

Tesis defendida por

Mariana RONALDA Ferrera Rodríguez

y aprobada por el siguiente Comité

---

Dr. Axayácatl Rocha Olivares

Co director del Comité

---

Dr. Juan Carlos Pérez Jiménez

Co director del Comité

---

Dr. Oscar Sosa Nishizaki

Miembro del Comité

---

Dr. Miguel Ángel del Río Portilla

Miembro del Comité

---

Dra. María Lucila del Carmen Lares Reyes

Coordinador

del Posgrado en Ecología Marina

---

Dr. Jesús Favela Vara

Director de la

Dirección de Estudios de Posgrado

Marzo 2014

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA**



---

**Programa de posgrado en ciencias  
en Ecología Marina**

---

**Patrones filogenéticos del género *Mustelus* en el Pacífico nororiental**

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

Presenta:  
Mariana RONALDA Ferrera Rodríguez

Ensenada, Baja California, México  
2014

Resumen de la tesis de Mariana RONALDA Ferrera Rodríguez, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ecología Marina.

Patrones filogenéticos del género *Mustelus* en el Pacífico nororiental

Resumen aprobado por

---

Dr. Axayácatl Rocha Olivares

El género *Mustelus* está constituido por aproximadamente 27 especies costeras. Debido a su morfología poco variable y al traslape de los caracteres comúnmente utilizados en la identificación de tiburones, su sistemática y taxonomía es considerada problemática. Al igual que en otras especies de tiburones los estudios filogenéticos son escasos. En el presente estudio, se realizó una reconstrucción filogenética de 17 especies de *Mustelus* incluyendo a las especies presentes en el Pacífico nororiental *M. californicus*, *M. lunulatus*, *M. henlei* y *M. albipinnis*, esta última de reciente descripción. Para ello se usaron secuencias de ADN de los genes mitocondriales ND2 y ND4 (Nicotinamida Adenina Dinucleotido Deshidrogenasa), y de los nucleares RAG1 (gen nuclear activador de recombinación) e ITS2 (espaciador transcrito interno 2). El análisis se hizo mediante los métodos de neighbor joining (NJ), máxima parsimonia (MP), máxima verosimilitud (MV) y análisis bayesianos que incluye el cálculo de los tiempos de divergencia. El análisis filogenético obtenido con los genes ND2 y ND4 resolvió satisfactoriamente la mayoría de las relaciones entre las especies, lo que indica que estos marcadores son adecuados para resolver divergencias recientes. Respecto a las especies del Pacífico *M. henlei* y *M. albipinnis* son filogenéticamente más cercanas a *M. canis* y *M. norrisi* presentes en el Atlántico, mientras que *M. californicus* y *M. lunulatus* son especies hermanas concordando con el uso de hábitat. La resolución filogenética con los marcadores nucleares fue menor, sin embargo se corroboraron algunos patrones obtenidos en la filogenia de genes mitocondriales. La estimación de los tiempos de divergencia, indican una separación de 18 millones de años (m.a) para los dos clados principales, mientras que dentro de cada clado la divergencia se dio entre los 4 y 8 m.a para la mayoría de las especies. Adicionalmente se estimó la diversidad nucleotídica de los cuatro genes en la que se obtuvieron valores promedio relativamente bajos  $\pi=0-0.0058$  para los genes mitocondriales y de igual manera para los genes nucleares  $\pi=0-0.67$ .

Palabras claves: **sistemática molecular, especiación, ADNmt, reloj molecular**

Abstract of the thesis of Mariana RONALDA FERRERA RODRIGUEZ presented as partial requirement to obtain the degree on Master in Science in Marine Ecology .

Phylogenetic patterns of the genus *Mustelus* in the northeast Pacific

Abstract approved by

---

Dr. Axayácatl Rocha Olivares

The genus *Mustelus* includes nearly 27 coastal species, because of their high morphological similarity and overlap of morphometric and meristic characters commonly used in shark identification, its taxonomy and systematics are considered problematic. Like in other sharks, phylogenetic studies are scarce. Here we carried out a phylogenetic reconstruction of 17 species of *Mustelus*, including those distributed in the eastern Pacific: *M. californicus*, *M. lunulatus*, *M. henlei*, and the recently described *M. albipinnis*. Data consisted of DNA sequences from two mitochondrial genes ND2 (NADH dehydrogenase subunit 2) and ND4 (NADH dehydrogenase subunit 4), and two nuclear genes RAG1 (recombination-activating gene1) and ITS2 (internal transcribed spacer 2). Phylogenetic analyses were carried out using neighbor joining (NJ), maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML) and a Bayesian approach which includes divergence time estimation. The topology obtained with ND2 and ND4 resolve successfully nearly all relationships among species, suggesting that these genes are appropriated for recent divergence. These data supported the monophyly of *M. henlei*, *M. albipinnis* and the Atlantic species *M. canis* and *M. norrisi*, whereas *M. californicus* and *M. lunulatus* resulted as sister species, which agree with their habitat use. Although nuclear genes have less phylogenetic resolution, the nuclear trees are congruent with those from mitochondrial. The estimation of divergence times shows a divergence in two principal clades about 18 M.Y. Within each clade, divergence occurs between 4 and 8 M.Y. In addition we estimated nucleotide diversity ( $\pi$ ), which resulted in low average levels  $\pi=0-0.0058$  for mitochondrial genes and  $\pi=0-0.67$  for nuclear genes.

**Key words: molecular systematics, speciation, mtDNA, molecular clock**

## **Dedicatoria**

Al **AMOR** de los **AMORES**, gracias Dios mío por darme la vida y todas tus bendiciones en cada momento, por acompañarme y darme la fuerza para caminar.

A mi Madre del cielo la Virgen María que con tu dulzura me alegras los momentos más difíciles.

A mis padres Ronald Ferrera Cerrato y María del Socorro Rodríguez, son el mejor regalo que la vida me ha dado, son mi fuerza, alegría y el mejor ejemplo que puedo tener y seguir.

Mamá, tu sonrisa y gran corazón me iluminan en cada paso que doy y tu espíritu aventurero me llena de energía y felicidad para salir a explorar el mundo. Papá tu inmenso amor y honestidad en cada acción que realizas son mi gran inspiración para mejorar en todos los aspectos de mi vida. Gracias por su amor, toda la entrega y sacrificio que han hecho para que yo pudiera seguir adelante y alcanzar mis sueños. Los amo infinitamente.

A mis hermanas del alma Ofelia y Elena ¿Qué haría yo sin ustedes? Son las mejores, la sonrisa de mis labios. Las amo con todo mi corazón.

A mi sobrina María Beatriz por permitirme ver esa hermosa carita y maravillarme con tus travesuras. Al angelito que viene en camino, estoy ansiosa de conocerte!

A mis abuelos María Elena Mendoza Benjamín Rodríguez Ofelia Cerrato y Daniel Ferrera y a mis tíos Rosario Ferrera y Danielito Ferrera que desde el cielo guían mis pasos.

## **Agradecimientos**

Al Dr. Axayácatl Rocha Olivares por compartir su gran experiencia como investigador, y guiarme con paciencia en este emocionante proyecto.

Al Dr. Juan Carlos Pérez Jiménez por su apoyo y disposición en la codirección de mi tesis, gracias por su amable trato y confianza, aun a distancia.

Al Dr. Oscar Sosa Nishizaki, por enriquecer con su conocimiento el presente trabajo y apoyarme en diferentes momentos de mi maestría con palabras de consejo y buen sentido del humor.

Al Dr. Miguel Ángel del Rio Portilla, por su valiosa aportación a este trabajo, por enseñarme en cada avance de tesis que siempre hay algo que preguntar.

Al CONACYT por otorgarme la beca para poder realizar mi maestría y disfrutar de la bella Ensenada.

Al CICESE por brindarme la oportunidad de desarrollarme como profesionista por medio de un excelente personal académico y administrativo.

A mi hermosa familia Rodríguez sé que su amor me acompaña siempre. Mis tías Lolita, Nieves, Beatriz, Lulú las mejores del mundo y mis tíos: Rubén mi cómplice preferido, Benjamín la distancia no disminuye el amor. Alberto el tío de los suaves consejos. Rafa poniéndole sabor al caldo con tu alegre forma de ser. Mis primos! Miriam, Evelyn Mayra, María de Lourdes, Claudia Alejandra, Rodrigo, Rubén y Erick son lo máximo!!!. Mis queridos sobrinos: Faviola, Paulina Victoria, María Fernanda, Alan, Antonio, Guillermo, Benjamín, Jerónimo, Deborah y el nuevo Benjamín también los llevo en el corazón.

Por supuesto a mi muy querida familia Ferrera que desde la hermosa Honduras recibo sus oraciones.

A mis amigos Ana Laura Avelar, Luis Fernando Dávila, Socorro Mirna, Joel Iglesias, Jassive Ruiz y Silvia Núñez. La amistad es para siempre.

A mis hermanas Adriana Puga y Paulina Díaz, quien diría lo que un inocente pandero puede ocasionar. Apostolado de la Cruz por siempre!!!

A mis amigos y compañeros del fantástico laboratorio de Ecología Molecular: Geovana León, Anita Castillo, Nancy Saavedra, Francesco Cicala, Erick Oñate y por supuesto mí querido Pablo Suarez de verdad muchas gracias por todo el apoyo que me han dado, me hicieron sentir en casa desde el primer día, guiándome en el loco mundo de la biología molecular. Ivonne Martínez, Celia Bisbal y Argelia llevamos un poco menos de conocernos sin embargo creo que hemos hecho una bonita amistad.

Porque en caminos diferentes el cariño también perdura, Oscar Esparza, para ti lo mejor.

Mis queridas amigas: Adriana Hernández, Rosa Isela Tovar, Melissa Ronderos, Carolina Castañeda, Laura Lucio y Lupita Hernández de verdad ha sido una gran alegría el poder conocerlas y compartir nuestro camino, las amo muchísimo. Mis muchachos Gerardo Aldecoa, Oscar Hernández, Manuel Matías, el buen Marlon Verdesoto, Juan Carlos Rubio y no menos importante nuestro querido Tori. JUNTOS HASTA EL FINAL!!!

## Contenido

Resumen .....	ii
Abstract.....	iii
Lista de figuras .....	ix
Página.....	ix
Lista de tablas .....	ii
Página.....	ii
1 Introducción.....	1
1.1 Sistemática molecular .....	2
2 Antecedentes.....	6
2.1 Estudios taxonómicos y filogenéticos del género <i>Mustelus</i> .....	7
2.2 Mecanismos de especiación.....	10
2.3 Importancia comercial y conservación .....	11
3 Justificación.....	12
4 Hipótesis .....	12
5 Objetivos.....	12
5.1 Objetivo general.....	12
5.2 Objetivos particulares .....	12
6 Materiales y métodos.....	13
6.1 Área de estudio .....	13
6.2 Obtención de muestras.....	14
6.3 Trabajo de laboratorio .....	15
6.3.1Extracción de ADN.....	15
6.3.2 Amplificación.....	15
6.3.2.1ADN mitocondrial .....	15



6.3.2.2 ADN nuclear.....	16
6.4 Análisis de datos .....	16
6.4.1 Variabilidad genética.....	17
6.4.2 Modelos de sustitución nucleotídica .....	17
6.4.3 Análisis filogenéticos .....	17
6.4.4 Estimación de los tiempos de divergencia .....	18
7 Resultados.....	19
7.1 Secuencias de ADN .....	19
7.2 Diversidad genética.....	21
7.3 Modelos de sustitución .....	21
7.4 Reconstrucción filogenética.....	22
7.4.1 ADNmt.....	22
7.4.2 ADN nuclear .....	25
7.5 Tiempos de divergencia .....	28
8 Discusión .....	28
8.1 Análisis filogenético .....	29
8.1.1ADNmt.....	29
8.1.2 ADN nuclear .....	34
8.3 Tiempos de divergencia y escenarios de especiación .....	36
8.4 Perspectivas en el estudio de la especiación .....	40
Conclusiones.....	41
Referencias bibliográficas .....	42

