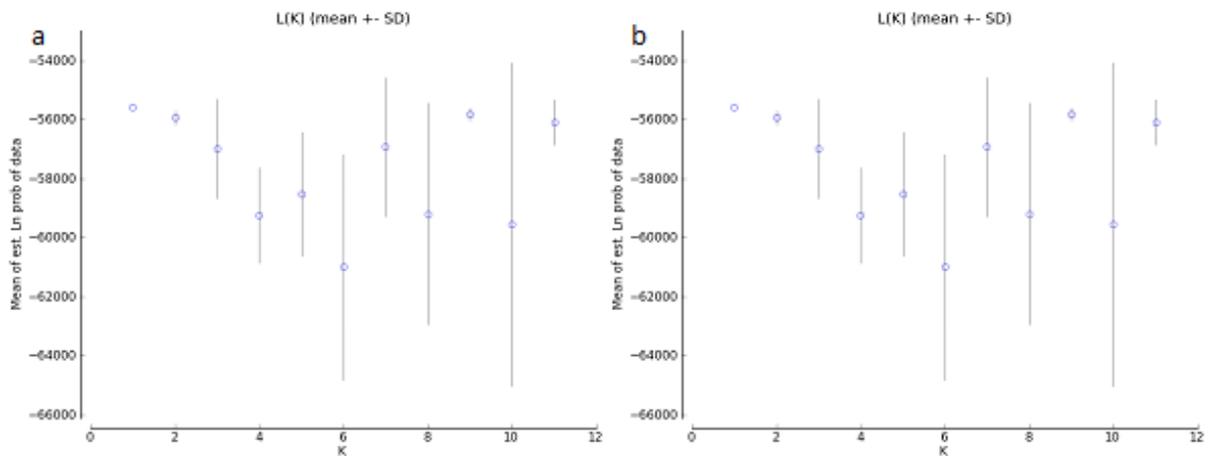
El ACP y el ADCP mostraron resultados similares, los cuales fueron congruentes con respecto a los análisis de  $F_{st}$ . El primer y segundo eje del ACP (CP1, 49.67% de la varianza; CP2, 48.62% de la varianza) mostraron que todos los individuos pertenecían a un clúster genético (Figura 18). El ADCP se generó basándose de 20 CP. Los dos CP retenidos (CP1, 77.53%; CP2, 22.46%; reteniendo una proporción de la varianza de 0.426) mostraron la existencia de un clúster genético (Figura 17).



**Figura 17** Gráfico de ACP y ADCP obtenido a partir de 1,034 SNPs neutrales. (a) Los puntos dentro del gráfico de ACP representan a los individuos de *Bothus robinsi* (66) provenientes de las tres regiones muestreadas en el Golfo de México; (b) Gráficos de ADCP representan a los individuos de *Bothus robinsi* (66) provenientes de las tres regiones muestreadas en el golfo de México.



**Figura 19.** Gráficas de asignación a clústeres genéticos de *Bothus robinsi* muestreados en el golfo de México y divididos en tres zonas (centro, norte y sur), utilizando la información de los SNP's genéticos filtrados.



**Figura 18.** Valores de la media la Log de la verosimilitud para cada valor de K. Valor óptimo de clústeres detectados de acuerdo con la prueba estadística de  $\Delta K$  ( $k=9$ ).

El agrupamiento a partir del método bayesiano, utilizando el software *Structure*, arrojó resultados similares al ACP y al ADCP. De acuerdo con el estadístico de  $\Delta K$ , se determinó que el número óptimo de clústeres genéticos (K) fue de nueve ( $K = 9$ ) (Figura 18). Sin embargo, el Log-verosimilitud para K(LK) no fue consistente con el  $\Delta K$ , ya que los valores de Log-verosimilitud no presentaron la resolución necesaria para

estimar un valor claro de  $K$  (Figura 18). En el diagrama obtenido a partir de *Structure*, se registró homogeneidad en las probabilidades de asignación a  $K = 2$ ,  $K = 3$  y  $K = 9$  (Figura 19). Sugiriendo la existencia de un clúster genético

### 3.10.3 Determinación de parentesco

Se realizó una evaluación de parentesco con un método de verosimilitud total implementado en *COLONY*. Se estimaron tres posibles pares de medios hermanos, pero los valores de probabilidad fueron muy bajos (0.021, 0.001 y 0.001), lo que indica la inexistencia de hermanos completos o medios hermanos entre los individuos muestreados.

## 3.11 Discusión

Los descriptores de diversidad genética fueron similares entre las tres regiones muestreadas. La similitud entre los valores de heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), indicó que el conjunto de los organismos muestreados presentó la  $H_e$  esperada para una población con apareamientos al azar. De igual manera se evidenció la inexistencia de endogamia en las regiones, al observarse valores de  $F_{is}$  cercanos a cero.

Las tres regiones presentaron frecuencias alélicas parecidas, esto se evidenció al obtener valores no significativos de  $F_{st}$ . Esta homogeneidad genética se reflejó en los gráficos del ACP y ADCP, con lo que se determinó la existencia de un clúster genético. Resultados de  $F_{st}$  similares (-0.040 hasta 0.013; no significativos) a los reportados, se han registrado en subpoblaciones del *P. volitans* (DLP ~ 25-35 días) ubicadas en el norte del GM (Louisiana, Mississippi y Florida) y el oeste del Atlántico. Estas subpoblaciones fueron consideradas como una población genéticamente homogénea (Pérez-Portela et al., 2018).

Se evaluó si *B. robinsi* presenta una dispersión colectiva. Las larvas muestreadas no presentaron un parentesco, incluso en estaciones donde se registraron múltiples larvas en una misma etapa de desarrollo. La falta de parientes de primer y segundo grado, la ausencia de signos de endogamia dentro de cada región, además de la existencia de homogeneidad genética entre todas las regiones sugiere la inexistencia de un comportamiento de dispersión colectiva. En el estudio de la lapa zapatilla (*Crepidula fornicata*), Riquet et al., (2017) observaron un posible escenario de dispersión colectiva. Ellos registraron larvas con

parentesco (hermanos y medios hermanos) dentro de un mismo *pool* larval, además de observarse diferenciación genética entre *pools* larvales. Estos datos sugieren que las larvas provenían de un tamaño de población efectivo o habían sido sometidos a la influencia del *sweepstake reproductive success*.

Debido a que las larvas de *B. robinsi* no estaban emparentadas y a que se encontraban en diferentes estadios de desarrollo, se infirió que los *pools* larvales (dentro de las regiones) son una representación de diferentes cohortes larvales y sitios de desove. Lo anterior se atribuye al alto potencial de dispersión de las larvas de *B. robinsi* atribuido a su amplia DLP. Se ha registrado que una DLP entre 4-6 meses, permite altas tasas de mezcla larval a lo largo de cientos de kilómetros, lo que reduce los efectos del *sweepstake reproductive success* (Ottmann et al., 2016). Con lo que se concluye que *B. robinsi* presenta un alto grado de mezcla larval en su etapa de dispersión.

Los resultados de los análisis poblacionales (*Fst*, ACP, ADCP y *Structure*) indicaron una falta de estructuración genética y la existencia de homogeneidad genética entre *pools*, lo que evidencía la existencia de una población de *B. robinsi* abierta, la cual presenta un alto grado de conectividad dentro del GM. Las larvas de *B. robinsi* presentan una distribución vertical en la capa superior de los 100 m de profundidad (Evseenko, 2008b; Garbini et al., 2014), por lo tanto, su dispersión es influenciada por las corrientes superficiales (0-200 m). No se encontró evidencia de la existencia de un alto grado de autorreclutamiento derivado de los mecanismos de retención superficial reportados para la bahía de Campeche (Díaz-Flores et al., 2017; Lara-Hernández et al., 2019; Sanvicente-Añorve et al., 2014).

Sin embargo, los resultados obtenidos indican que la bahía de Campeche es una zona con un gran potencial de conectividad entre poblaciones cercanas (Veracruz, Tabasco y Campeche; subpoblaciones localizadas en la provincia de Campeche y la bahía de Campeche) para organismos con una DLP entre 4-7 meses, como lo han sugerido otros estudios (Lara-Hernández et al., 2019; Sanvicente-Añorve et al., 2014). Estos resultados resaltan la complejidad existente en la dinámica de los procesos meta poblacionales que se desarrollan dentro de una región como ésta. Estos procesos pueden ser explicados con la importación/exportación y autorreclutamiento que puede variar a través de los años, los cuales crean diferentes escenarios de dispersión dependiendo de factores como la temporada de desove y la DLP.

El alto potencial de conectividad, por transporte larval encontrado en la bahía de Campeche, es resultado de la combinación de las corrientes causadas por el giro ciclónico en la bahía, y el cambio estacional en las corrientes que se encuentran sobre la plataforma continental occidental de Veracruz y Tamaulipas (Lara-Hernández et al., 2019; Sanvicente-Añorve et al., 2014). La circulación superficial sobre la plataforma

continental occidental, presenta variaciones estacionales impulsadas por la dinámica de los vientos. Esto provoca un desplazamiento de las corrientes hacia el noroeste en primavera y verano (marzo a agosto), o al sureste en otoño e invierno (septiembre a febrero) (Sanvicente-Añorve et al., 2014). Esta circulación mantiene a las larvas dentro de la estrecha plataforma occidental y las transporta hacia el sureste (Bancos de Campeche) o el noroeste (*Flower Garden Banks*). Adicionalmente, las larvas pueden ser transportadas hacia el norte de las aguas oceánicas (por la influencia del giro ciclónico de bahía de Campeche), a través de un área de confluencia entre aguas neríticas y oceánicas, la cual está ubicada sobre el borde occidental del Banco de Campeche. El giro ciclónico mantiene a las larvas en la bahía de Campeche hasta su incorporación a la plataforma de Campeche o su posible expulsión hacia otras provincias del GM (Lara-Hernández et al., 2019; Sanvicente-Añorve et al., 2014).