## Lista de figuras

Figura		Página
1	Relaciones y características entre los modelo de sustitución nucleotídica	5
2	Morfología. Morfología externa de <i>Mustelus</i>	6
3	Análisis de discriminantes derivado de 10 variables morfométricas <i>M. henlei</i> , <i>M. californicus</i> , <i>M. lunulatus</i> <i>M. albipinnis</i> .	8
4	Hipótesis filogenéticas del genero <i>Mustelus</i> reconstruidos con ADNmt.	9
5	Ubicación de la zona de estudio en la región del Alto Golfo de California, áreas sombreada corresponden a las zonas de pesca artesanal..	14
6	Filogenia del género <i>Mustelus</i> reconstruida por medio de análisis Bayesiano y basado en las secuencias concatenadas de los genes mitocondriales ND2 y ND4	24
7	Filogenia <i>Mustelus lunulatus</i> , <i>M. californicus</i> , <i>M. albipinnis</i> , <i>M. henlei</i> , <i>M. griseus</i> , <i>M. widodoi</i> , <i>M. lenticulatus</i> , <i>M. antarcticus</i> , <i>M. manazo</i> obtenida mediante análisis bayesiano, del gen nuclear RAG1	26
8	Filogenia de cuatro especies del Pacífico oriental de <i>M. lunulatus</i> , <i>M. californicus</i> , <i>M. albipinnis</i> , <i>M. henlei</i> obtenida por medio del análisis bayesiano, basado en las secuencias del gen nuclear ITS2	27
9	Árbol ultramétrico obtenido asumiendo un reloj molecular mediante el programa BEAST.	28
10	Hipótesis sobre la filogenia de <i>Mustelus</i> , obtenidas mediante genes mitocondriales ND2 ND2, ND4 y cytB;	29
11	Hipótesis sobre la filogenia de <i>Mustelus</i> en el IndoPacífico y Australasia a partir de genes mitocondriales ND2, ND4 y CR	30

**Lista de tablas**

Tabla		Página
1	Número de haplotipos por especie para los genes mitocondriales ND2 y ND4 y nucleares ITS2 y RAG1.	19
2	Diversidad nucleotídica $\pi$ obtenida para cada locus en las especies de <i>Mustelus</i> del Pacífico orienta	21
3	Modelos de sustitución seleccionados por los criterios de información AICc y BIC. Frecuencias de nucleótidos y tasa de transición y transversión.	22
4	Distribución geográfica y modos de reproducción de las especies incluidas en el presente análisis	33
5	Comparación de datos ecológicos y morfológicos de las especies de <i>Mustelus</i> presentes en el Pacífico Nororiental	40

## 1 Introducción

En los últimos años, los estudios sobre la biodiversidad y taxonomía de elasmobranquios han aumentado considerablemente, debido a un incremento en la descripción de especies y a su vez, a los efectos nocivos que la presión pesquera y la destrucción del hábitat tienen sobre sus poblaciones (Naylor et al. al. 2012).

La diversidad es resultado de una historia de ancestría y descendencia, la cual puede reconstruirse por medio de análisis filogenéticos (Gregory 2008). Las filogenias, por su parte, nos permiten entender la evolución de los caracteres adaptativos en diferentes linajes, como es el caso de los modos de reproducción ampliamente diversificados en este grupo de peces (Musick y Ellis 2005).

A pesar de tener una larga historia evolutiva, el conocimiento filogenético de los tiburones presenta problemas en diferentes niveles taxonómicos. A nivel de órdenes, la resolución es mayor que lo encontrado a nivel de familia o género (Vélez-Zuazo y Agnarsson 2011). Tal es el caso del orden Carcharhiniformes, cuya monofilia se encuentra bien sustentada por datos morfológicos y moleculares, sin embargo las relaciones dentro del orden no están resueltas debido a una gran cantidad de convergencias y reversiones evolutivas (Iglésias et al. al. 2005).

Dentro de la familia Triakidae, *Mustelus* es el género más diverso y un importante recurso pesquero en varios países. Sin embargo, su sistemática y taxonomía son problemáticas, debido a la poca variabilidad morfológica y al traslapo de caracteres utilizados comúnmente en la identificación de tiburones (López et al. 2006, Pérez-Jiménez et al. 2012).

Algunas dificultades en su sistemática pueden estar asociadas a una reciente radiación (Boomer et al. 2012), por lo que es importante conocer los mecanismos de especiación. El escenario básico de especiación involucra tres fases: la separación de una población en subpoblaciones o unidades menores, la acumulación de diferencias genéticas y la posterior evolución de barreras reproductivas que impidan el intercambio genético (Palumbi 1994).

En un contexto geográfico se han propuesto cuatro modelos de especiación: alopátrico, peripátrico, parapátrico y simpátrico. Los primeros dos enfatizan el aislamiento geográfico mientras que para los últimos se consideran las diferencias ecológicas como el punto medular por el que se alcanza la especiación. Debido a la gran complejidad de las relaciones espaciales entre poblaciones, 'el contexto geográfico' debe considerarse como uno de los factores que encaminan la especiación mas no el único (Network 2012). La especiación alopátrica es considerada como el

modo dominante de especiación debido a la relativa facilidad para la evolución de adaptaciones ecológicas, de comportamiento y reproductivas en ausencia del flujo genético. Sin embargo, en ambientes marinos las barreras físicas al flujo génico son pocas, por lo que la limitación del flujo génico entre poblaciones puede estar más relacionado con las diferencias en las condiciones oceanográficas, comportamiento o especialización del hábitat (Palumbi 1994). Lo anterior se ha observado en especies hermanas de invertebrados y otras especies crípticas cuyas distribuciones se traslapan a lo largo de la costa (Norris y Hull 2012).

En el Golfo de California se ha observado que las especies del género *Mustelus* presentan diferencias en el uso del hábitat. Con base en datos de captura se sabe que *M. californicus* y *M. lunulatus* son más frecuentes en profundidades entre 10 y 100m, mientras que *M. henlei* y *M. albipinnis* se capturan a más de 100m (Castro-Aguirre et al. 2005, Pérez Jiménez et al. 2005). También hay una diferencia en los hábitos alimentarios. Por ejemplo, aunque *M. californicus* y *M. lunulatus* comparten el 86% de las presas (principalmente crustáceos), la proporción de consumo difiere entre especies (Méndez-Loeza 2004). En cambio, *M. henlei* y *M. albipinnis* consumen principalmente peces mictófidios los cuales se encuentran a mayores profundidades (Pérez-Jiménez, com. per.). Estas diferencias en la alimentación se reflejan en la variación morfológica de los dientes; en el caso de *M. californicus* y *M. lunulatus* son mayormente molariformes o con cúspide muy redondeada y baja, adecuados para la trituración de crustáceos, mientras que *M. henlei* y *M. albipinnis* presentan una cúspide mucho más marcada, más apropiados para la alimentación de peces (Pérez Jiménez et al. 2005). El conjunto de estas diferencias podrían haber resultado de un evento de especiación ecológica.

### **1.1 Sistemática molecular**

El uso de diversas técnicas moleculares ha permitido utilizar secuencias de macromoléculas (ADN, ARN o proteínas) para resolver la sistemática y patrones evolutivos de diversos taxa, ya que estos caracteres tienden a poseer una fuerte señal filogenética (Avice 1994). El uso generalizado de secuencias moleculares en el estudio de la sistemática ha llevado al desarrollo de la sistemática molecular, lo que ha permitido no sólo estudiar a las especies dentro de un marco filogenético si no también la evolución de los mismos genes y las relaciones entre poblaciones de la misma especie (Martínez- Castilla 2007). A la par del desarrollo biotecnológico, la mejora en

el ámbito analítico de datos ha permitido el desarrollo de métodos con mayor precisión para las reconstrucciones filogenéticas.

Los métodos de reconstrucción filogenética pueden dividirse en dos grupos, aquellos basados en distancias, también conocidos como métodos algorítmicos y los basados en caracteres. Los primeros se basan únicamente en la distancia genética entre las secuencias para la construcción y selección del árbol que explique mejor las relaciones filogenéticas de los taxa analizados; aquí se incluyen el método de neighbor joining y el de mínima evolución, mientras que los segundos, optimizan la distribución de los patrones para cada carácter, en este grupo se encuentran el método de parsimonia, máxima verosimilitud y el de inferencia bayesiana (Martínez- Castilla 2007). En el análisis de máxima parsimonia, la filogenia se infiere a partir del árbol que involucre el menor número de cambios evolutivos, disminuyendo así la presencia de caracteres homoplásicos (Swofford et al.1996). El método de máxima verosimilitud evalúa la probabilidad de observar los datos que consiste en el alineamiento obtenido, dado el modelo evolutivo propuesto (probabilidad de los datos bajo el modelo), posteriormente las filogenias se infieren encontrando los arboles con el mayor valor de verosimilitud (log-likelihood). Este valor representa la probabilidad condicional de los datos observados dada una topología ( $\tau$ ), conjunto de longitudes de rama ( $v$ ) y modelo de sustitución ( $\phi$ ) (Swofford et al. 1996;-Martínez- Castilla 2007).

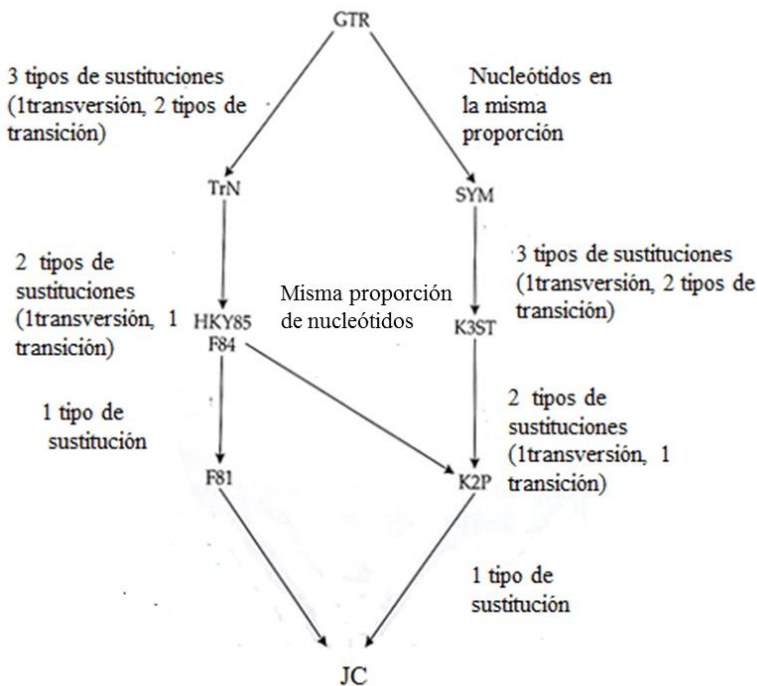
En el análisis bayesiano no se busca una sola topología óptima sino una población de árboles muestreados en función de su probabilidad posterior (pP). Esta inferencia se basa en la relación entre la función de verosimilitud y las distribuciones anteriores y posteriores de la probabilidad según el teorema de Bayes. A diferencia del método de máxima verosimilitud en el que se calcula la probabilidad de los datos dado el modelo, el enfoque bayesiano estima la probabilidad posterior de la hipótesis (árbol + modelo) dados los datos (modelo de sustitución y alineamiento), por lo que puede interpretarse como la probabilidad de que dicho árbol sea correcto.

Tanto las reconstrucciones basadas en máxima verosimilitud y aproximaciones bayesianas ofrecen un resultado robusto, aunque el análisis bayesiano permite el uso de modelos evolutivos más complejos y el análisis secuencias de ADN y aminoácidos en conjunto con patrones de enzimas de restricción y datos morfológicos (Martínez- Castilla 2007).

El soporte estadístico de las relaciones filogenéticas se realiza generalmente mediante un análisis de bootstrap no paramétrico, el cual estima la varianza asociada a una distribución muestral desconocida. Este método realiza remuestreos con reposición al azar de los datos originales, formando nuevos sets de datos, en donde quedan representados diferentes puntos del set original (ramas del árbol) una o varias veces. El porcentaje en el que aparecen las mismas ramas en los diferentes árboles es la confiabilidad de la topología. Este análisis se realiza en reconstrucciones de máxima parsimonia y máxima verosimilitud (Swofford et al.1996). En los análisis bayesianos la confiabilidad de la filogenia, se obtiene mediante el muestreo de toda la probabilidad posterior de las filogenias posibles y posteriormente discernir los elementos comunes a los árboles con probabilidades mayores. (Martínez- Castilla 2007).

Tanto en el análisis de máxima verosimilitud como el bayesiano se necesita de un modelo evolutivo explícito. La descripción de cómo y con qué probabilidad ocurren los procesos de evolución molecular, es decir los cambios mutacionales, se estima a través de modelos de sustitución, cuya idea fundamental es que ciertas mutaciones pueden ser más frecuentes que otras. Los modelos también especifican la proporción en que se encuentran los diferentes nucleótidos.

El modelo de sustitución más simple es el de Jukes Cantor (JC), el cual considera que las cuatro bases nucleotídicas tienen la misma frecuencia y que todas las sustituciones son igualmente probables. A partir de este modelo, la inclusión y variación de parámetros genera una serie de diferentes modelos con un mejor ajuste a los datos. Algunos de los modelos más utilizados en filogenia (Fig. 1) son el de Kimura (K2P), en el cual estima que las transiciones son más frecuentes que las transversiones; el modelo de Felsenstein (F81) que considera una diferente proporción de nucleótidos; los modelos de Hasegawa, Kishino y Yano (HKY85) y el de Kishino y Hasegawa los cuales permiten diferencias en la proporción de transiciones y transversiones y de composición nucleotídica. Finalmente, los modelos GTR (General Time Reversible) son lo más complejos y con el mayor número de parámetros; no sólo permiten frecuencias desiguales de nucleótidos, sino también que especifican individualmente cada una de las seis posibles rutas de sustitución (Martínez- Castilla 2007).