Los valores más altos de conectividad potencial entre subpoblaciones del GM se han reportado dentro de la bahía de Campeche: Campeche-centro de Veracruz y Campeche-sur de Veracruz, seguidos por centro de Veracruz-sur de Veracruz, norte de Veracruz-centro de Veracruz y norte de Veracruz-Campeche (Lara-Hernández et al., 2019). La dinámica oceánica de la bahía de Campeche, en combinación con el alto potencial de dispersión y los múltiples eventos de desove de *B. robinsi* potencian la posibilidad de mezclar cohortes en la dispersión, homogeneizando frecuencias alélicas dentro de los *pools* larvales. Además, su larga DLP hace posible que grupos de larvas atrapadas dentro del giro ciclónico tengan una mayor posibilidad de asentarse en la plataforma continental dentro o fuera de la bahía de Campeche (Lara-Hernández et al., 2019). La simulación de dispersión larval de *P. argus* también mostró que la bahía de Campeche existen los valores más altos de auto-reclutamiento dentro del GM (norte de Veracruz .711%; centro de Veracruz 1.736%; sur de Veracruz 1.179%; Campeche 4.451%)(Lara-Hernández et al., 2019).

Los resultados registrados en estudios previos donde realizaron simulaciones de dispersión larval de *P. argus* (DLP = 4-7 meses) y pargo rojo (*Lutjanus campechanus*; DLP=31 días) sugieren que podría existir conectividad bidireccional entre Florida y la bahía de Campeche para *B. robinsi* (DLP= aproximada de 5-12 meses) (Evseenko, 2008b; Johnson et al., 2013). En las simulaciones de dispersión larval de *P. argus* y *L. campechanus* se observó una conectividad potencial entre los sitios ubicados en la bahía de Campeche (norte de Veracruz, sur de Veracruz, centro de Veracruz) y Campeche y los sitios de Florida (norte de Florida, centro de Florida y sur de Veracruz) (Lara-Hernández et al., 2019). Las características biológicas de *B. robinsi* (ubicaciones de las subpoblaciones y DLP) son suficientes para que esta especie genere patrones de dispersión similares a las de *L. campechanus* y *P. argus*.

Se debe recalcar que la conectividad directa entre la bahía de Campeche y Florida, no es la única forma en que pudiera darse el intercambio de genes. El intercambio indirecto de genes, entre todas las provincias y subpoblaciones del GM, es posible si se considera un escenario en donde cada una de las subpoblaciones del GM presenten conectividad con otros sitios vecinos, creando conectividad a lo largo de múltiples generaciones e incrementando el intercambio de genes a través de un modelo de *stepping-stone* (Compaire et al., 2021; Díaz-Flores et al., 2017; Lara-Hernández et al., 2019; Maruyama, 1970; Sanvicente-Añorve et al., 2014). Tomando en cuenta esto, se podría inferir que la bahía de Campeche funciona como una fuente de larvas, las cuales son capaces de asentarse en casi cualquier sitio dentro del GM.

Otro escenario que puede explicar la homogeneidad genética entre las regiones del GM, es el que considera la existencia de un sólo grupo larval para el GM. Esto se puede inferir al considerar las simulaciones de dispersión larval, junto a la DLP amplia de *B. robinsi*, demuestran que las larvas pasan el tiempo suficiente en las aguas oceánicas para incrementar el proceso de mezcla de larvas de diferentes sitios de desove dentro del GM. Con esta información se infiere que distintas cohortes de larvas provenientes de la bahía de Campeche, Florida, Quintana Roo, Texas y *Flower Garden Banks* pueden contribuir en los *pools* larvales de las regiones central y sur. Esta mezcla de larvas de diferentes áreas podría explicar la homogeneidad genética encontrada en las muestras obtenidas. A partir de esto, se sugiere que esta mezcla larval ocurre en todo el GOM, generando la existencia de un *pool* larval y la homogeneización genética en el GM.

Estos resultados, indican que *B. robinsi* tiene las características biológicas suficientes para evitar la influencia de las zonas de retención derivada de la dinámica oceánica. Además, este estudio confirmó la homogeneidad genética entre larvas y adultos entre las larvas de *B. robinsi* de la bahía de Campeche, aguas oceánicas de la región central del GM y Florida, lo que indica un alto grado de conectividad genética y la existencia de una sola población panmítica.

### 3.12 Conclusión

El estudio de la conectividad genética de *B. robinsi* permitió detectar la homogeneidad genética entre las tres regiones muestreadas, por lo que se determinó la existencia de flujo genético entre provincias. Esta conectividad es el resultado de la combinación de los factores biológicos y ecológicos de *B. robinsi*, los cuales son la distribución en toda la plataforma continental de los estadios adultos, la DLP y la capacidad de realizar varios desoves al año, los cuales hacen posible la dispersión de larvas entre todas las provincias

ubicadas dentro del GM. Esto permite que todas las poblaciones de esta especie presenten una conectividad directa o indirecta, provocando la existencia de un clúster genético, dando como resultado una población panmíctica.

La tendencia de *B. robinsi* es la mezcla de sus larvas en su etapa de tránsito. Debido a su amplia DLP, las larvas pueden sobrevivir el tiempo suficiente dentro de las corrientes de aguas oceánicas, permitiendo que los individuos de diferentes subpoblaciones del GM se mezclen. Lo anterior permite que el acervo genético de los grupos larvales sea diverso, el cual puede ser repartido a todas las subpoblaciones del GM, permitiendo la homogeneización genética.

Estos resultados corroboran la amplia representación de *B. robinsi* dentro del GM, el amplio potencial de dispersión de esta especie, y el potencial para considerarse un indicador biológico de conectividad. Sin embargo, aún es necesario realizar más estudios enfocados en generar información ecológica de la especie, como son: los picos de desove, la distribución, abundancia de larvas en diferentes temporadas del año, entre otros. Esta información permitirá realizar interpretaciones sobre la variación estacional dispersión larval, y obtener estudios más detallados de conectividad de esta y otras especies con un ciclo de vida similar dentro del GM.

A partir de este capítulo se elaboró el artículo:

Morales-Pulido, J. M., Munguia -Vega, A., Jiménez-Rosenberg, S. P. A., Rocha-Olivares, A y Galindo-Sánchez, C. E. (2023). Genetic connectivity in Twospot flounder (*Bothus robinsa*) across the Gulf of Mexico, inferred with single nucleotide polymorphisms from larvae and adults. *Frontiers in Marine Science*, 10(January), 1-11. <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1070483>

## Capítulo 4. Discusión general

---

La falta de claridad en la identificación morfológica de las larvas de peces es una problemática que se extiende en diversas especies (Batta-Lona et al., 2019; Díaz-Viloria et al., 2013; Evseenko y Nadtoke, 2003; Evseenko, 2008b; Morales-Pulido, 2017). Es por esto que estudios acerca de registros faunísticos, registros de frecuencia de ocurrencia, distribución, entre otros, que estén basados en la identificación morfológica de especies sin caracteres diagnósticos, reducen su precisión (Morales-Pulido, 2017).

En estudios previos, se ha comprobado que *B. ocellatus* y *B. robinsi* (en sus estadios larvales) no pueden ser diferenciadas (Evseenko y Nadtoke, 2003; Evseenko, 2008b; Morales-Pulido, 2017). Por lo anterior, en este estudio la utilización de herramientas moleculares de identificación fue necesaria. Con la aplicación de la identificación molecular se obtuvo el primer registro preciso de distribución y abundancia de las larvas de *B. ocellatus* y *B. robinsi* muestreadas en la bahía de Campeche, el este, el centro y el noreste del GM, durante el verano.

La robustez de la información obtenida en el registro de la distribución y abundancia de *B. ocellatus* y *B. robinsi* es importante, ya que garantiza que exista una mayor precisión en los estudios ecológicos e interpretaciones sobre la historia de la vida. Los resultados de distribución geográfica de las larvas de ambas especies, son congruentes a lo esperado con la distribución mostrada por sus adultos dentro del GM (toda la plataforma continental), la capacidad de reproducción de las especies (múltiples desoves durante todo el año), la presencia de larvas (de ambas especies) durante todo el año y la capacidad de dispersión de las larvas (DLP mayor a 4 meses) (Evseenko, 2008b; Houde et al., 1979).

Los resultados de frecuencia de ocurrencia y de la abundancia larval de este estudio contrastaron con los registros de abundancia previos que se basaron en la identificación morfológica (Espinosa-Fuentes et al., 2013; Flores-Coto et al., 1991, 2009; Sanvicente-Añorve et al., 1998, 2000). Lo anterior se observó al registrar una mayor frecuencia de ocurrencia y abundancia larval para *B. robinsi*, en zonas donde sus registros previos eran mínimos o inexistentes, en comparación con lo registrado para larvas de *B. ocellatus*. Esto es importante, ya que esto es una evidencia que sugiere que los registros realizados en otras zonas del GM, en otras estaciones del año y que se hayan basado en la identificación morfológica puedan presentar un sesgo por una incorrecta identificación.

Como se menciona en los capítulos anteriores, desde el punto de vista de las corrientes oceánicas, la tendencia del GM es generar zonas con un grado de aislamiento, las cuales se denominan como provincias

(Lara-Hernández et al., 2019; Miron et al., 2017). Sin embargo, de acuerdo con las simulaciones de dispersión de partículas pasivas (que simulan ser larvas en tránsito), existe la posibilidad de que estas partículas sean dispersadas a diferentes provincias del GM, si presentaban la DLP suficiente (Lara-Hernández et al., 2019; Miron et al., 2017). Este es el caso de *B. robinsi*, ya que es una especie con gran distribución dentro del GM, y con un amplio potencial de dispersión derivada de DLP (Evseenko, 2008b; Houde et al., 1979).

Es importante mencionar que la utilización de larvas y adultos para este estudio, ayudó a responder preguntas sobre la dispersión de las larvas de *B. robinsi*. Siendo, además, uno de los primeros trabajos donde se analizan los marcadores tipos SNPs en larvas de peces (Ottmann et al., 2016; Riquet et al., 2017). El análisis de SNPs, permitió determinar la existencia de diferentes escenarios de conectividad entre los que se encontraba la existencia de un *pool* larval para todo el GM. La información genética obtenida en este trabajo, a partir de los *pools* larvales, indicó diversidad genética, además de la homogeneidad genética entre los *pools* larvales de diferentes provincias. Esto indica que las larvas en su etapa de dispersión presentan una DLP suficiente para que sus larvas se mezclen y que se forme un solo *pool* larval para todo el GM (Compaire et al., 2021; Díaz-Flores et al., 2017; Lara-Hernández et al., 2019; Maruyama, 1970; Sanvicente-Añorve et al., 2014). Al observar que los *pools* larvales (sur y centro del GM), mostraron homogeneidad genética con los adultos muestreados (noreste del GM) se determinó que dentro del GM existe una población panmítica de *B. robinsi*. Lo anterior es importante, ya que comprueba fuertemente la existencia de conectividad entre poblaciones de *B. robinsi* entre provincias del GM.

## Capítulo 5. Conclusión general

---

En este trabajo las herramientas moleculares fueron utilizadas para resolver los retos que involucraba el estudio de la conectividad de *B. robinsi*. Uno de los retos fue el hecho de trabajar con una especie que presentaba registros sesgados de abundancia y distribución geográfica dentro del GM, los cuales eran ocasionados por la imposibilidad de identificar morfológicamente a sus larvas. Con las herramientas moleculares, fue posible generar información precisa sobre la distribución y abundancia larval. Siendo los primeros registros larvales basados en identificación molecular de *B. robinsi*, que abarcan al sur, el centro y noreste del GM; los cuales servirán como información base para futuros estudios ecológicos.

Con la información sobre la distribución y ocurrencia larval, la historia de vida de *B. robinsi* e información sobre la dinámica oceánica, se logró realizar las primeras interpretaciones sobre cómo funcionaba la conectividad de esta especie dentro del GM. Sin embargo, para generar una visión más completa de este proceso, fue necesario complementar este trabajo con información genética, a partir del análisis de marcadores nucleares SNPs.

Se enfatiza que este es uno de los pocos trabajos que han utilizado larvas en tránsito, las cuales fueron identificadas molecularmente y que posteriormente fueron utilizadas para el estudio de su conectividad genética. Es por lo anterior, que se logró determinar la inexistencia de una dispersión colectiva larval, concluyéndose de esta manera que la dinámica oceánica influye de manera positiva a la dispersión larval de *B. robinsi*, propiciando la mezcla entre larvas de diferentes provincias, provocando la existencia de un sólo *pool* larval. Además, se concluyó que este *pool* larval único influye en todos los acervos genéticos poblacionales, propiciando la existencia de una población panmíctica.

Las interpretaciones realizadas sobre la conectividad de este organismo, ayudará a entender cómo la dinámica oceánica del GM afecta a organismos con características de distribución y dispersión similares a las de *B. robinsi*. Uno de estos casos sería el de la langosta espinosa (*Panulirus argus*), que, de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, este organismo presenta el potencial de dispersión necesario para generar homogeneidad genética entre sus poblaciones.

Cabe destacar que *B. robinsi* podría fungir como bioindicador de conectividad, debido a que es un organismo que presenta conectividad genética ente provincias y una ocurrencia en varias provincias del GM (incluso se podría hipotetizar que en todas las provincias del GM). Aunque, sus larvas no pueden ser

identificadas morfológicamente (la cual es una característica no deseada para un bioindicador), estos organismos aún podrían utilizarse como bioindicadores si se identifican molecularmente.

Con este trabajo, se plantean las bases de los procesos de dispersión de *B. robinsi*, las cuales aún pueden ser complementadas con futuros estudios. Es necesario que estos estudios busquen obtener información sobre la distribución geográfica y abundancia larval de todas las provincias del GM, además de que abarquen todas las estaciones del año. Con esto se podrá determinar las tendencias de la distribución y abundancia larval durante el año, con lo que se podrá realizar una mejor interpretación sobre la dispersión larval. Para complementar los resultados de conectividad genética obtenidos en este trabajo, es necesario que los estudios futuros incluyan organismos en estadios juveniles y adultos, los cuales estén distribuidos por toda la plataforma continental del GM, con esto se abarcarán más estadios de desarrollo y se podrá realizar interpretaciones con una visión más amplia.

A partir de este capítulo se publicó el artículo:

Morales-Pulido, J. M., Munguia-Vega, A., Jiménez-Rosenberg, S. P. A., Rochas-Olivares, A. y Galindo-Sánchez, C. E. (2023). Genetic connectivity in Twospot flounder (*Bothus robinsi*) across the Gulf of Mexico, inferred with single nucleotide polymorphisms from larvae and adults. *Frontiers in Marine Science*, 10 (January), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1070483>

## Literatura citada

---

- Ahlstrom, E. H., Butler, J. L. y Sumida, B. Y. (1976). Pelagic stromateoid fishes (Pisces, Perciformes) of the eastern Pacific: kinds, distributions, and early life histories and observations on five of these from the northwest Atlantic. *Bulletin of Marine Science*, 26(3), 285–402. <https://www.ingentaconnect.com/content/umrsmas/bullmar/1976/00000026/00000003/art00001>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. y Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Aranguren-Méndez, J. A., Román-Bravo, R., Isea, W., Villasmil, Y. y Jordana, J. (2005). Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. *Latin American Archives of Animal Production*, 13(1), 30–42. <http://www.bioline.org.br/pdf?la05005>
- Ayala-Pérez, L. A., Ramos-Miranda, J., Flores-Hernández, D., Sosa-López, A. y Martínez-Romero, G. E. (2015). *Ictiofauna marina y costera de Campeche*. [http://www.sisal.unam.mx/recorecos/RED/Productos\\_academicos\\_files/Ictiofauna\\_marina\\_y\\_costera\\_de\\_CampecheVWeb.pdf](http://www.sisal.unam.mx/recorecos/RED/Productos_academicos_files/Ictiofauna_marina_y_costera_de_CampecheVWeb.pdf)
- Baguette, M. y Van Dyck, H. (2007). Landscape connectivity and animal behavior: functional grain as a key determinant for dispersal. *Landscape Ecology*, 22(8), 1117–1129. <https://doi.org/10.1007/s10980-007-9108-4>
- Batta-Lona, P. G., Galindo-Sánchez, C. E., Arteaga, M. C., Robles-Flores, J. y Jiménez-Rosenberg, S. P. A. (2019). DNA barcoding and morphological taxonomy: identification of lanternfish (Myctophidae) larvae in the Gulf of Mexico. *Mitochondrial DNA Part A*, 30(2), 375–383. <https://doi.org/10.1080/24701394.2018.1538364>
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J. y Sayers, E. W. (2012). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 41, D36–D42. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1195>
- Bester, C. (2017). Discover fishes *Bothus ocellatus*. Recuperado el 4, octubre, 2022, de: <https://www.floridamuseum.ufl.edu/discover-fish/species-profiles/bothus-ocellatus/>
- Bingpeng, X., Heshan, L., Zhilan, Z., Chunguang, W., Yanguo, W. y Jianjun, W. (2018). DNA barcoding for identification of fish species in the Taiwan Strait. *PLOS ONE*, 13(6), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198109>
- BioBlitz, G. F. F. (2014). *Scientific Photography of Fishes*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4413.2562>
- Blanqueto-Manzanero, M. D. y Vega-Cendejas, M. E. (2018). Ontogenetic variation of food habitats of *Trichopsetta ventralis* (Pleuronectiformes: Bothidae) in the Southern Gulf of Mexico. *Hidrobiológica*, 28(1), 1–10. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dchs/hidro/2018v28n1/Vega>
- Bradbury, P. J., Zhang, Z., Kroon, D. E., Casstevens, T. M., Ramdoss, Y. y Buckler, E. S. (2007). TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*, 23(19), 2633–2635. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm308>

- Bucklin, A., Steinke, D. y Blanco-Bercial, L. (2011). DNA Barcoding of Marine Metazoa. *Annual Review of Marine Science*, 3(1), 471–508. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120308-080950>
- Calò, A., Félix-Hackradt, F. C., Garcia, J., Hackradt, C. W., Rocklin, D., Treviño Otón, J. y Charton, J. A. G. (2013). A review of methods to assess connectivity and dispersal between fish populations in the Mediterranean Sea. *Advances in Oceanography and Limnology*, 4(2), 150–175. <https://doi.org/10.1080/19475721.2013.840680>
- Casado-Amezúa, P. (2013). Conectividad y biología de la conservación en el Mediterráneo. Una perspectiva genética basada en especies clave de invertebrados marinos bentónicos. *Chronica naturae*, 100, 92–100. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4204172>
- Catchen, J. M., Amores, A., Hohenlohe, P., Cresko, W. y Postlethwait, J. H. (2011). Stacks : building and genotyping loci de novo from short-read sequences. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 1(3), 171–182. <https://doi.org/10.1534/g3.111.000240>
- Chovanec, A., Hofer, R. y Schiemer, F. (2003). Fish as bioindicators. En B. A. Markert, A. M. Breure y H. G. Zechmeiste (Eds.), *Bioindicators and biomonitors* (Vol. 6, pp. 639–676). Elsevier Science Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0927-5215\(03\)80148-0](https://doi.org/10.1016/S0927-5215(03)80148-0)
- Compaire, J. C., Pérez-Brunius, P., Jiménez-Rosenberg, S. P. A., Rodríguez Outerelo, J., Echeverri García, L. del P. y Herzka, S. Z. (2021). Connectivity of coastal and neritic fish larvae to the deep waters. *Limnology and Oceanography*, 66(6), 2423–2441. <https://doi.org/10.1002/lno.11762>
- Cowen, R. K. (2006). Scaling of connectivity in marine populations. *Science*, 311(5760), 522–527. <https://doi.org/10.1126/science.1122039>
- Cowen, R. K. y Sponaugle, S. (2009). Larval dispersal and marine population connectivity. *Annual Review of Marine Science*, 1(1), 443–466. <https://doi.org/10.1146/annurev.marine.010908.163757>
- Díaz-Flores, M. Á., Salas-de-León, D. A. y Monreal-Gómez, M. A. (2017). Origin and evolution of cyclonic eddy of the bay of Campeche, Gulf of Mexico. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 52(3), 441–450. <https://doi.org/10.4067/s0718-19572017000300003>
- Díaz-Viloria, N., Sánchez-Velasco, L., Lavín, M. F., Perez-Enriquez, R., Jiménez-Rosenberg, S. P. A. y Godínez, V. M. (2015). Genetic corroboration of *Engraulis mordax* larvae in the upper Gulf of California, a previously undescribed spawning habitat. *Ichthyological Research*, 62(2), 230–235. <https://doi.org/10.1007/s10228-014-0423-x>
- Díaz-Viloria, N., Sánchez-Velasco, L., Perez-Enriquez, R. y Jiménez-Rosenberg, S. P. A. (2013). Molecular identification and morphological description of totoaba *Totoaba macdonaldi* and *curvina* *Cynoscion reticulatus* preflexion larvae (Perciformes: Sciaenidae). *Ichthyological Research*, 60(4), 390–395. <https://doi.org/10.1007/s10228-013-0359-6>
- Domingues, C. P., Creer, S., Taylor, M. I., Queiroga, H. y Carvalho, G. R. (2011). Temporal genetic homogeneity among shore crab (*Carcinus maenas*) larval events supplied to an estuarine system on the Portuguese northwest coast. *Heredity*, 106(5), 832–840. <https://doi.org/10.1038/hdy.2010.126>