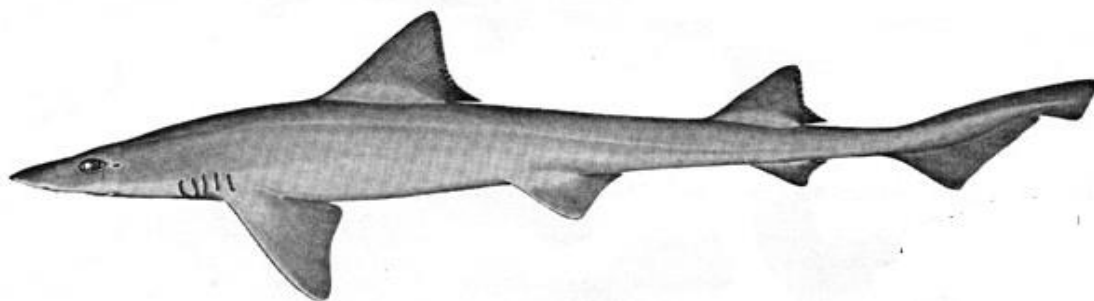
**Figura 1. Relaciones y características entre los modelos de sustitución nucleotídica, las flechas indican las restricciones para ir obteniendo los diferentes modelos a partir del supuesto de los modelos más generalizados y con el mayor número de parámetros (GTR). Modificado de Swofford et al. 1996, p. 434.**



En este estudio se realizó un análisis filogenético del género *Mustelus*, utilizando secuencias de ADNmt (ADN mitocondrial) y nuclear con la ayuda de diferentes métodos de reconstrucción filogenética.

## 2 Antecedentes

El género *Mustelus* está conformado por 27 especies de tiburones de tallas menores a los 200 cm (60-170 cm LT) con cuerpo delgado, ojos grandes y ovalados, dientes con una cúspide pequeña, aletas dorsales sin espina y una segunda aleta dorsal aproximadamente de  $\frac{3}{4}$  del tamaño de la primera aleta dorsal (Fig. 2). Su reproducción es vivípara placentada y aplacentada. Se encuentran asociados al fondo marino sobre la plataforma, en donde se alimentan principalmente de crustáceos, moluscos, poliquetos y peces pequeños (Pérez Jiménez 2006).



**Figura 2. Morfología. Morfología externa de *Mustelus*. Vista lateral *M. henlei*. Tomada de U.S.Fish and Wildlife Service Field Guide to Eastern Pacific and Hawaiian Sharks, recuperado de <http://www.flmnh.ufl.edu/fish>**

La mayoría presenta una amplia distribución aunque existen seis especies endémicas: *M. palumbes* en el sureste de África, *M. ravidus* y *M. walkeri* en Australia, *M. widodoi* en Indonesia, *M. schmitti* presente en Brasil y Argentina y *M. lenticulatus* en Nueva Zelanda.

En el Golfo de California se distribuyen cuatro especies: *Mustelus californicus*, *M. henlei*, *M. lunulatus* y *M. albipinnis*. La distribución de *M. californicus* se extiende desde la Bahía de Monterey, California (36°N y 121°O) hasta el Golfo de California (23°N y 107° O), *Mustelus henlei* se distribuye antitropicalmente desde San Francisco (37°N y 122°O) hasta el Golfo de California (23°N y 107° O) y desde Perú (0°S y 68°O) hasta Chile (33°S y 70° O). *Mustelus lunulatus* se distribuye desde Baja California (32° N y 119° O) hasta Ecuador (Compagno 1984), mientras que *M. albipinnis* es una especie de reciente descripción, con una distribución aparentemente antitropical (Castro-Aguirre et al. 2005; Pérez Jiménez et al. 2005)

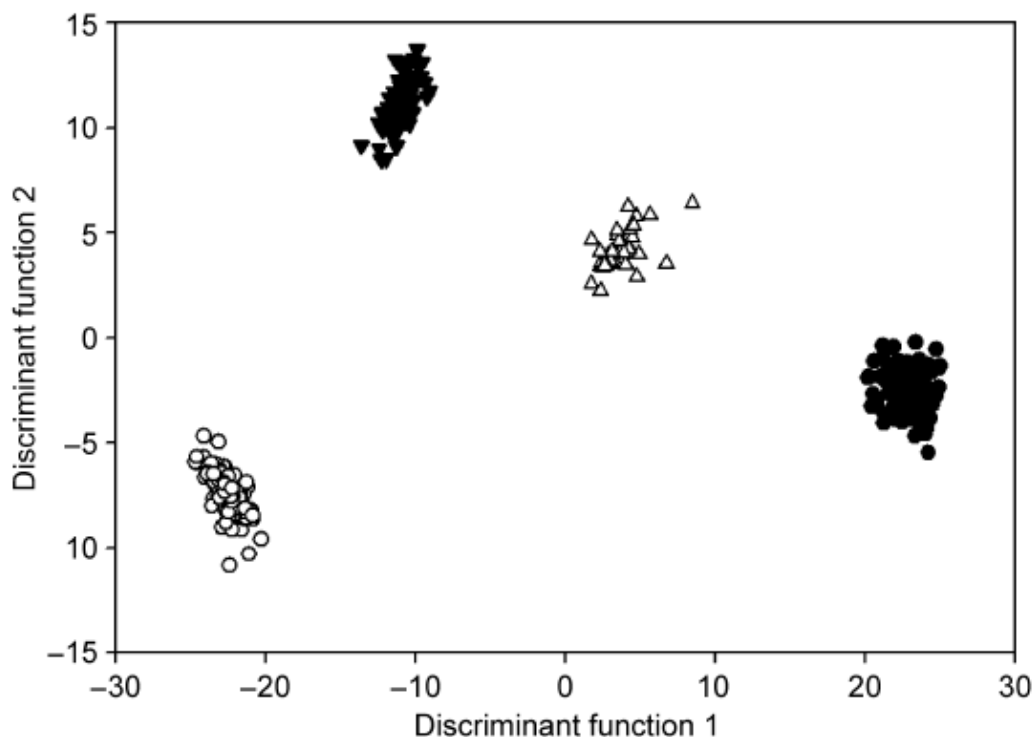
Heemstra (1973) señaló la presencia de otras dos especies tropicales de *Mustelus* no descritas, distribuidas desde el Golfo de California hasta Ecuador y las Islas Galápagos; sin embargo, esta información no fue publicada. Posteriormente se confirmó en el Golfo de California que una de estas especies no descritas corresponde a *M. albipinnis* (Pérez Jiménez 2006, Pérez Jiménez et al. 2005). Además se ha registrado en Bahía Magdalena (Castro-Aguirre et al. 2005) y recientemente en las islas Galápagos (Acuña-Marrero et al. 2013) .

## **2.1 Estudios taxonómicos y filogenéticos del género *Mustelus***

El género *Mustelus* fue descrito por primera vez en 1790 (Linck) y en los años posteriores ha tenido diversas revisiones taxonómicas debido a la falta de consenso en los caracteres que lo definen (Compagno 1984).

La similitud morfológica entre las especies de *Mustelus*, así como la gran variabilidad de los caracteres morfométricos y merísticos han dificultado su correcta identificación (Compagno 1984).

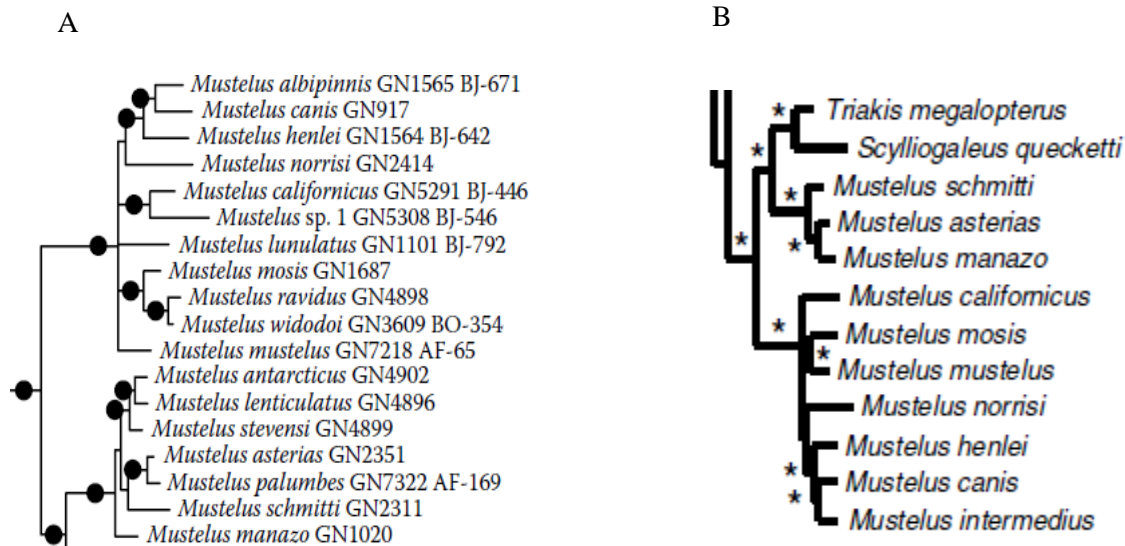
Análisis morfométricos recientes en el Atlántico y Golfo de California, indican que las medidas cefálicas y estructuras relacionadas, como los surcos labiales, distancia internarinal, longitud y ancho de la boca y el diámetro orbital son útiles en la identificación de estas especies (Fig.3) (Pérez Jiménez et al. 2005, Rosa y Gadig 2010). Estas diferencias son apoyadas por datos moleculares, como los RFLPs (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción) del gen ribosomal ITS2 (espaciador transcrito interno 2) (Pérez-Jiménez et al. 2012).



**Figura 3. Análisis de discriminantes derivado de 10 variables morfométricas *M. henlei* (●), *M. californicus* (○), *M. lunulatus* (▼) *M. albipinnis* (Δ). Tomado de Pérez-Jiménez et al., 2012,p.2**

Respecto a la filogenia del género, el conocimiento es escaso, sin embargo, con el análisis de los genes mitocondriales Nicotinamida Adenina Dinucleótido Deshidrogenasa subunidades 2 y 4 (ND2 y ND4), Región control (CR) y el gen nuclear activador de recombinación (RAG1) se ha podido avanzar en la sistemática de *Mustelus*. Con base en estos análisis, se ha determinado que con la definición actual del género, éste no constituye un grupo monofilético y se ha propuesto la inclusión de *Triakis megalopterus* y *Scylliogaleus queckettii* (López et al. 2006, Naylor et al. 2012). No obstante, las relaciones filogenéticas entre algunas de las especies no se encuentran resueltas, como las especies presentes en el Atlántico y en el Pacífico (Fig.4).

Desde el punto de vista taxonómico se ha sugerido con anterioridad la separación en dos géneros según el modo de reproducción, sin embargo la falta de conocimiento en la biología reproductiva no sustentaba esta reestructuración (Compagno 1984), esto es sugerido nuevamente por López et al. (2006) y Boomer et al. (2012) al confirmar la monofilia de estos grupos.



**Figura 4. Hipótesis filogenéticas del género *Mustelus* reconstruidos con ADNmt. (A) Filogenia obtenida por análisis bayesiano basada en el gen ND2 (1044pb), los círculos negros indican probabilidades posteriores mayores al 95% (Naylor et al., 2012, p 39 ). B) Filogenia obtenida con el método de máxima verosimilitud basada en los genes *Cy tb*, *ND2* y *ND4* , los asteriscos indican valores de bootstrap mayores a 80% (López, et al. 2006, p.54).**

El género *Mustelus* presenta niveles relativamente bajos de divergencia genética (mtDNA:2.36–9.64%; RAG1: <0.5–1.28%), que concuerdan con la poca variabilidad morfológica (López et al. al. 2006). Estos niveles de divergencia podrían indicar hibridación o un arreglo incompleto de linajes, que se ve favorecido por la similitud en la distribución geográfica de las especies (López et al. al. 2006). El arreglo incompleto de linajes es relativamente común en especies de reciente formación (Maddison y Knowles 2006). Se estima que las especies actuales de *Mustelus* divergieron hace aproximadamente 13 millones de años (m.a) y algunas como *Mustelus lenticulatus* hace sólo 1.3 m.a (Boomer et al. 2012).

## 2.2 Mecanismos de especiación

La biodiversidad puede ser explicada como un balance entre extinción y especiación por lo que la especiación es un tema central de la biología evolutiva (Network 2012). Debido a que es un proceso que ocurre a través del tiempo, las especies en formación enfrentan diferentes cambios en su ambiente, los cuales a lo largo de su historia evolutiva afectan su diversidad genética, tamaño poblacional y distribución geográfica (Norris y Hull 2012).

Aunque la presencia de barreras geográficas es menor en ambientes marinos, eventos importantes de restructuración geológica han sido motor de especiación para varias especies de tiburones como es el caso de la familia Orectolobidae, para la que se ha propuesto un modelo vicariante ligado a la colisión de las placas de Indo Australia y Eurasia y a la complejidad geográfica durante el Mioceno (Corrigan y Beheregaray 2009). De manera similar, la divergencia de los tiburones costeros *Negaprion brevirostris* y *N. acutidens* es mejor explicada en un escenario vicariante, relacionado al cierre del mar de Tetis (12-20 millones de años), contrastando con una hipótesis de dispersión del Indopacífico al Pacífico Este, a través de la Barrera del Pacífico Este y posteriormente hacia el Atlántico (Schultz et al. 2008).

Para las especies de *Mustelus* presentes en el Indo Pacífico y Australasia, se propone un modelo de dispersión de norte a sur durante el Pleistoceno (3 m.a) ya que las barreras biogeográficas presentes, anteceden en tiempo (50-80 m.a) a la divergencia de estas especies (Boomer et al. al. 2012).

Las especies distribuidas en el Golfo de California presentan características en su historia de vida a partir de las cuales se puede inferir que el uso diferencial del hábitat ha influido de manera importante en su divergencia. El uso del hábitat en tiburones suele estar asociado a un comportamiento complejo como la formación de jerarquías sociales y segregación por edad y sexo. La selección de hábitat se da en respuesta a factores abióticos y ecológicos como la disponibilidad de alimento, protección contra la depredación o inclusive factores fisiológicos con efecto en la reproducción (Sims 2003), lo que a lo largo de miles de años podría restringir el flujo genético y propiciar la especiación.

### 2.3 Importancia comercial y conservación

Los tiburones son un importante recurso en varios países, sosteniendo diversas pesquerías. Son explotados principalmente por su carne, la cual es una fuente de proteína de bajo costo; por sus aletas, las cuales representan uno de los productos más caros en las pesquerías; y por el aceite de hígado, utilizado en farmacéutica y cosméticos (Vannuccini 1999).

En México la producción total en 2012 fue de 21,274 toneladas anuales, destinándose al consumo humano (CONAPESCA, 2012). La pesca dirigida se realiza en diferentes ambientes, registrándose aproximadamente 50 especies, de las cuales en el Pacífico Norte el género *Mustelus* es comúnmente explotado (CONAPESCA-INP 2004 ). En el Golfo de California los desembarques de este género, llegan a representar hasta el 80% de la captura por pesca artesanal (Bizarro et al. 2007, Marquez-Farias 2000) y de las cuatro especies presentes, *M. californicus* y *M. lunulatus* se pescan durante todo el año (Santana-Morales et al. al. 2004).

Como medidas de regulación en México, a partir de 1993 la SAGARPA no expide nuevos permisos para la pesca de tiburón, a excepción de que se sustituya la embarcación o se renueven permisos que no impliquen un incremento en el esfuerzo pesquero (Santana-Morales et al. al. 2004). Esta medida se vió reforzada con la publicación de la Norma Oficial Mexicana de pesca responsable de tiburones y rayas NOM-029-PESC-2006 (D.O.F 2007), en la que se incluye a las cuatro especies de *Mustelus* que habitan en el Golfo de California, y la veda stablecida mayo a julio a partir de 2011 (D.O.F, 2011).

La evaluación del género *Mustelus* realizada por la IUCN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) coloca a la mayoría de las especies, incluyendo las de este estudio, en la categoría de menor preocupación o con datos insuficientes, aunque algunas como *M. fasciatus* y *M. schmitti* se encuentran catalogadas como en peligro crítico y amenazada, respectivamente (IUCN 2013, Rosa y Gadig 2010).

### 3 Justificación

El género *Mustelus* está compuesto por una gran variedad de especies. A pesar de su importancia ecológica y económica, la investigación sobre su sistemática y evolución es limitada. Este estudio proporcionará información sobre su filogenia, así como de los procesos evolutivos que han influido en la diversificación de este género.

### 4 Hipótesis

- Las relaciones filogenéticas de *Mustelus* serán congruentes con sus características morfológicas y de historia de vida como resultado de su historia evolutiva.

### Predicción

- Con base en las similitudes morfológicas y hábitos ecológicos *M. lunulatus* y *M. californicus* serán filogenéticamente más cercanos respecto a *M. henlei* y *M. albipinnis*, los cuales a su vez estarán más relacionados entre sí.

### 5 Objetivos

#### 5.1 Objetivo general

Determinar las relaciones filogenéticas de las especies de *Mustelus* del Pacífico Nororiental, en el contexto de la evolución del género.

#### 5.2 Objetivos particulares

1. Determinar la filogenia de las especies de *Mustelus* del Pacífico nororiental usando diferentes métodos de reconstrucción filogenética.
2. Discutir los posibles procesos de especiación involucrados en la divergencia de las especies de *Mustelus* en el Pacífico nororiental.

## **6 Materiales y métodos**

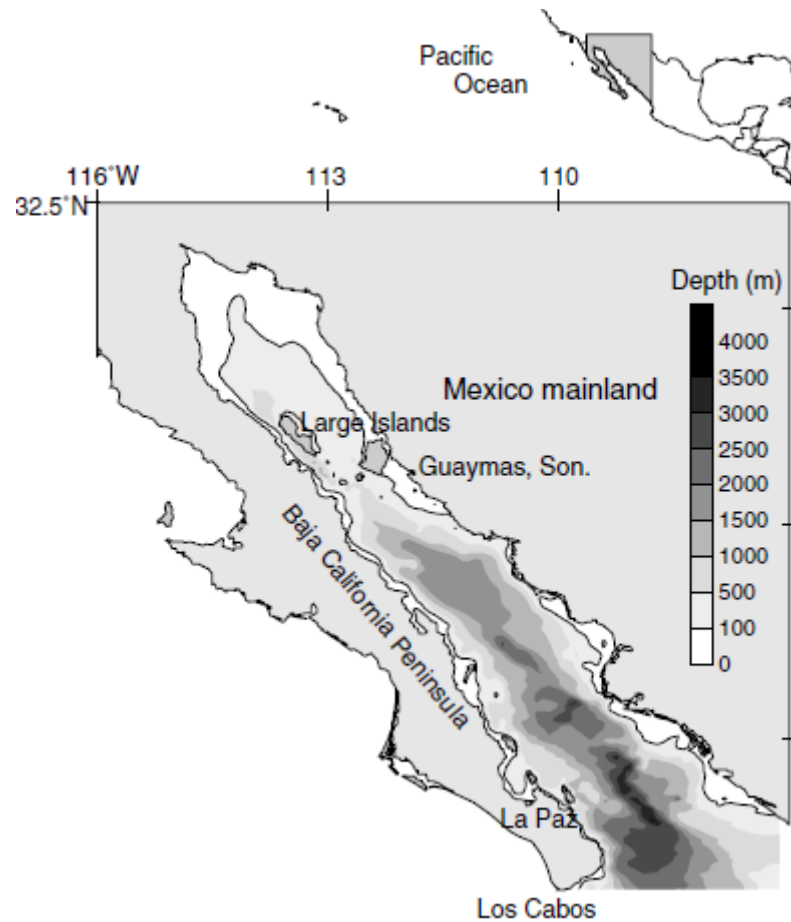
### **6.1 Área de estudio**

El Golfo de California (GC) se localiza al noroeste de México, entre los 23° y 32° norte y 107° y 115° oeste (Fig. 5), esta ubicación coincide con la transición entre regiones faunísticas templadas y tropicales propiciando su gran riqueza biológica (Bizzarro et al. 2007). Al norte, la profundidad es aproximadamente de 200 m lo que origina grandes intervalos de marea y una fuerte mezcla. Este transporte de agua fría y rica en nutrientes hacen de esta región una de las más productivas del mundo, esta alta productividad también se presenta en la región de las grandes islas (Ángel de la Guarda y Tiburón) en donde se manifiesta una surgencia continua.

Hacia la boca del golfo la profundidad aumenta alcanzando los 3000 m, estos cambios en la profundidad son acompañados por un aumento en la complejidad del fondo marino (Lluch-Cota et al. 2007). La temperatura también es sumamente variable a lo largo del Golfo, durante el verano se registran las mayores temperaturas (32.6° C) en el norte y hacia la boca del golfo, mientras que las menores (8.2° C) se dan hacia la mitad del golfo, cerca de las grandes Islas (Lluch-Cota et al. 2007).

De las cuatro regiones en las que se divide el GC, la región del alto Golfo ha sido catalogada como Reserva de la Biosfera por su alta diversidad biológica. En esta región se llevan a cabo diversas actividades productivas bajo regulación, como la pesca artesanal principalmente en tres comunidades: San Felipe en Baja California, el Golfo de Santa Clara y Puerto Peñasco en Sonora (Rodríguez-Quiroz et al. 2010).





**Figura 5. Ubicación de la zona de estudio en la región del Alto Golfo de California. La escala indica la batimetría. Modificado de Lluch-Cota et al. 2007**

## 6.2 Obtención de muestras

Las muestras fueron obtenidas durante el periodo de 2002-2004 durante la investigación doctoral del Dr. Juan Carlos Pérez Jiménez, Laboratorio de Ecología Pesquera del CICESE (Pérez Jiménez 2006). Las muestras fueron recolectadas de organismos desembarcados por embarcaciones menores, que utilizaron redes agalleras de fondo, y por barcos de mediana altura que utilizaron redes de arrastre. La preservación de muestras de músculo se realizó con etanol al 100% y las vértebras al 75%.

A partir de este material se obtuvo en el presente estudio, un total de 38 muestras de las cuatro especies de *Mustelus* presentes en el Golfo de California: *M. californicus* (n=10), *M. lunulatus* (n=10), *M. henlei* (n=10) y *M. albipinnis* (n=8).

## 6.3 Trabajo de laboratorio

### 6.3.1 Extracción de ADN

La obtención de ADN se realizó con el método de cloruro de litio modificado (Gemmell y Akiyama 1996). La extracción de ADN consistió en tres principales fases: 1) lisis celular o digestión, en la que la muestra de tejido fue colocada en un amortiguador de extracción con proteinasa K (10mg/ml) e incubada hasta que el tejido no sea visible; 2) la segunda fase consistió en la eliminación de proteínas y otros compuestos orgánicos por medio de una solución de cloroformo y alcohol isoamílico, para aumentar el rendimiento de extracción se añade LiCl 5M el cual precipita el ADN. 3) la última fase correspondió en la precipitación del ADN por medio de sales y su limpieza por medio de etanol. Para conservar las muestras el ADN fue resuspendido en solución TE 1X almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para verificar la obtención de ADN, se realizó un gel de agarosa al 1.5% y bromuro de etidio (10mg/ml) de  $3\mu\text{l}$  del producto de la extracción. El gel fue colocado en una cámara de electroforesis por 30 min a 100v y posteriormente fue fotografiado en un transiluminador.

### 6.3.2 Amplificación

#### 6.3.2.1 ADN mitocondrial

Se amplificaron los genes mitocondriales ND2 y ND4 utilizando los cebadores diseñados por Naylor et al. al. (2005) y Boomer Stow (2010) respectivamente, ND2: Ilem-MustelusF (5'- AAG GAC CAC TTT GAT AGA GT -3') y Asn-MustelusR (5'- AAC GCT TAG CTG TTA ATT AA -3') ND4 MaND4F (5' ACC MAA AGC YCA CGT WGA AGC 3') y MaND4R (5' TCT TGC TTG GAG TTG CAC CA 3').

Para todos los individuos se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de 25  $\mu\text{l}$  con las siguientes condiciones: 0.18mM dNTPs, 0.28mM de cada cebador, 1X de PCR buffer (Tris HCl 10 mM, KCl 50 mM y  $\text{MgCl}_2$  1.5 mM), y 1U de *Taq* ADN polimerasa y 2 $\mu\text{l}$  ADN (10-50ng/  $\mu\text{l}$ ). Las condiciones de amplificación fueron las mismas para ambos genes exceptuando la temperatura de anillamiento. El perfil consistió en un ciclo de desnaturalización inicial de 3min a  $94^{\circ}\text{C}$  seguido de 35 ciclos de 30s a  $94^{\circ}\text{C}$ , 30s a  $52.7^{\circ}\text{C}$  (ND2) y  $54.3^{\circ}\text{C}$  (ND4) (anillamiento correspondiente) 60 s a  $72^{\circ}\text{C}$  y una extensión final de 5min a  $72^{\circ}\text{C}$ .