- Duffy-Anderson, J. T., Bailey, K. M., Cabral, H. N., Nakata, H. y van der Veer, H. W. (2014). The planktonic stages of flatfishes: physical and biological interactions in transport processes. En R. N. Gibson, R. D. M. Nash, A. J. Geffen y H. van der Veer (Eds.), *Flatfishes* (Second Edi, pp. 132–170). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118501153.ch6>
- Emery, M. K. (2015). Taxonomic revision of the genus *Bothus* (Bothidae; Pleuronectiformes) [University of Ottawa]. En *Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015* (Vol. 1). <https://ruor.uottawa.ca/handle/10393/34445>
- Espinosa-Fuentes, M. D. L., Flores-coto, C., Zavala-García, F., Sanvicente-Añorve, L. y Funes-Rodríguez, R. (2013). Seasonal vertical distribution of fish larvae in the southern Gulf of Mexico Distribución vertical estacional de larvas de peces en el sur del Golfo de México. *Hidrobiológica*, 23(1), 42–59. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0188-88972013000100005](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-88972013000100005)
- Evanno, G., Regnaut, S. y Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Evseenko y Nadtoka, E. V. (2003). On the Identification of Flatfish Larvae of Two Closely Related Species of the Genus *Bothus* (Bothidae ) from the Western Atlantic. *Journal of Ichthyology*, 43(7), 572–574. [https://www.researchgate.net/profile/Sergei-Evseenko/publication/271700383\\_On\\_the\\_Identification\\_of\\_Flatfish\\_Larvae\\_of\\_Two\\_Closely\\_Related\\_Species\\_of\\_the\\_Genus\\_Bothus\\_Bothidae\\_from\\_the\\_Western\\_Atlantic\\_Originally\\_published\\_in\\_Russian\\_in\\_Voprosy\\_Ikhtiologi](https://www.researchgate.net/profile/Sergei-Evseenko/publication/271700383_On_the_Identification_of_Flatfish_Larvae_of_Two_Closely_Related_Species_of_the_Genus_Bothus_Bothidae_from_the_Western_Atlantic_Originally_published_in_Russian_in_Voprosy_Ikhtiologi)
- Evseenko, S. A. (1976). Larvae of *Bothus ocellatus* (Agassiz) from the Northwestern Atlantic (in Russian). *ВОПРОСЫ ИХТИОЛОГИИ*, 4(99), 661–669. [https://www.researchgate.net/publication/270380438\\_Larvae\\_of\\_Bothus\\_ocellatus\\_Agassiz\\_from\\_the\\_Northwestern\\_Atlantic\\_in\\_Russian](https://www.researchgate.net/publication/270380438_Larvae_of_Bothus_ocellatus_Agassiz_from_the_Northwestern_Atlantic_in_Russian)
- Evseenko, S. A. (1978). Some data on metamorphosis of larvae of genus *Bothus* (Pisces, Bothidae) from Caribbean Sea. *Zoologicheskii zhurnal*, 57(7), 1040–1047. [https://www.researchgate.net/publication/270379011\\_Some\\_Data\\_on\\_Metamorphosis\\_of\\_Larvae\\_of\\_the\\_Genus\\_Bothus\\_from\\_the\\_Caribbean\\_Sea\\_in\\_Russian](https://www.researchgate.net/publication/270379011_Some_Data_on_Metamorphosis_of_Larvae_of_the_Genus_Bothus_from_the_Caribbean_Sea_in_Russian)
- Evseenko, S. A. (2008a). Early life history stages of peacock flounder *Bothus lunatus* (Bothidae) from the western and central tropical Atlantic. *Journal of Ichthyology*, 48(7), 515–524. <https://doi.org/10.1134/S0032945208070059>
- Evseenko, S. A. (2008b). Distribution and routes of drift migrations in larvae of three species of flatfish *Bothus* (Bothidae) in open waters of the northern Atlantic. *Journal of Ichthyology*, 48(9), 792–809. <https://doi.org/10.1134/S0032945208090105>
- Excoffier, L. y Lischer, H. E. L. (2010a). Arlequin 3.5.2 Manual. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564–567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Excoffier, L. y Lischer, H. E. L. (2010b). 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. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>

- Fahay, M. P. (1983). Guide of the early stages of marine fishes occurring in the western North Atlantic Ocean, Cape Hatteras to the Southern Scotian Shelf. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, 4(4), 423. <https://doi.org/https://doi.org/10.2960/J.v4.a1Fahay>
- Fahay, M. P. (2007). Early stages of fishes in the western North Atlantic Ocean Davis Strait, Southern Greenland and Flemish Cap to Cape Hatteras. *Northwest Atlantic Fisheries Organization*, 1, 1681.
- Flores-Coto, C., Abundio-López, F. y Zavala-García, F. (1991). Larval distribution and abundance of pleuronectiformes from the southern gulf of Mexico. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 32(5), 439–450. [https://doi.org/10.1016/0272-7714\(91\)90033-8](https://doi.org/10.1016/0272-7714(91)90033-8)
- Flores-Coto, C., Espinosa, M. D. L. L., Zavala, F. G. y Sanvicente-Añorve, L. (2009). Ictioplancton del sur del Golfo de México. Un compendio. *Hidrobiológica*, 19(1), 49–76. <https://www.scielo.org.mx/pdf/hbio/v19n1/v19n1a7.pdf>
- Foll, M. y Gaggiotti, O. (2008). A genome-scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant Markers: a bayesian perspective. *Genetics*, 180(2), 977–993. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.092221>
- Froese, R. y Pauly, D. (2022). FishBase. World Wide Web electronic publication. Recuperado el 5, marzo, 2023, de: <https://www.fishbase.se/search.php>
- Gagnaire, P. A. (2020). Comparative genomics approach to evolutionary process connectivity. *Evolutionary Applications*, 13(6), 1320–1334. <https://doi.org/10.1111/eva.12978>
- Garbini, C. N., Zani-Teixeira, M. de L., Ohkawara, M. H. y Katsuragawa, M. (2014). Distribution and abundance of Pleuronectiformes larvae off southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography*, 62(1), 23–34. <https://doi.org/10.1590/s1679-87592014051706201>
- García-Vázquez, E., Horreo, J. L., Campo, D., Machado-Schiaffino, G., Bista, I., Triantafyllidis, A. y Juanes, F. (2009). Mislabeling of two commercial north american hake species suggests underreported exploitation of offshore hake. *Transactions of the American Fisheries Society*, 138(4), 790–796. <https://doi.org/10.1577/t08-169.1>
- Ghiglione, J.-F. y Laudet, V. (2020). Marine life cycle: a polluted terra incognita is unveiled. *Current Biology*, 30(3), R130–R133. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.11.083>
- Green, A. L., Maypa, A. P., Almany, G. R., Rhodes, K. L., Weeks, R., Abesamis, R. A., Gleason, M. G., Mumby, P. J. y White, A. T. (2015). Larval dispersal and movement patterns of coral reef fishes, and implications for marine reserve network design. *Biological Reviews*, 90(4), 1215–1247. <https://doi.org/10.1111/brv.12155>
- Hammer, W. M. y Largier, J. L. (2012). Nearshore oceanography: dispersion and advection of early larvae in marginal shallow waters. En S. de Mitcheson y P. L. Colin (Eds.), *Reef Fish Spawning Aggregations: Biology, Research and Management* (pp. 170–172). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-1980-4>
- Hamner, R. M., Freshwater, D. W. y Whitfield, P. E. (2007). Mitochondrial cytochrome b analysis reveals two invasive lionfish species with strong founder effects in the western Atlantic. *Journal of Fish Biology*, 71(SUPPL. B), 214–222. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01575.x>

- Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemplak, T. S. y Francis, C. M. (2004). Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLoS Biology*, 2(10), e312. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020312>
- Hedgecock, D., Barber, P. y Edmands, S. (2007). Genetic Approaches to Measuring Connectivity. *Oceanography*, 20(3), 70–79. <https://doi.org/10.5670/oceanog.2007.30>
- Herzka, S. Z., Álvarez-Zaragoza, R. A., Peters, E. M. y Hernández-Cárdenas, G. (2021). Circulación oceánica y oleaje. En R. Romero-Centeno, J. Zavala-Hidalgo y J. P. Osunua-Cañedo (Eds.), *Atlas de línea base ambiental del golfo de México* (tomo II, pp. 13–19). Consorcio de Investigación del Golfo de México.
- Houde, E. D., Leak, J. C., Dowd, C. E., Berkeley, S. A. y Richards, W. J. (1979). *Ichthyoplankton abundance and diversity in the eastern Gulf of Mexico*. <https://babel.hathitrust.org/cgi/pt?id=uc1.31822020694998&view=1up&seq=180>
- Johnson, D. R., Perry, H. M. y Lyczkowski-Shultz, J. (2013). Connections between Campeche bank and red snapper populations in the Gulf of Mexico via modeled larval transport. *Transactions of the American Fisheries Society*, 142(1), 50–58. <https://doi.org/10.1080/00028487.2012.720630>
- Jombart, T. y Ahmed, I. (2011). adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics*, 27(21), 3070–3071. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr521>
- Joyeux, J. C., Miller, J. M., Aliaume, C. y Zerbi, A. (1995). Growth of sand whiff *Citharichthys arenaceus* and bay whiff *Citharichthys spilopterus* (Pleuronectiformes: Bothidae) in Puerto Rico (greater antilles) and North Carolina (USA), with comments on growth rate comparisons. *Netherlands Journal of Sea Research*, 34(1–3), 211–220. [https://doi.org/10.1016/0077-7579\(95\)90028-4](https://doi.org/10.1016/0077-7579(95)90028-4)
- Kendrick, G. A., Orth, R. J., Statton, J., Hovey, R., Ruiz Montoya, L., Lowe, R. J., Krauss, S. L. y Sinclair, E. A. (2017). Demographic and genetic connectivity: the role and consequences of reproduction, dispersal and recruitment in seagrasses. *Biological Reviews*, 92(2), 921–938. <https://doi.org/10.1111/brv.12261>
- Kool, J. T., Moilanen, A. y Treml, E. A. (2013). Population connectivity: recent advances and new perspectives. *Landscape Ecology*, 28(2), 165–185. <https://doi.org/10.1007/s10980-012-9819-z>
- Kopelman, N. M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N. A. y Mayrose, I. (2015). Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular Ecology Resources*, 15(5), 1179–1191. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12387>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. y Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1–4. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lara-Hernández, J. A., Zavala-Hidalgo, J., Sanvicente-Añorve, L. y Briones-Fourzán, P. (2019). Connectivity and larval dispersal pathways of *Panulirus argus* in the Gulf of Mexico: a numerical study. *Journal of Sea Research*, 155(November), 101814. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2019.101814>
- Lara, M. R. (2006). Bothidae: Lefteye flounders. En W. J. Richards (Ed.), *Early Stages of Atlantic Fishes: An Identification Guide for the Western Central North Atlantic* (pp. 2327–2344). CRC Press.

- Macpherson, E. y Raventos, N. (2006). Relationship between pelagic larval duration and geographic distribution of Mediterranean littoral fishes. *Marine Ecology Progress Series*, 327, 257–265. <https://doi.org/10.3354/meps327257>
- Manichaikul, A., Mychaleckyj, J. C., Rich, S. S., Daly, K., Sale, M. y Chen, W. M. (2010). Robust relationship inference in genome-wide association studies. *Bioinformatics*, 26(22), 2867–2873. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq559>
- Marandel, F., Lorance, P., Andrello, M., Charrier, G., Cam, S. Le, Lehuta, S. y Trenkel, V. M. (2018). Insights from genetic and demographic connectivity for the management of rays and skates. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 75(8), 1291–1302. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2017-0291>
- Maruyama, T. (1970). Effective number of alleles in a subdivided population. *Theoretical Population Biology*, 1(3), 273–306. [https://doi.org/10.1016/0040-5809\(70\)90047-X](https://doi.org/10.1016/0040-5809(70)90047-X)
- McEachran, J. D. (2009). Fishes (Vertebrata: Pisces) of the Gulf of Mexico. En F. L. Darryl y C. K. Camp (Eds.), *Gulf of Mexico Origin, Waters, and Biota Volume1, Biodiversity* (pp. 1223–1316). A&M University Press.
- Miron, P., Beron-Vera, F. J., Olascoaga, M. J., Sheinbaum, J., Pérez-Brunius, P. y Froyland, G. (2017). Lagrangian dynamical geography of the Gulf of Mexico. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07177-w>
- Morales-Pulido. (2017). *Identificación morfológica y molecular de especies de larvas de peces del Golfo de México. Master's thesis, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Ensenada, Baja California, Mexico* [Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada]. [https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/1772/1/tesis\\_Morales\\_Pulido\\_José\\_Manuel\\_24\\_nov\\_2017B.pdf](https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/1772/1/tesis_Morales_Pulido_José_Manuel_24_nov_2017B.pdf)
- Morales-Pulido, J. M., Galindo-Sánchez, C. E., Jiménez-Rosenberg, S. P. A., Arteaga, M. C., Batta-Lona, P. G. y Herzka, S. Z. (2022). Identification of *Bothus ocellatus* and *Bothus robinsi* larvae using morphological and molecular approaches leads to a distribution record for the Gulf of Mexico. *Environmental Biology of Fishes*, 106(1), 43–59. <https://doi.org/10.1007/s10641-022-01370-1>
- Morales-Pulido, J. M., Munguia-Vega, A., Jiménez-Rosenberg, S. P. A., Rocha-Olivares, A. y Galindo-Sánchez, C. E. (2023). Genetic connectivity in Twospot flounder (*Bothus robinsi*) across the Gulf of Mexico, inferred with single nucleotide polymorphisms from larvae and adults. *Frontiers in Marine Science*, 10(January), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1070483>
- Morato, T., Afonso, P., Carvalho, N., Lourinho, P., Santos, R. S., Krug, H. M. y Nash, R. D. M. (2007). Growth, reproduction and recruitment patterns of the wide-eyed flounder, *Bothus podas* Delaroche (Pisces: Bothidae), from the Azores. *Marine Biology Research*, 3(6), 403–411. <https://doi.org/10.1080/17451000701712331>
- Morin, P. A., Luikart, G., Wayne, R. K. y the SNP workshop group. (2004). SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(4), 208–216. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.01.009>

- Muller-Karger, F. E., Smith, J. P., Werner, S., Chen, R., Roffer, M., Liu, Y., Muhling, B., Lindo-Atichati, D., Lamkin, J., Cerdeira-Estrada, S. y Enfield, D. B. (2015). Natural variability of surface oceanographic conditions in the offshore Gulf of Mexico. *Progress in Oceanography*, 134, 54–76. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2014.12.007>
- Munguia-Vega, A., Marinone, S. G., Paz-Garcia, D. A., Giron-Nava, A., Plomozo-Lugo, T., Gonzalez-Cuellar, O., Weaver, A. H., García-Rodríguez, F. J. y Reyes-Bonilla, H. (2018). Anisotropic larval connectivity and metapopulation structure driven by directional oceanic currents in a marine fish targeted by small-scale fisheries. *Marine Biology*, 165(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s00227-017-3267-x>
- Munroe, T. A. (2003). Bothidae. Lefteye flounders. En K. E. Carpenter (Ed.), *FAO species identification guide for fishery purposes. The living marine resources of the Western Central Atlantic. Vol. 3: Bony fishes part 2 (Opistognathidae to Molidae), sea turtles and marine mammals* (pp. 1885–1895).
- Ottmann, D., Grorud-Colvert, K., Sard, N. M., Huntington, B. E., Banks, M. A. y Sponaugle, S. (2016). Long-term aggregation of larval fish siblings during dispersal along an open coast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(49), 14067–14072. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613440113>
- Otwoma, L. M., Reuter, H., Timm, J. y Meyer, A. (2018). Genetic connectivity in a herbivorous coral reef fish (*Acanthurus leucosternon* Bennet, 1833) in the Eastern African region. *Hydrobiologia*, 806(1), 237–250. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3363-4>
- Parker, P. G., Snow, A. A., Schug, M. D., Booton, G. C. y Fuerst, P. A. (1998). What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*, 79(2), 361. <https://doi.org/10.2307/176939>
- Peakall, R. y Smouse, P. E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research--an update. *Bioinformatics*, 28(19), 2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Pérez-Portela, R., Bumford, A., Coffman, B., Wedelich, S., Davenport, M., Fogg, A., Swenarton, M. K., Coleman, F., Johnston, M. A., Crawford, D. L. y Oleksiak, M. F. (2018). Genetic homogeneity of the invasive lionfish across the Northwestern Atlantic and the Gulf of Mexico based on single nucleotide polymorphisms. *Scientific Reports*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23339-w>
- Peterson, B. K., Weber, J. N., Kay, E. H., Fisher, H. S. y Hoekstra, H. E. (2012). Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PLoS ONE*, 7(5), e37135. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037135>
- Pineda, J., Hare, J. y Sponaugle, S. (2007). Larval transport and dispersal in the coastal ocean and consequences for population connectivity. *Oceanography*, 20(3), 22–39. <https://doi.org/10.5670/oceanog.2007.27>
- Pritchard, J. K., Stephens, M. y Donnelly, P. (2000). Interspecific cross of *Brassica oleracea* var. *alboglabra* and *B. napus*: effects of growth condition and silique age on the efficiency of hybrid production, and inheritance of erucic acid in the self-pollinated backcross generation. *Genetics*, 155, 945–959. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10681-008-9788-0>
- Randall, J. E. (1968). Caribbean reef fishes. En J. E. Randall (Ed.), *T. F. H. Publications* (3rd Ed.). TFH Publications Inc.