### 6.3.2.2 ADN nuclear

Los genes nucleares RAG1 e ITS2 fueron amplificados utilizando los cebadores diseñados para tiburones por Boomer et al. (2012) y Pank et al. (2001); RAG1: MaRAG1F (5' GTT GAT GAT TAC CCA ATG GA 3') y MaRAG1InR (5' TGA CTG AAT TCT GTA TGA AGC) y para el ITS2 FISH5.8SF (5' TTAGCGGTGGATCACTCGGCTCGT 3') y FISH28SR (5'-TCCTCCGCTTAGTAATATGCTTAAATTCAGC-3').

La reacción de PCR para el RAG1 fue igual a la del ADNmt, el perfil de termociclado fue: 1 periodo inicial de desnaturalización de 3min a 94°C, 35 ciclos de 30 s a 94°, 30s a 46.5°C, 60 s a 72°C y una extensión final de 5min a 72°C.

Para la amplificación del ITS2, se realizó una reacción de 25 µl con 0.18Mm dNTPs, 0.28Mm de cada cebador, 1X del buffer Hot Start (QUIAGEN Inc. Valencia CA), 1U de *Taq* ADN polimerasa Hot Start (QUIAGEN Inc. Valencia CA), 2µl de ADN (10-50ng). Las condiciones del termociclado fueron: 1 periodo inicial de desnaturalización de 15min a 94°C, 35 ciclos de 30 s a 94°, 30s a 55.3°C, 2min a 72°C y una extensión final de 5min a 72°C. Para verificar los productos de PCR, se corrieron las muestras en un gel de agarosa al 1.5% a 100 v durante 40 min. Los productos de PCR fueron purificados por dos métodos: enzimáticamente usando Exo SAPIT (USB Co., Ohio) o por columnas con QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN Inc. Valencia CA), de acuerdo a los protocolos del fabricante. En este último método se comprobó la integridad del producto del PCR, mediante un gel de agarosa al 1.5%. Posteriormente todos los productos fueron secuenciados en secuenciador capilar ABI 3730XL (Macrogen, Corea).

### 6.4 Análisis de datos

Las secuencias fueron editadas y alineadas con el programa Codon Code Aligner ver 4.1.1 (Codone Code Co.) y se obtuvieron los haplotipos para el análisis filogenético.

#### 6.4.1 Variabilidad genética

La diversidad nucleotídica se estimó para cada gen y cada especie con el programa Arlequin 3.5 (Excoffier y Lischer 2010) utilizando los haplotipos obtenidos anteriormente.

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

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

#### 6.4.2 Modelos de sustitución nucleotídica

Para determinar el modelo evolutivo de mejor ajuste a los datos se utilizó el programa jModeltest (Posada, 2008). Para cada gen, el programa analiza 88 modelos de sustitución, el modelo con el menor valor de cada criterio es el de mejor ajuste. Los criterios de información implementados en este programa son el criterio de información de Akaike (AIC) y su corrección para muestras finitas (AICc) y el criterio Bayesiano (BIC).

#### 6.4.3 Análisis filogenéticos

Los análisis de reconstrucción filogenética se realizaron para cada gen por separado y posteriormente se concatenaron las secuencias mitocondriales con en el programa Geneious v.6-1 (Biomatters) para su análisis conjunto. Se realizaron reconstrucciones filogenéticas de máxima parsimonia y máxima verosimilitud con en el programa MEGA 5 (Tamura et al. 2011), análisis de distancias genéticas con Neighbor Joining (NJ) en PAUP 4.0 (Swofford D. 2000) y análisis bayesianos con el programa Mr. Bayes 3.2.2 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003). Se optó por un análisis de bootstrap no paramétrico con 500 réplicas, las cuales se consideran suficientes para un adecuado soporte estadístico en los análisis de distancia (NJ), parsimonia y en máxima verosimilitud (Batzoglou et al. al. 2009).

El análisis de máxima parsimonia se llevó a cabo con una parsimonia estándar en donde los cambios tienen el mismo peso, la búsqueda del árbol más parsimonioso se realizó con el método de búsqueda heurística usando el algoritmo Tree bisection reconnection (TBR) para encontrar los árboles más parsimoniosos (Tamura et al. 2011).

Para conocer la dirección de los eventos de divergencia se utilizó un grupo externo para el enraizamiento del árbol. Para los genes mitocondriales se utilizaron secuencias de *Hemigaleus microstoma* perteneciente al mismo orden que *Mustelus*, pero a la familia Hemigaleidae, previamente utilizado por Boomer et al. (2012). En el análisis de los genes nucleares se utilizaron secuencias de *Carcharhinus plumbeus* debido a la falta de disponibilidad de secuencias de *H. microstoma* para estos genes.

El análisis de máxima verosimilitud se llevó a cabo bajo el modelo seleccionado para cada gen. Se realizó el análisis con y sin sitios faltantes para ver si se presentaba algún cambio en la topología. La búsqueda del árbol de mayor verosimilitud fue con el método heurístico Nearest-Neighbor-Interchange (NNI) (Tamura et al. 2011).

El análisis Bayesiano se inició con 20,000 generaciones y se extendió hasta 33,600 generaciones para obtener la convergencia del análisis, que se alcanza cuando el valor de la desviación estándar de las frecuencias partidas (SDSF) se encuentra entre 0.05 y 0.01 y al presentarse un factor de reducción de escala (PSRF) lo más cercano a 1. En el análisis se obtuvo una SDSF menor a 0.014 y PSRF entre 0.9 y 1.008, lo que indica una correcta convergencia (Ronquist y Huelsenbeck, 2003). Como análisis complementario se realizó un árbol con neighbor joinig, calculando las distancias génicas con el modelo HKY el cual fue el de mejor ajuste (Swofford, 2000)

#### **6.4.4 Estimación de los tiempos de divergencia**

Para calcular los tiempos de divergencia se realizó un análisis bayesiano por medio del programa BEAST (Heled y Drummond 2010) con las secuencias concatenadas de ADNmt. Se utilizó un reloj molecular estricto con una tasa de sustitución  $0.0037 \pm 4.6 \times 10^{-4}$  por m.a calculada para otros tiburones y una base de frecuencias estimada. El análisis corrió bajo el proceso de Yule como modelo de especiación con 30 millones de generaciones, considerando el 10% de las topologías

iniciales como ‘burn in’ o descarte. Los resultados del análisis se visualizaron en el programa Tracer View (Rambaut y Drummond, 2009)

## 7 Resultados

### 7.1 Secuencias de ADN

Se obtuvo un fragmento de 828 pb para el gen ND2 y uno de 695 pb para el gen ND4 con un total de 214 y 192 sitios variables, respectivamente. Del gen RAG1 se obtuvo una secuencia de 725 pb y 25 sitios variables mientras que para el ITS2 el fragmento fue de 770 pb con 147 sitios variables. Además se analizaron secuencias ortólogas provenientes de otras especies (Tabla 1).

Tabla 1. Número de haplotipos por especie para los genes mitocondriales ND2 y ND4 y nucleares ITS2 y RAG1. Los números entre paréntesis corresponden a los individuos secuenciados para el ITS. Se presentan los números de acceso de Genbank de las secuencias analizadas de esa base de datos.

	ND2	ND4	RAG1	ITS2	Individuos secuenciados *	Número de acceso de GeneBank
<i>M. californicus</i>	4	2	2	2	10 (6)	ND2(DQ422125) ND4 (DQ422062)
<i>M. henlei</i>	9	6	1	1	8 (7)	ND2(DQ422125) ND4 (DQ422063)
<i>M. lunulatus</i>	4	4	1	6	10 (8)	presente estudio
<i>M. albipinnis</i>	5	1	1	1	8 (6)	presente studio
<i>M. canis</i>	1	1	-	-	-	ND2 (DQ422129) ND4 (DQ422067)
<i>M. norrisi</i>	1	1	-	-	-	ND2 (DQ422126) ND4 (DQ422064)
<i>M. schmitti</i>	1	1	-	-	-	ND2 (DQ422122) ND4 (DQ422060)
<i>M. mosis</i>	1	1	-	-	-	ND2 (DQ422127) ND4 (DQ422065)
<i>M. mustelus</i>	1	1	-	-	-	ND2 (DQ422128) ND4 (DQ422066)

\* presente estudio

Tabla 1. (continuación).

	ND2	ND4	RAG1	ITS2	Número de acceso de GeneBank
<i>M. asterias</i>	1	1	-	-	ND2(DQ422123) ND4 (DQ422061)
<i>M. griseus</i>	1	2		-	ND2 (JQ599318) ND4 (JQ599304-JQ599305) RAG1 (JQ599285)
<i>M. widodoi</i>	2	2	-	-	ND2 (JQ599316 JQ599317) ND4 (JQ599302-JQ599303)  RAG1 (JQ599286)
<i>M. antarcticus</i>	3	3		-	ND2 (JQ599306 JQ599308) ND4 (JQ599290-JQ599292)  RAG1 (JQ599288)
<i>M. lenticulatus</i>	2	3			ND2 (JQ599309 JQ599310) ND4 (JQ599293-JQ599295)  RAG1 (JQ599287)
<i>M. stevensi</i>	2	3			ND2 (JQ599311 JQ599313) ND4 (JQ599296-JQ599298)
<i>M. manazo</i>	2	3			ND2 (JQ599314 JQ599315) ND4 (JQ599299-JQ599301)  RAG1 (JQ599289)
<i>M. intermedius</i>	1	1			ND2(DQ422131) ND4 (DQ422069)

## 7.2 Diversidad genética

La diversidad nucleotídica de los genes mitocondriales fue relativamente baja en las cuatro especies (Tabla 2) ND2 ( $\pi=0.0012-0.0058$ ) y ND4 ( $\pi=0-0.0058$ ). Sin embargo, la diversidad en los genes nucleares es muy alta en *M. californicus* para ambos marcadores y en *M. lunulatus* para el ITS2.

Tabla 2. Diversidad nucleotídica  $\pi$  obtenida para cada locus en las especies de *Mustelus* del Pacífico oriental.

<b>Especie</b>	<b>ND2</b>	<b>ND4</b>	<b>RAG1</b>	<b>ITS2</b>
<i>M. californicus</i>	0.001204	0.00114	0.206291	0.248094
<i>M. lunulatus</i>	0.005848	0.002864	<b>0</b>	0.677648
<i>M. henlei</i>	0.005848	0.002011	<b>0</b>	<b>0</b>
<i>M. albiginnis</i>	0.001596	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

## 7.3 Modelos de sustitución

Los modelos elegidos por ambos criterios fueron congruentes en los cuatro genes, a excepción del modelo seleccionado por el criterio de Akaike para el ND2, sin embargo, los supuestos para ambos modelos (TVM+G y HKY+G) son similares por lo que se trabajó bajo el modelo HKY+G para los genes mitocondriales según el criterio de información Bayesiano (BIC).



La proporción de nucleótidos fue similar en los genes mitocondriales y con el gen nuclear RAG1. El ITS2 presentó diferentes proporciones con excepción de la timina que fue muy similar en los cuatro genes. Esto también se presentó para la tasa de transición y transversión (R), la tasa de transición es 8 veces mayor en promedio al de transversión, en el ADNmt y el RAG1, mientras que el ITS2 muestra una relación casi de 1:1 (Tabla 3).

Tabla 3. Modelos de sustitución seleccionados por los criterios de información AICc y BIC. Frecuencias de nucleótidos y tasa de transición y transversión.

Gen	AICc	BIC	freqA	freqC	freqG	freqT	R (ti/tv)
ND4	HKY+G	HKY+G	0.309	0.295	0.104	0.290	8.35
ND2	TVM+G	HKY+G	0.303	0.27	0.119	0.298	9.19
RAG1	HKY+I	HKY+I	0.309	0.167	0.258	0.263	7.1
ITS2	TIM2+I	HKY	0.109	0.306	0.335	0.249	0.863

## 7.4 Reconstrucción filogenética

### 7.4.1 ADNmt

En este análisis se incluyen 17 de las 27 especies que conforman el género *Mustelus*. La topología fue congruente entre los dos genes y entre los cuatro tipos de análisis (neighbor joining, parsimonia, verosimilitud y bayesiano) por lo que el análisis concatenado es adecuado para el análisis filogenético. El análisis filogenético obtenido con las secuencias concatenadas de los genes ND2 y ND4 resolvió satisfactoriamente la mayoría de las relaciones entre las especies de *Mustelus*, como lo reflejan los altos valores de probabilidad posterior y bootstrap no paramétrico de la mayoría de las ramas (Fig. 6). El árbol presenta una separación basal de dos grupos monofiléticos. Por un lado se encuentra el clado conformado por las especies del Pacífico (*M. albiginnis*, *M. henlei*, *M. californicus*, *M. lunulatus*), del Atlántico (*M. canis*, *M. mustelus* y *M. norrisi*) y del Indo-Pacífico (*M. mosis*, *M. widodoi* y *M. griseus*) (clado A, en Fig. 6), y por el otro el clado que agrupa monofiléticamente a las especies del Indo-Pacífico (*M. manazo*),

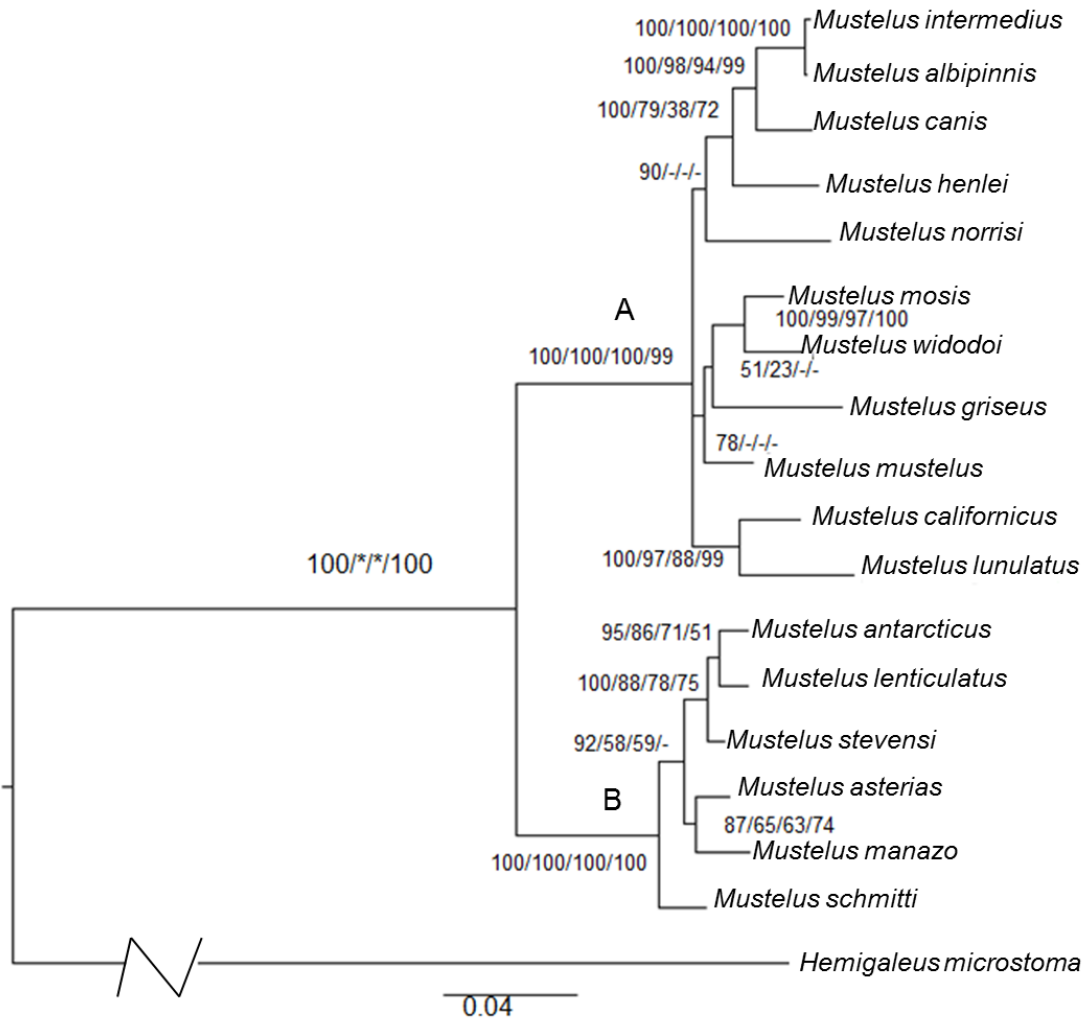
Australasia (*M. lenticulatus*, *M. antarcticus*, *M. stevensi*) y dos especies del Atlántico (*M. asterias* y *M. schmitti*) (clado B, en Fig. 6).

El clado A presenta una politomía en su base aunque incluye tres clados fuertemente soportados, el primero conformado por *M. albiginnis*, *M. intermedius*, *M. canis*, *M. henlei* y *M. norrisi*, el segundo por *M. widodoi* y *M. mosis* y el tercero formado por *M. californicus* y *M. lunulatus*. Las especies con menor soporte fueron *M. griseus* y *M. mustelus*, cuyas relaciones difirieron entre los métodos de análisis.

Por otra parte, el clado B presenta una filogenia resuelta para todas las especies, con valores superiores al 80% por lo menos en la prueba de análisis bayesiano, particularmente la monofilia de *M. antarcticus*, *M. lenticulatus* y *M. stevensi* es fuertemente soportada.

Además del grado de resolución entre especies, los clados difieren respecto a la congruencia geográfica ya que mientras que las especies de Australasia son monofiléticas, las especies del Pacífico y principalmente las del Atlántico no lo son.

Comparando los dos clados principales se observa que la divergencia, indicada por la longitud de las ramas, es mayor entre las especies del Pacífico que entre las especies de Australasia.

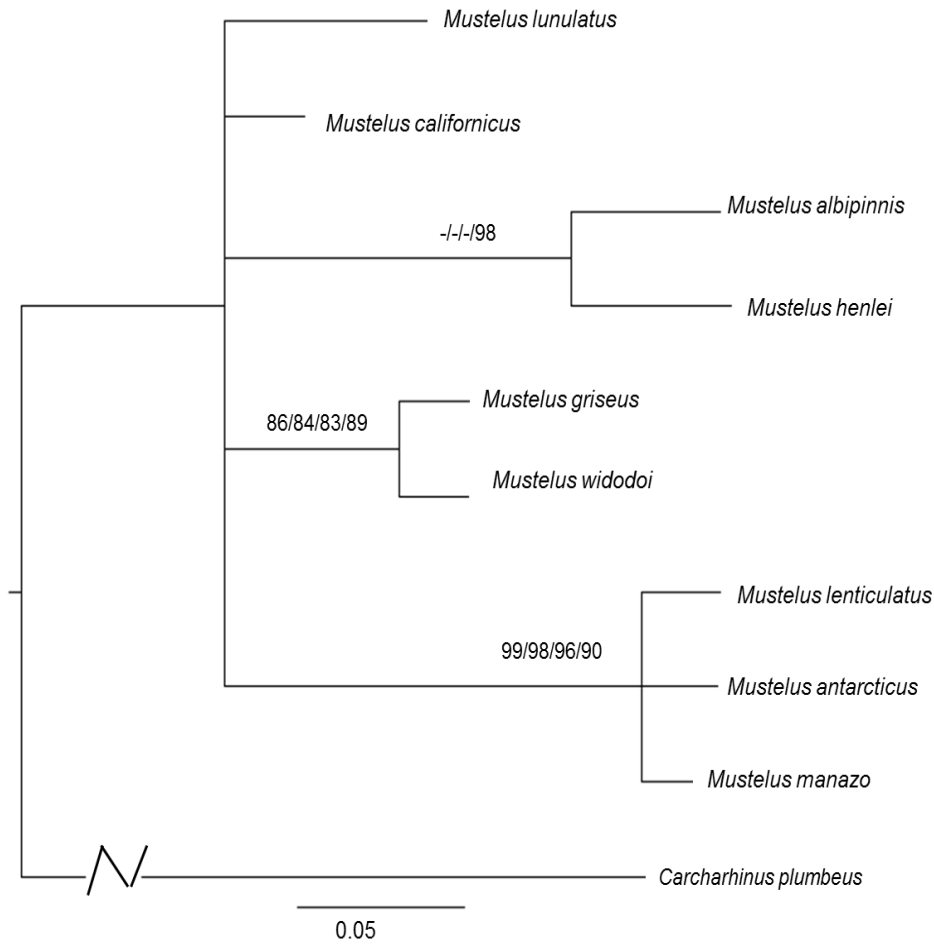


**Figura 6. Filogenia del género *Mustelus* reconstruida por medio de análisis Bayesiano y basado en las secuencias concatenadas de los genes mitocondriales ND2 y ND4 (1523 bp). Se indican los clados A y B referidos en el texto. El análisis se realizó bajo el modelo HKY+ G. El soporte estadístico se indica con los valores de probabilidades posteriores y bootstrap (500 réplicas) (Bayesiano/ML/MP/NJ). Los guiones indican que en el análisis no se presentó ese nodo. El símbolo de asterisco indica que en el análisis no se presentó un valor de bootstrap. La rama del grupo externo ha sido reducida para aclarar la figura y por lo tanto no aplica la escala señalada.**

#### 7.4.2 ADN nuclear

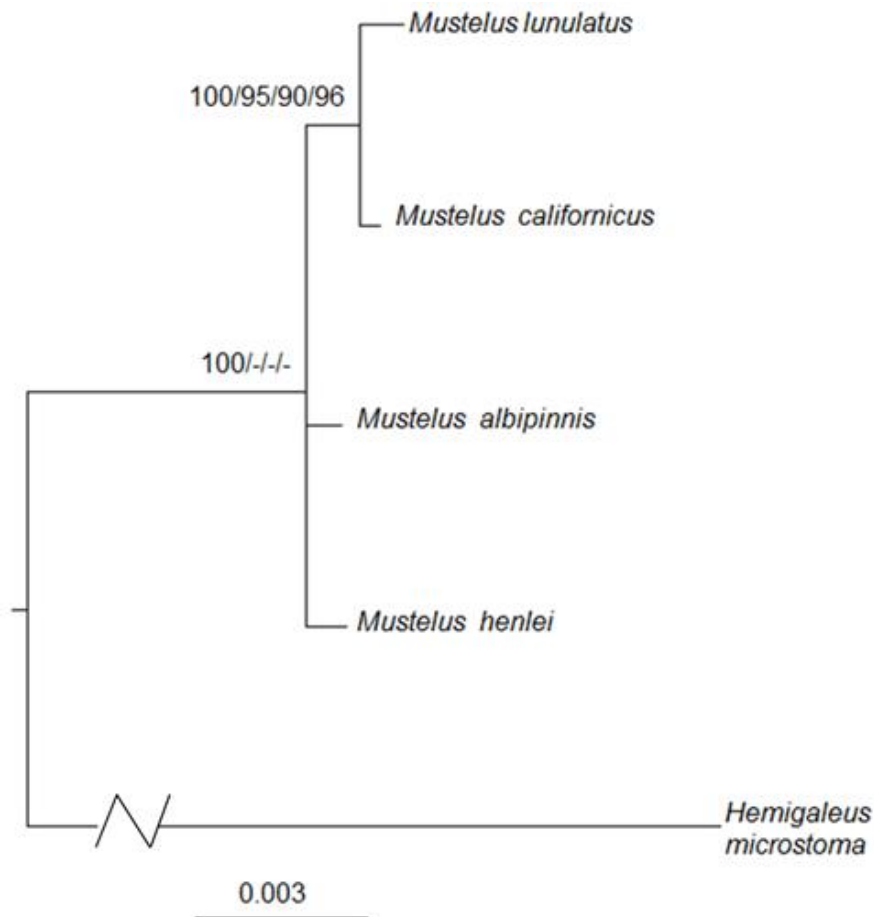
En el análisis del gen RAG1 sólo se incluyeron nueve especies, *M. californicus*, *M. lunulatus*, *M. henlei*, *M. albipinnis*, *M. lenticulatus*, *M. antarcticus*, *M. manazo*, *M. griseus* y *M. widodoi*. Para el resto de las especies no se encontraron secuencias disponibles en GenBank. Al igual que en el análisis de ADN mitocondrial se reconstruyó la filogenia con los cuatro métodos, parsimonia, verosimilitud y bayesiano.

La filogenia obtenida en los tres análisis presenta una topología poco resuelta y con varias politomías. Esto se refleja también en bajos valores de soporte que indican una señal filogenética baja e insuficiente para resolver las relaciones entre las nueve especies analizadas (Fig. 7). Sin embargo, algunos clados muestran altos valores de bootstrap como el conformado por *M. antarcticus*, *M. lenticulatus* y *M. manazo*, así como el de *M. griseus* y *M. widodoi*. También se confirma la relación entre *M. albipinnis* y *M. henlei*.