- Reitzel, A. M., Herrera, S., Layden, M. J., Martindale, M. Q. y Shank, T. M. (2013). Going where traditional markers have not gone before: utility of and promise for RAD sequencing in marine invertebrate phylogeography and population genomics. *Molecular Ecology*, 22(11), 2953–2970. <https://doi.org/10.1111/mec.12228>
- Rice, W. R. (1988). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43(1), 223–225. <https://www.jstor.org/stable/2409177>
- Riquet, F., Comtet, T., Broquet, T. y Viard, F. (2017). Unexpected collective larval dispersal but little support for sweepstakes reproductive success in the highly dispersive brooding mollusc *Crepidula fornicata*. *Molecular Ecology*, 26(20), 5467–5483. <https://doi.org/10.1111/mec.14328>
- Ryman, N. y Palm, S. (2006). POWSIM: a computer program for assessing statistical power when testing for genetic differentiation. *Molecular Ecology Notes*, 6(3), 600–602. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01378.x>
- Sadorus, L. L., Goldstein, E. D., Webster, R. A., Stockhausen, W. T., Planas, J. V. y Duffy-Anderson, J. T. (2021). Multiple life-stage connectivity of Pacific halibut (*Hippoglossus stenolepis*) across the Bering Sea and Gulf of Alaska. *Fisheries Oceanography*, 30(2), 174–193. <https://doi.org/10.1111/fog.12512>
- Salas-Monreal, D., Marin-Hernandez, M., Salas-Perez, J. de J., Salas-de-Leon, D. A., Monreal-Gomez, M. A. y Perez-España, H. (2018). Coral reef connectivity within the Western Gulf of Mexico. *Journal of Marine Systems*, 179, 88–99. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2017.12.001>
- Sanvicente-Añorve, Flores-Coto, C. y Chiappa-Carrara, X. (2000). Temporal and Spatial Scales of Ichthyoplankton Distribution in the Southern Gulf of Mexico. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 51(4), 463–475. <https://doi.org/10.1006/ecss.2000.0692>
- Sanvicente-Añorve, Flores-Coto, C. y Sánchez-Velasco, L. (1998). Spatial and seasonal patterns of larval fish assemblages in the southern Gulf of Mexico. *Bulletin of Marine Science*, 62(1), 17–30. <https://www.ingentaconnect.com/contentone/umrsmas/bullmar/1998/00000062/00000001/art00003>
- Sanvicente-Añorve, Zavala-Hidalgo, J., Allende-Arandía, M. y Hermoso-Salazar, M. (2014). Connectivity patterns among coral reef systems in the southern Gulf of Mexico. *Marine Ecology Progress Series*, 498, 27–41. <https://doi.org/10.3354/meps10631>
- Shima, J. S. y Swearer, S. E. (2016). Evidence and population consequences of shared larval dispersal histories in a marine fish. *Ecology*, 97(1), 25–31. <https://doi.org/10.1890/14-2298.1>
- Snow, J. (2022). *Twospot Flounder*. Mexico - Fish, Birds, Crabs, Marine Life, Shells and Terrestrial Life Twospot Flounder. Recuperado el 11, enero, 2022, de: <https://mexican-fish.com/twospot-flounder/>
- Truelove, N. K., Kough, A. S., Behringer, D. C., Paris, C. B., Box, S. J., Preziosi, R. F. y Butler, M. J. (2017). Biophysical connectivity explains population genetic structure in a highly dispersive marine species. *Coral Reefs*, 36(1), 233–244. <https://doi.org/10.1007/s00338-016-1516-y>

- Valdez-Moreno, M., Vásquez-Yeomans, L., Elías-Gutiérrez, M., Ivanova, N. V. y Hebert, P. D. N. (2010). Using DNA barcodes to connect adults and early life stages of marine fishes from the Yucatan Peninsula, Mexico: potential in fisheries management. *Marine and Freshwater Research*, 61(6), 655. <https://doi.org/10.1071/MF09222>
- Villegas-Sánchez, C. A., Pérez-España, H., River-Madrid, R., Salas-Monreal, D. y Arias-González, J. E. (2014). Subtle genetic connectivity between Mexican Caribbean and south-western Gulf of Mexico reefs: the case of the bicolor damselfish, *Stegastes partitus*. *Coral Reefs*, 33(1), 241–251. <https://doi.org/10.1007/s00338-013-1083-4>
- Wakida-Kusunoki, A., Rosa, I. B. la, González-Cruz, A. y Ángel, L. A. (2013). Distribución y abundancia de la fauna acompañante del camarón en la costa de Tamaulipas, México (veda del 2005). *Universidad y Ciencia*, 29(1), 75–86. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0186-29792013000100008](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-29792013000100008)
- Ward, R. D., Zemplak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R. y Hebert, P. D. . (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1847–1857. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1716>
- Weir, B. S. y Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38(6), 1358–1370. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1984.tb05657.x>
- Werner, F., Cowen, R. y Paris, C. (2007). Coupled Biological and Physical Models: Present Capabilities and Necessary Developments for Future Studies of Population Connectivity. *Oceanography*, 20(3), 54–69. <https://doi.org/10.5670/oceanog.2007.29>
- Yearsley, J. M., Viard, F. y Broquet, T. (2013). The effect of collective dispersal on the genetic structure of a subdivided population. *Evolution*, 67(6), 1649–1659. <https://doi.org/10.1111/evo.12111>

## Anexos

---

### Anexo A.

La información genética generada en este estudio se encuentra dentro del repositorio de GenBank: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

Número de acceso de las secuencias COI (generadas en este estudio) de *B. ocellatus* y *B. robinsi*: MZ489273, MZ489274, MZ489275, MZ489276, MZ489277, MZ489278, MZ489279, MZ489280, MZ489281, MZ489282, MZ489283, MZ489284, MZ489285, MZ489286, MZ489287, MZ489288, MZ489289, MZ489290, MZ489291, MZ489292, MZ489293, MZ489294, MZ489295, MZ489296, MZ489297, MZ489298, MZ489299, MZ489300, MZ489301, MZ489302, MZ489303, MZ489304, MZ489305, MZ489306, MZ489307, MZ489308, MZ489309, MZ489310, MZ489311, MZ489312, MZ489313, MZ489314, MZ489315, MZ489316, MZ489317, MZ489318, MZ489319, MZ489320, MZ489321, MZ489322, MZ489323, MZ489324, MZ489325, MZ489326, MZ489327, MZ489328, MZ489329, MZ489330, MZ489331, MZ489332, MZ489333, MZ489334, MZ489335, MZ489336, MZ489337, MZ489338, MZ489339, MZ489340, MZ489341, MZ489342, MZ489343, MZ489344, MZ489345, MZ489346, MZ489347, MZ489348, MZ489349, MZ489350, MZ489351, MZ489352, MZ489353, MZ489354, MZ489355, MZ489356, MZ489357, MZ489358, MZ489359, MZ489360, MZ489361, MZ489362, MZ489363, MZ489364, MZ489365, MZ489366, MZ489367, MZ489368, MZ489369, MZ489370, MZ489371, MZ489372, MZ489373, MZ489374, MZ489375, MZ489376, MZ489377, MZ489378, MZ489379, MZ489380, MZ489381, MZ489382, MZ489383, MZ489384, MZ489385, MZ489386, MZ489387, MZ489388, MZ489389, MZ489390, MZ489391, MZ489392, MZ489393, MZ489394, MZ489395, MZ489396, MZ489397, and MZ489398.

Número de acceso de las secuencias de referencias: BACQ222-16 (Número de acceso de BOLD Systems), GU224729, JN313825, KF929672, KC170029, GU225057, JX887479 (*S. papillosum*) y KY402433 (*S. papillosum*).

Número de acceso del Bio-proyecto: PRJNA889773

Número de acceso de los SRA: SRR21877289, SRR21877288, SRR21877287, SRR21877286, SRR21877285, SRR21877284, SRR21877283, SRR21877282, SRR21877281, SRR21877280, SRR21877279, SRR21877278, SRR21877277, SRR21877276, SRR21877275, SRR21877274, SRR21877273, SRR21877272, SRR21877271, SRR21877270, SRR21877269, SRR21877268, SRR21877267, SRR21877266, SRR21877265, SRR21877264, SRR21877263, SRR21877262, SRR21877261, SRR21877260, SRR21877259, SRR21877258, SRR21877257, SRR21877256, SRR21877255, SRR21877254, SRR21877253, SRR21877252, SRR21877237, SRR21877236, SRR21877235, SRR21877234, SRR21877233, SRR21877232, SRR21877231, SRR21877230, SRR21877229, SRR21877251, SRR21877250, SRR21877249, SRR21877248, SRR21877247, SRR21877246, SRR21877245, SRR21877244, SRR21877243, SRR21877242, SRR21877241, SRR21877240, SRR21877239, SRR21877238, SRR21877228, SRR21877227, SRR21877226, SRR21877225, SRR21877224, SRR21877223, SRR21877222, SRR21877221, SRR21877220, SRR21877219, SRR21877218, SRR21877217, SRR21877216, SRR21877215, SRR21877214, SRR21877213, SRR21877212, SRR21877211, SRR21877210, SRR21877209 y SRR21877208.

## Anexo B.

---

Metodología para la construcción de librerías genómicas de ddRADseq

Selección de ADN genómico: Para la construcción de las librerías genómicas se seleccionaron muestras con cantidades de ADN entre 100-800 ng totales y con ADN de alto peso molecular. Las muestras con una mayor cantidad a los 800 ng totales se alicuotaron. La concentración de las alícuotas fue de 10 ng/ $\mu$ l en un volumen de 80  $\mu$ l.

La integridad y el peso molecular de las muestras de ADN se evaluaron con un gel de *Agarosa-Synergel Diversified Biotech* al 1% (donde se sembraron 5  $\mu$ l de ADN por muestra). El ADN que presentó degradación, sin la presencia o con una cantidad menor de ADN de alto peso molecular se descartó. Los ADN seleccionados fueron sometidos a un proceso de purificación con perlas magnéticas (AMPure) (Anexo C). La purificación se realizó con el objetivo de disminuir la cantidad de fragmentos de ADN con un peso molecular menor a los 600 pb.

Doble digestión: Los ADN de los individuos con una cantidad entre 50-250 ng totales, fueron sometidos a una reacción de doble digestión de manera individual. La digestión consistió en la hidrólisis del ADN de alto peso molecular por medio de dos enzimas de restricción. La hidrólisis se efectuó con la enzima de corte raro (EcoRI-HF) que presenta un extremo cohesivo 5' GAATTC y la enzima de corte frecuente (MspI) con extremo cohesivo 5' CCGG.