**Figura 7.** Filogenia *Mustelus lunulatus*, *M. californicus*, *M. albiginnis*, *M. henlei*, *M. griseus*, *M. widodoi*, *M. lenticulatus*, *M. antarcticus*, *M. manazo* y como grupo externo *Carcharhinus plumbeus* obtenida mediante análisis bayesiano, basado en las secuencias del gen nuclear RAG1. El análisis se realizó con el modelo HKY+I. Los valores de soporte a los linajes son las probabilidades posteriores y valores del bootstrap no paramétrico (500 pseudo-replicas) (Bayesiano/ML /MP/NJ). La rama del grupo externo ha sido reducida para aclarar la figura y por lo tanto no aplica la escala señalada

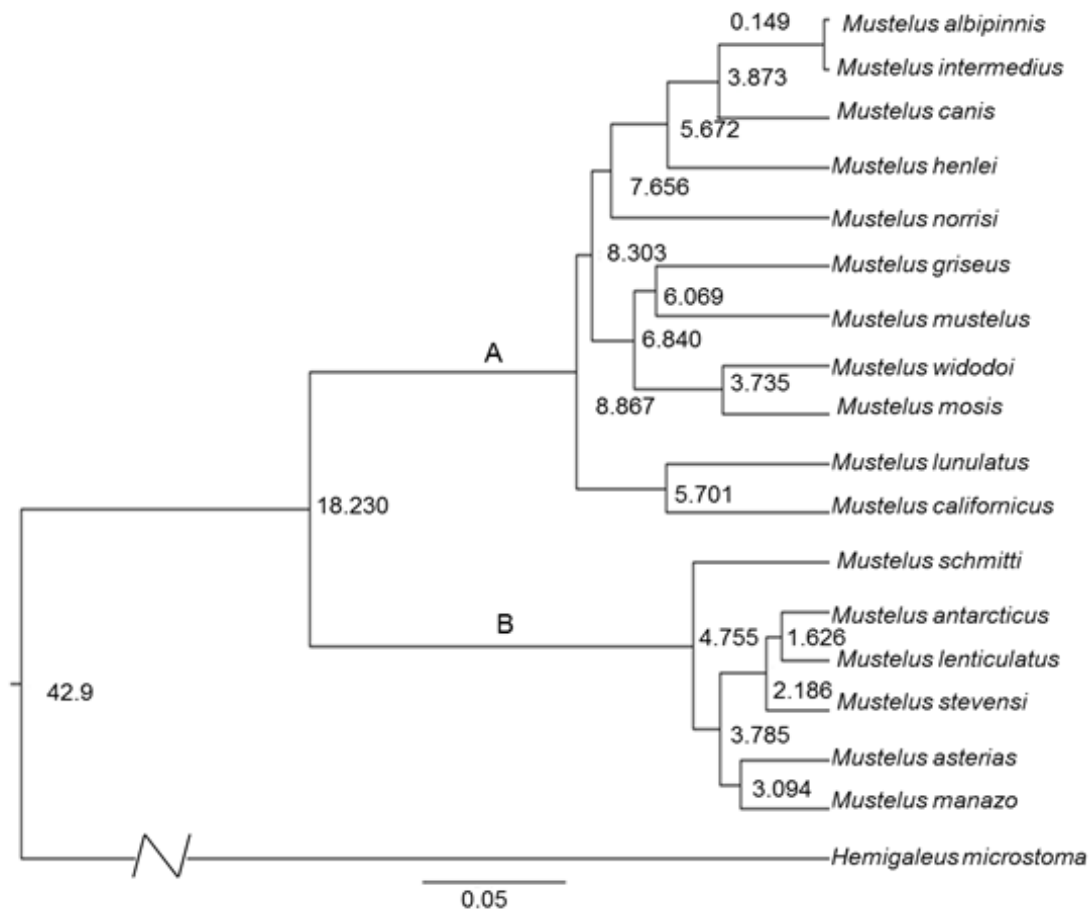
En el análisis del ITS2 sólo se incluyeron las especies del Pacífico mexicano, *M. albipinnis*, *M. henlei*, *M. lunulatus* y *M. californicus*, debido a que no se cuenta con secuencias disponibles para el resto de las especies. La resolución filogenética fue muy baja, y solamente quedó soportada la relación entre *M. californicus* y *M. lunulatus* (Fig. 8).



**Figura 8.** Filogenia de cuatro especies del Pacífico oriental de *M. lunulatus*, *M. californicus*, *M. albipinnis*, *M. henlei* obtenida por medio del análisis bayesiano, basado en las secuencias del gen nuclear ITS2. El análisis se realizó con el modelo HKY. El soporte se indica con y probabilidades posteriores y los valores de bootstrap (500 pseudorréplicas) (Bayesiano/ML/MP/NJ).

### 7.5 Tiempos de divergencia

El árbol ultramétrico, que asume un reloj molecular mitocondrial, presentó una topología congruente con el análisis bayesiano de ADNmt (Fig. 9). La separación de los dos clados principales ocurrió hace aproximadamente 18 m.a. Una posterior divergencia dentro del clado A hace 8.8 m.a. originó dos clados, el primero en el que se separan *M. californicus* y *M. lunulatus* (5.7 m.a) y el segundo que incluye al resto de especies del Pacífico y Atlántico y cuyos tiempos de separación son relativamente cercanos (4-8 m.a) a excepción de *M. albipinnis* con 150 mil años de haberse originado. En el clado B la divergencia se dio entre los 2 y 5 m.a siendo *M. schmitti* la especie más ancestral y *M. antarcticus* y *M. lenticulatus* las más recientes.

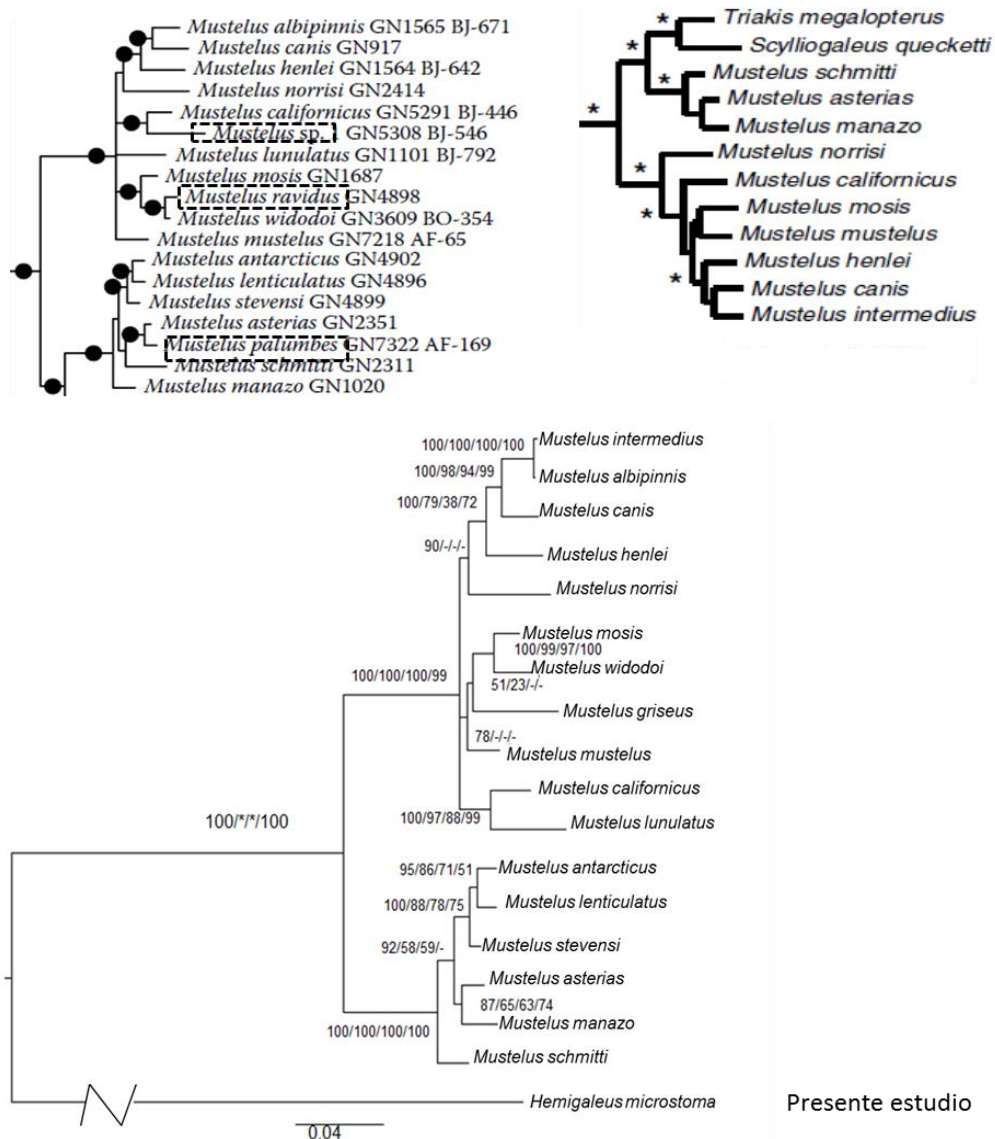


**Figura 9.** Árbol ultramétrico obtenido asumiendo un reloj molecular mediante el programa BEAST, los tiempos de divergencia corresponden a millones de años, la rama del grupo externo no representa la escala señalada.

## 8.1 Análisis filogenético

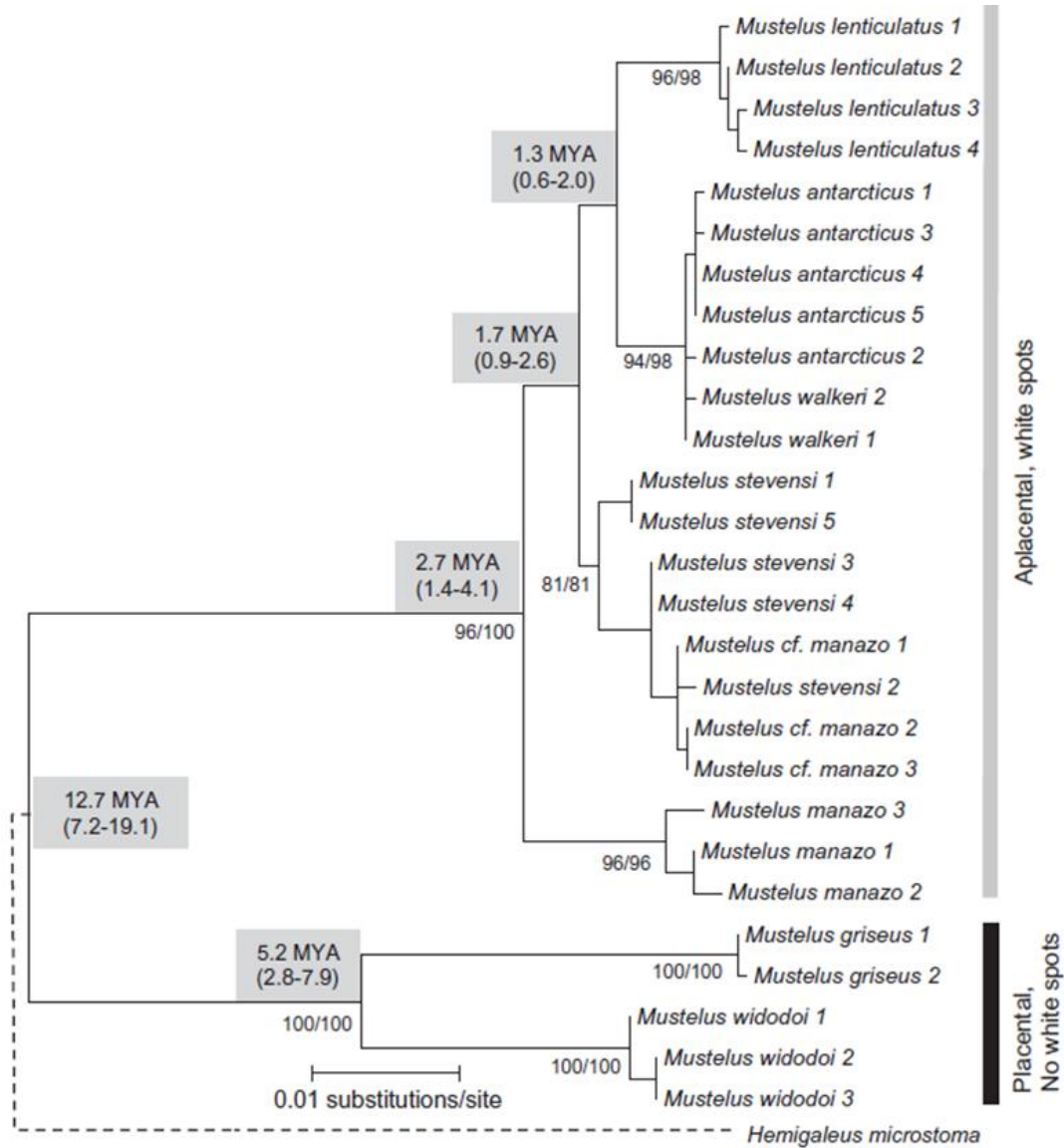
### 8.1.1ADNmt

La topología obtenida en este estudio es congruente en su mayoría con los trabajos publicados sobre filogenia del género *Mustelus* (Boomer et al. 2012, López et al. al. 2006, Naylor et al. 2012) basados también en los genes utilizados en este estudio (Fig. 10 y 11).