La mezcla necesaria para realizar la doble digestión consistió en la reacción de las dos enzimas de restricción, 10X Ne Buffer, agua y ADN, dando un volumen total de 60  $\mu$ l (Tabla 4). Los tubos se incubaron dentro de un termociclador T100 Bio-Rad, donde fueron expuestos a una temperatura de 37° C durante un período de 3 horas y a una etapa de enfriamiento que consistió en una temperatura de 4° C durante 10 minutos.

Finalizada la digestión, la mezcla se purificó con perlas AMPure para eliminar los reactivos que fueron utilizados en la reacción. En este caso se utilizó una proporción de 1.8X de perlas, utilizando el protocolo del Anexo C.

**Tabla 4.** Volúmenes de cada uno de los reactivos utilizados en la reacción de doble digestión con un volumen final de 60  $\mu$ l. Donde el Buffer de digestión se trabajó en una concentración final de 1X.

Reactivos	Vol. 1 Rx.
Enzima MspI	0.5 $\mu$ l
Enzima EcoRI-HF	0.5 $\mu$ l
10X Ne Buffer	6 $\mu$ l
Agua	1.5 $\mu$ l
ADN	43 $\mu$ l
Total	60 $\mu$ l

Ligación de adaptadores: Se utilizan dos tipos de adaptadores. El primer adaptador provino de un set de 48 pares de adaptadores (P1.1 y P1.2), los cuales se caracterizan por poseer un *barcode* único que se adhiere al extremo cohesivo creado por la enzima EcoRI-HF. El segundo tipo consiste en un par de adaptadores comunes (P2.1 y P2.2) los cuales se adhieren al extremo cohesivo creado por la enzima MspI.

Para realizar el proceso de hibridación se utilizó una solución amortiguadora de alineamiento a 10X (Tris HCL 100 Mm pH8, NaCl 500 Mm y EDTA 10 mM). En un tubo separado se hibridaron cada uno de los pares de adaptadores individuales (P1.1 y P1.2) y el par de adaptadores comunes (P1.1 y P2.2). Los tubos se colocaron en un termociclador T100 Bio-Rad con un protocolo donde los adaptadores se sometieron a una temperatura de 97.5°C durante 2.5 minutos, posteriormente la temperatura fue disminuyendo 1°C cada minuto hasta llegar a una temperatura de 21°C. Finalmente hubo un período de enfriamiento que consistió en una exposición a una temperatura de 4° C durante 5 minutos.

Antes de ligar los adaptadores hibridados con el ADN, se preparó una solución de trabajo para cada uno de los adaptadores. La elaboración de la solución se basó en el cálculo de la molaridad de ligación, de acuerdo con cantidad de ADN y la frecuencia de corte de las enzimas de restricción. El objetivo era obtener una solución de trabajo en donde 2  $\mu$ l existiera un exceso de 10X de adaptadores con respecto al ADN. Con lo anterior se aumenta la probabilidad de que todos los fragmentos obtenidos en la digestión pudieran ligarse.

Por último, a cada una de las muestras se le asignó un adaptador individual (P1) de los 48 posibles y a todas se les agregó el mismo adaptador común (P2). Cabe resaltar que es posible repetir adaptadores individuales, si los 48 disponibles no son suficientes (las muestras que compartan un adaptador individual

P1 deben realizarse en una reacción de ligación separada), pero deben ser complementado con un adaptador P2 diferente. Cada reacción de ligación consistió en 41.5  $\mu\text{l}$  de ADN digerido y purificado, 1X Buffer T4 ligasa (NEB), 100 unidades de T4 Ligasa (NEB), 0.1  $\mu\text{M}$  del adaptador P2 y 0.1  $\mu\text{M}$  del adaptador P1, se obtuvo un volumen total de reacción de 40  $\mu\text{l}$  (Tabla 5).

**Tabla 5.** Volúmenes y concentraciones de los reactivos utilizados en la ligación de adaptadores en muestras previamente digeridas por las enzimas de restricción (EcoRI-HF y MspI).

Reactivos	Vol. 1 Rx.
Adaptador P1	2 $\mu\text{l}$
Adaptador P2	2 $\mu\text{l}$
T4 Ligasa (NEB)	4 $\mu\text{l}$
1X Buffer T4 Ligasa (NEB)	0.25 $\mu\text{l}$
ADN digerido	31.75 $\mu\text{l}$
Total	40 $\mu\text{l}$

Las reacciones se colocaron en un termociclador T100 Bio-Rad donde se incubaron en una temperatura de 23 °C durante 30 minutos, posteriormente se inició un período de desnaturalización de la enzima de ligación, la cual consistió en la exposición de la reacción a una temperatura de 65° C durante 10 minutos. Al finalizar, se sometieron a una etapa de enfriamiento a una temperatura de 2° C durante 90 segundos. El producto resultante se purificó con una concentración de 1.8X de perlas magnéticas, el cual se resuspendió en 40  $\mu\text{l}$  de agua grado molecular (Anexo C).

Para evaluar que la ligación fuera un éxito, se realizó una PCR a partir de los productos ligados y purificados. Para esto se utilizaron los *primers* PCR1 F. (5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTCACTCTTTCCCTACACGACG-3') y el *primer* PCR2 R (5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGTGATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGC-3'), donde el *primer* PCR 1 F se hibrida con el adaptador individual y el PCR2 R con el adaptador común.

*Pooling* y selección de tamaño: El *pooling* consistió en la agrupación de todos los individuos etiquetados con un adaptador individual el cual posee un *barcode* único. El número máximo de muestras por *pool* fue de 48 individuos (número máximo de adaptadores individuales diferentes), los cuales se mezclaron en concentraciones equimolares. Se obtuvieron cuatro *pools*: dos *pools* de 48 muestras y dos *pools* de 13

muestras. En el *pool* 1 y el *pool* 2 se mezclaron 20 ng totales por muestra de ADN y para el *pool* 3 y *pool* 4 se mezclaron 7 ng totales por muestra de ADN.

Debido a la pérdida de ADN en los pasos de purificación, muestras de *B. robinsi* se descartaron. Al formar los *pools* se observó que era necesario agregar más muestras de las que se tenían disponibles, ya que se debe mantener un balance entre los adaptadores individuales (respecto al contenido de bases GC) para evitar problemas en la secuenciación. Por lo tanto, para evitar el desbalance de adaptadores se agregaron duplicados de muestras de *B. robinsi*, además agregar muestras de *B. ocellatus*.

La selección de tamaño se llevó a cabo con el uso de perlas AMPure con una técnica de doble limpieza, como se describe en el protocolo del Anexo D.

Enriquecimiento de las librerías y anexión del index poblacional: A los *pools* obtenidos se les agregó un adaptador Illumina forward y reverse por medio de una PCR. El adaptador Illumina reverse incluye un index único (index poblacional), el cual se anexa en el sitio asignado al adaptador poblacional (P2). Esto permite que los *pools* puedan identificarse, además que hace posible que muestras con índices individuales iguales y con index poblaciones diferentes puedan ser secuenciadas en una misma línea de secuenciación.

Este paso funciona para aumentar el número de copias de los fragmentos (enriquecimiento) de las muestras contenidas en los *pools*. Cada uno de los *pools* se dividió en ocho alícuotas y a cada una de las reacciones (Tabla 6) se enriqueció por medio de una PCR utilizando una *Taq Phusion High-Fidelity* (Invitrogen). El programa de la PCR consistió en una primera desnaturalización a una temperatura de 94°C por 2 minutos; 18 ciclos de una desnaturalización a una temperatura de 94°C por 30 segundos con una etapa de alineamiento a una temperatura de 60°C por 30 segundos, seguida por la etapa de extensión a una temperatura de 82°C por 20 segundos.

Debido a que la selección de tamaño por perlas magnéticas no presenta una exactitud al determinar el tamaño de los fragmentos, se mantuvieron fragmentos de menor y mayor tamaño de los 300-400 pb requeridos. Por ese motivo las condiciones propuestas para la PCR se estandarizaron con el objetivo de aumentar la probabilidad de enriquecimiento de los fragmentos entre 300-400 pb. Esta PCR también generó fragmentos superiores e inferiores al intervalo antes mencionado.

**Tabla 6.** Volúmenes y concentraciones de reactivos (20  $\mu$ l) para el PCR de enriquecimiento de los fragmentos y la anexión de los adaptadores individuales.

Reactivos	[ ] Inicial	[ ] Final	Vol. 1 Rx.
Buffer	5X	1X	4
dNTP's	10 Um	0.4	0.8
<i>Primer</i> PCR 1 (Peterson et al., 2012)	10	0.5	1
<i>Primer</i> PCR 2 (Peterson et al., 2012)	10	0.5	1
Taq phusion	2	0.5	0.25
ADN			5
Agua			7.95

Se corroboró el éxito del enriquecimiento al comprobar que los fragmentos tuvieran el tamaño previsto, para esto se utilizó un gel de *Agarosa-Synergel Diversified Biotech* al 1.5%. Al confirmar el tamaño, las 8 reacciones de PCR por cada *pool* se combinaron. Posteriormente se les efectuó una purificación con perlas magnéticas a una proporción de 1.5X y se resuspendieron en agua grado molecular en un volumen de 40  $\mu$ l.

Finalmente, los cuatro *pools* enriquecidos y purificados se combinaron agregando una mayor cantidad de nanogramos totales de los *pools* con menos muestras para aumentar las probabilidades de su secuenciación. La librería se mandó a la empresa Novogene Corporation Inc., donde se le realizó una secuenciación de 150 pb doble terminación.

## Anexo C.

---

Protocolo: Purificación de ADN con perlas AMPure, con el objetivo de reducir la concentración de ADN de bajo peso molecular.

1.- Se calcula el volumen en  $\mu\text{l}$  de perlas AMPure necesarias para la purificación. Esto se calcula utilizando la proporción 0.4X, donde X es el volumen (Esta concentración cambia dependiendo del objetivo de la purificación) en que se encuentra diluido el ADN que se purificará. Por lo que para alícuotas de 80  $\mu\text{l}$  sería:

$$(80 \mu\text{l})(0.4) = 32 \mu\text{l de perlas AMPure}$$

2.- Las perlas se agregan al ADN y se homogeneizan lentamente con ayuda de la pipeta. La mezcla se deja incubar durante cinco minutos.

3.- Los tubos con la mezcla de ADN y perlas magnéticas se colocan en una placa magnética (a partir de este paso, los tubos no se quitan de la placa magnética). La mezcla se deja incubar durante 2 minutos, esto es para que las perlas se adhieran al magneto.

4.- Con ayuda de la pipeta se extrae el sobrenadante, evitando perturbar o extraer las perlas magnéticas.

5.- Se le agregan a las perlas 200  $\mu\text{l}$  de etanol al 70% (el etanol debe cubrir las perlas). Pasado 30 segundos se extrae el alcohol. Este paso se realiza por duplicado.

6.- Posterior a la extracción del etanol, se deja secar las perlas durante dos o tres minutos (no se debe dejar que las perlas se agrieten o cambien de coloración). Después del tiempo de secado los tubos se extraen de las placas magnéticas.

7.- A cada uno de los tubos se les agrega 60  $\mu\text{l}$  de agua grado molecular. Con ayuda de una pipeta se homogeneizó la mezcla de agua y perlas magnéticas. La mezcla se deja incubar durante cinco minutos.

8.- Los tubos se colocan en una placa magnética y se dejan incubar durante tres minutos.

9.- Se extrae el sobrenadante (el cual posee el ADN) sin perturbar ni extraer las perlas magnéticas. El sobrenadante se coloca en un tubo nuevo.

10.- El resultado de la purificación del ADN se observa utilizando un gel *Agarosa-Synergel Diversified Biotech* al 1%, en el cual se siembran 5  $\mu\text{l}$  de ADN. Finalmente se cuantificó los nanogramos totales de ADN purificado.

## Anexo D.

---

Protocolo: Selección de tamaño utilizando perlas AMPure, con el objetivo de retener fragmentos con un tamaño entre 300-400 bp (Figura 20).

- 1.- Se calcula el volumen en  $\mu\text{l}$  de perlas AMPure necesarias para la purificación, utilizando la proporción 0.77X, donde X es el volumen en que se encuentra diluido el ADN que se purificará.
- 2.- Las perlas se agregan al ADN y se homogeneizan lentamente con ayuda de la pipeta. La mezcla se deja incubar durante cinco minutos.
- 3.- Los tubos con la mezcla de ADN y perlas magnéticas se colocan en una placa magnética (a partir de este paso, los tubos no se quitan de la placa magnética). La mezcla se deja incubar durante 2 minutos, esto es para que las perlas se adhieran al magneto.
- 4.- Con ayuda de la pipeta se extrae el sobrenadante, evitando perturbar o extraer las perlas magnéticas.
- 5.- Se le agregan a las perlas 200  $\mu\text{l}$  de etanol al 70% (el etanol debe cubrir las perlas). Pasado 30 segundos se extrae el alcohol. Este paso se realiza por duplicado.
- 6.- Posterior a la extracción del etanol, se deja secar las perlas durante dos o tres minutos (no se debe dejar que las perlas se agrieten o cambien de coloración). Después del tiempo de secado los tubos se extraen de las placas magnéticas.
- 7.- A cada uno de los tubos se les agrega 60  $\mu\text{l}$  de agua grado molecular. Con ayuda de una pipeta se homogeneizó la mezcla de agua y perlas magnéticas. La mezcla se deja incubar durante cinco minutos.
- 8.- Los tubos se colocan en una placa magnética y se dejan incubar durante tres minutos.
- 9.- Se extrae el sobrenadante (el cual posee el ADN) sin perturbar ni extraer las perlas magnéticas. El sobrenadante se coloca en un tubo nuevo.
- 10.- Se toma el sobrenadante con el ADN (fragmentos mayores a 300 pb), al cual se agregará una cantidad de perlas a una proporción de 0.64X.

11.-Las perlas se agregan al ADN y se homogeneizan lentamente con ayuda de la pipeta. La mezcla se deja incubar durante cinco minutos.

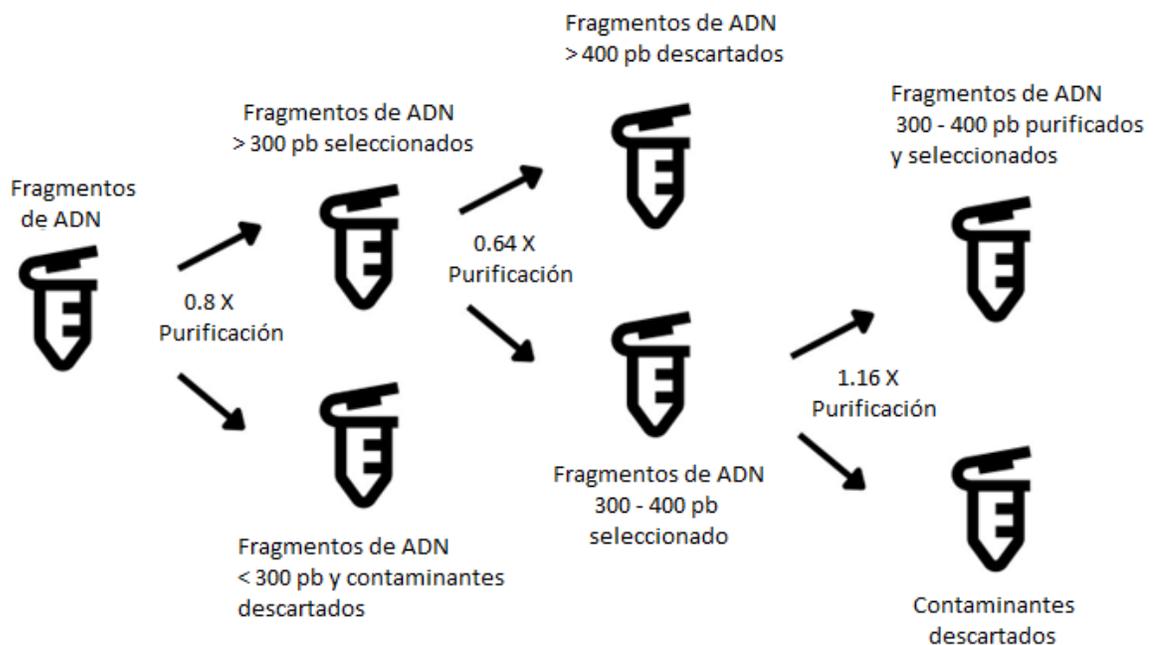
12.- Los tubos con la mezcla de ADN y perlas magnéticas se colocan en una placa magnética (a partir de este paso, los tubos no se quitan de la placa magnética). La mezcla se deja incubar durante 2 minutos, esto es para que las perlas se adhieran al magneto.

13.- Con ayuda de la pipeta se extrae el sobrenadante, evitando perturbar o extraer las perlas magnéticas. El sobrenadante es colocado en un tubo nuevo (Este tendrá el ADN entre 300-400 pb).

14.- A partir del sobrenadante se calcula el volumen en  $\mu\text{l}$  de perlas AMPure necesarias para la purificación, utilizando la proporción 1.6X.

15.- Se repiten los pasos del 3-9, sólo cambia que se agregan 45  $\mu\text{l}$  de agua grado molecular.

16.- El resultado de la purificación del ADN se observa utilizando un gel de Agarosa-Synergel Diversified Biotech al 1%, en el cual se siembran 5  $\mu\text{l}$  de ADN. Finalmente, se cuantificaron los nanogramos totales de ADN purificados.



**Figura. 20** Esquema del método de selección de tamaño de fragmentos de ADN de doble purificación con perlas magnéticas.

## Anexo E.

**Tabla 7.** Parámetros utilizados para la obtención de genotipos con el software STACKS.

Módulo	Parámetro	Descripción
<i>Process_radtags</i>	-c	<i>Clean data.</i> Remueve los fragmentos con bases no identificadas por el secuenciador.
	-q	Elimina las secuencias de calidad menor al umbral deseado. Se usó el umbral de <i>phred score</i> de 30.
	-r	Recupera fragmentos cuyo <i>barcode</i> o sitio de corte posee 1 diferencias como máximo de lo esperado( <i>default</i> ).
	-t	Corta las secuencias para evitar errores de secuenciación comúnmente producidos por el secuenciador hacia el fin de los fragmentos. Se usó $t = 140$ pb.
<i>ustacks</i>	m	Profundidad mínima (X) para crea un <i>stacks</i> . Se usó una $m = 5$
	M	Número de diferencias permitidas entre fragmentos dentro de cada individuo para formar un stack (posible alelo). $M = 4$ .
	n	Número de diferencias permitidas entre alelos de individuos para ser considerados como un RAD locus (conjunto de fragmentos homólogos). $n = 4$ .
<i>Populations</i>	min_maf	Frecuencia del alelo menor. Proporción mínima de representación del alelo en la población para incluir el SNP que los contiene. $min\_maf = 0.5$ .
	-r	Frecuencia mínima de representación de los SNP's en los individuos. Se seleccionaron los SNP's presentes en al menos 90% de los individuos.
	-p	Número mínimo de localidad en que los SNP's deben presentarse. $p = 1$ .
	write_random_snp	Selecciona un único SNP por RAD locus, para minimiza los SNP's con desequilibrio de ligamiento.

## Anexo F.

---

Parámetros utilizados para realizar el filtrado del software en VCFTools.

*--max-missing 0.5*: Se mantiene solamente las variantes que han sido genotipadas correctamente en el 50% de los individuos.

*--mac 3*: Se filtran los SNP's que presenten un conteo menor a 3 alelos.

*--minQ 30*: Se mantienen las variantes con un valor mínimo de calidad de 30.

*--min DP 40*: Se mantienen las variantes genotipadas con una profundidad media de 40.

*--max-missin 0.95*.

*--maf 0.05*