**Figura 10.** Hipótesis sobre la filogenia de *Mustelus*, obtenidas mediante genes mitocondriales ND2 (Naylor et al. 2012,p.39); ND2, ND4 y cytB (López et al. 2006,p.54); y ND2 y ND4 (este estudio). Enmarcados con líneas punteadas se indican los taxa exclusivos del análisis de Naylor et al. 2012.





**Figura 11. Hipótesis sobre la filogenia de *Mustelus* en el IndoPacífico y Australasia a partir de genes mitocondriales ND2, ND4 y CR. Tomado de Boomer et al., p 700**

La politomía en la base del clado A también se presenta en el análisis realizado por Naylor et al. (2012), generalmente las politomías se presentan por falta de datos o poco poder de resolución (politomías blandas). Respecto a los datos utilizados en ambos análisis, tanto el número de taxa (17 de 27 especies) como la resolución de los marcadores es adecuada. Esto podría indicar que se trata de una divergencia real (politomía dura) resultado de una rápida diversificación del género, como ya ha sido propuesto anteriormente (Boomer et al. 2012) y no se trate simplemente de una insuficiente señal filogenética por parte de genes demasiado conservados (politomía blanda). En la familia Orectolobidae también se ha registrado este proceso, sin embargo en la filogenia correspondiente no se presentan politomías (Corrigan y Beheregaray 2009).

La monofilia del grupo conformado por *M. albipinnis*, *M. canis*, *M. henlei* y *M. norrisi*, al igual que en *M. stevensi*, *M. lenticulatus* y *M. antarcticus*, *M. asterias*, *M. manazo* y *M. schmitti* también es congruente con los análisis previamente publicados, aunque sí resaltan algunas diferencias como la posición de *M. californicus* y *M. lunulatus* en la filogenia obtenida por Naylor et al. (2012), en su trabajo incluyen una especie no nombrada (*Mustelus sp1.*) como especie hermana de *M. californicus*, sin embargo no resuelve la posición de *M. lunulatus*. Esto contrasta con lo obtenido en el presente estudio ya que bajo los tres métodos de reconstrucción se presentaron como especies hermanas, con un alto soporte, lo que indica que las secuencias poseen suficientes sinapomorfias para resolver la filogenia.

Las diferencias entre los trabajos publicados y el presente estudio se deben principalmente a los taxa analizados, particularmente entre las especies del Indo Pacífico. Por ejemplo, Naylor et al. (2012) incluyen a *M. ravidus* como especie hermana de *M. widodoi*, y en el análisis de Boomer et al., (2012) esta última especie es más cercana a *M. griseus*.

Un aspecto a resaltar en el muestreo es la posición de *M. albipinnis*. En el presente se ubica como especie hermana de *M. intermedius* mientras que en el estudio de Naylor et al. (2012) no se incluye y en su lugar se presenta *M. canis*. La información de *M. intermedius* es limitada ya que no es una especie formalmente descrita y sólo se incluye en la tesis de Heemstra (1973), con muestras de Baja California Sur, Panamá, Colombia y Ecuador, además de la secuencia incluida en este estudio que fue obtenida de un espécimen de las costas de Baja California (López, com.per) lo que coincide con la distribución de *M. albipinnis*. La longitud de las ramas indica una divergencia mínima entre ambas especies por lo que es probable que sean el mismo taxón, en consecuencia se requieren de más estudios taxonómicos que confirmen esta información.

En este estudio vuelve a presentarse el patrón observado previamente por López et al. (2006) y Boomer et al. (2012), consistente en la monofilia recíproca de especies con diferente tipo de reproducción (Figura 11, Tabla 4). Debido a la presencia de estos dos modos de reproducción, las especies de la familia Triakidae y particularmente el género *Mustelus* han sido una ventana en el estudio evolutivo de este carácter. Al respecto se ha sugerido que el estado ancestral es el modo placentado y el carácter derivado es la reproducción aplacentada.

Tabla 4. Distribución geográfica y modos de reproducción de las especies incluidas en el presente análisis con excepción de *M. intermedius*. Modificado de (Boomer et al. 2012).

Especie	Distribución	Reproducción
<i>M. californicus</i>	Sur de California y GC	Placentado
<i>M. lunulatus</i>	Pacífico, GC	Placentado
<i>M. albiginnis</i>	Baja California, Golfo de California, Perú, Ecuador	Placentado
<i>M. canis</i>	Atlántico, Golfo de México, Guatemala, Norte de Argentina y Sur de Brasil	Placentado
<i>M. henlei</i>	Baja California, Golfo de California, Perú, Ecuador	Placentado
<i>M. mosis</i>	India, Mar Rojo, Sri Lanka	Placentado
<i>M. widodoi</i>	Indonesia (endémico)	No conocido
<i>M. mustelus</i>	Noroeste del Atlántico, Mar Mediterráneo, Sudáfrica	Placentado
<i>M. griseus</i>	Taiwán, Japón	Placentado
<i>M. norrisi</i>	Golfo de México Venezuela y Sur de Brasil	Placentado
<i>M. lenticulatus</i>	Nueva Zelanda (endémico)	Aplacentado
<i>M. antarcticus</i>	Australasia	Aplacentado
<i>M. stevensi</i>	Noroeste de Australia	Aplacentado
<i>M. manazo</i>	Indonesia, Taiwán , Japón	Aplacentado
<i>M. asterias</i>	África y mar Mediterráneo	Aplacentado
<i>M. schmitti</i>	Brasil Argentina	Aplacentado

La falta de concordancia geográfica entre la distribución de *M. canis*, *M. schmitti* y *M. norrisi* y su cercanía filogenética con especies de otras regiones, puede deberse a que durante el proceso de divergencia entre las especies del Atlántico y el Pacífico existiera cierto flujo genético mientras ocurría la formación del Istmo de Panamá a finales del Mioceno e inicios del Plioceno (5 m.a). Retomando el tipo de reproducción, es interesante que es la característica biológica que comparte

cada grupo independientemente de su distribución, respecto a este punto se propone que la divergencia de los linajes con distinto tipo de reproducción fue previa a la radiación global del género (Boomer et al. al. 2012).

El grupo del Indo-Pacífico muestra cierta concordancia geográfica ya que forman un grupo monofilético; sin embargo, es interesante que sean más cercanos a las especies del Pacífico Nororiental particularmente al ser especies con una distribución mucho más limitada y en el caso de *M. widodoi* ser endémica de las costas de Indonesia. Si bien la distancia geográfica es considerable entre el Indopacífico y el Pacífico Este, además de la presencia de la Barrera del Pacífico Este, una conexión histórica entre los grupos anteriormente mencionados podría haber ocurrido con el uso de los archipiélagos del Pacífico sur como 'trampolines' o stepping stones como lo ocurrido con *Carcharhinus limbatus* y *Sphyrna lewini* cuyo centro de origen se indentifio en el Indopacífico y una colonización posterior a hacia el Pacífico Este (Duncan et al. 2006; Keeney & Heist 2006).

### **8.1.2 ADN nuclear**

El uso de marcadores nucleares en sistemática ha ido en aumento, estos se han enfocado principalmente en la resolución de divergencias profundas con niveles taxonómicos mayores como clases y órdenes, sin embargo, también pueden resultar útiles en el análisis de divergencias recientes ya que el nivel de saturación es menor en comparación con los marcadores mitocondriales (Steppan et al. 2004).

El gen RAG1 es un gen codificante de copia única, libre de intrones, que ha sido utilizado en análisis filogenéticos de diversos vertebrados (Gruber et al. 2007), principalmente a nivel de orden, en aves y peces (Paton et al. 2003, Rocha et al. al. 2008), y también a nivel de familia en algunos mamíferos (Steppan et al. al. 2004). Contiene regiones muy conservadas y no se ha reportado saturación, lo que le otorga una mayor calidad como marcador molecular (Chiari et al. al. 2009).

En tiburones se ha utilizado este marcador en grupos problemáticos como la familia Triakidae y la familia Scyliorhinidae, obteniendo un alto grado de resolución soportando la hipótesis de parafilia entre estas dos familias (Iglésias et al. al. 2005).

El nivel de resolución obtenido con el gen RAG1 es coincidente con lo publicado por López et al. al. (2006) para *Mustelus*. Por lo menos para estas especies, y muy probablemente para otros tiburones, el análisis filogenético a nivel de especie requiere marcadores con una mayor tasa de sustitución, considerando que en elasmobranquios la tasa de mutación es mucho menor en comparación a la de otros vertebrados (Martin 1999), por lo que se espera que la cantidad de sitios informativos o sinapomorfias sea menor. Retomando las características de este marcador se ha reportado una alta heterogeneidad en la composición de bases lo que pudiera afectar la señal filogenética. Se ha identificado que la región 5' es más variable y menos afectada por la heterogeneidad en comparación a la región 3' (Chiari et al. al. 2009). El fragmento utilizado en este trabajo corresponde a la región 3' lo que explicaría en parte el poco nivel de variabilidad y resolución obtenido.

Por otro lado, el ITS2 presenta múltiples copias y una rápida evolución, por lo que ha sido de gran utilidad en el estudio de variación interespecifica. En tiburones, ha sido muy utilizado para la identificación de productos provenientes de especies bajo una fuerte explotación pesquera y cuyas poblaciones están declinando, o especies en peligro de extinción (Abercrombie et al. al. 2005, Magnussen et al. al. 2007).

Al igual que en árbol obtenido con el RAG1, en el árbol obtenido con el ITS2 se presentan politomías pero se mantiene la congruencia de los grupos. Esto es interesante debido a la diferencia en las tasas de evolución de estos marcadores. Esto podría sugerir que el ITS2 pudiera usarse en análisis con divergencias más profundas.

Posiblemente con la concatenación de ambos genes nucleares se hubiera obtenido un mejor resultado como con la concatenación de los genes mitocondriales pero la falta de secuencias disponibles no lo permitió. A pesar de las diferencias entre los genes mitocondriales y nucleares la combinación de ellos, parece dar resultados mucho más robustos, similar a los obtenidos en el análisis filogenético de la familia Sphyrnidae en el cual se concatenaron genes de ambos genomas (Lim et al. al. 2010).

### 8.3 Tiempos de divergencia y escenarios de especiación

La estimación de los tiempos de divergencia para el género *Mustelus* únicamente se había realizado para las 6 especies presentes en el Indo Pacífico, por lo que este estudio provee una información mucho más amplia para entender la evolución del género.

La divergencia de linajes se ubica entre el Mioceno tardío (12-5.3 m.a) y el Plioceno (5.3-1.8). Durante este periodo se presentaron en el Pacífico diversas transiciones geológicas y climáticas que crearon un ambiente propicio para la diversificación de diversas especies. Los cambios geológicos incluyen una fuerte actividad tectónica que origino el levantamiento de la meseta de Colorado y la Sierra Nevada, así como la separación de la Península de Baja California. Durante el mioceno tardío se originó en el mar un régimen de surgencias que proveyó ambientes ricos en nutrientes y mayor disponibilidad de alimento, así como el establecimiento de los bosques de Kelp, los diversos cambios en el nivel del mar propiciaron mayores hábitats costeros. (Jacobs et al. al. 2004).

Sobre los procesos de especiación de este género, se ha planteado un escenario de dispersión para las especies de Australasia en ausencia de barreras geográficas (Boomer et al. 2012). Para las especies del Pacífico se discuten los diferentes modelos de especiación enfatizando en una hipótesis de especiación ecológica con base a la información biológica de las especies.

Para contrastar las hipótesis de especiación ecológica generalmente se considera el modelo alopátrico como hipótesis nula. Este planteamiento es factible considerando los eventos vicariantes relacionados a la formación de la península de Baja California como una posible barrera geográfica.

La historia geológica del GC es compleja ya que involucra movimientos de placas y de actividad volcánica. La formación de la protopenínsula se inició hace aproximadamente 12.5 m.a con la consecuente formación de un proto golfo ubicado aproximadamente en lo que actualmente es la región del Alto Golfo, lo que proporcionó nuevos hábitats. Esta separación también estuvo acompañada con la formación de pequeñas islas volcánicas al sur en la región de los Cabos. Durante el Mioceno tardío (~7.5 m.a) la proto península se separó de tierra firme desplazándose hacia el sur, formando un canal entre el proto golfo y el Pacífico en la región del norte facilitando

la colonización en ambos lados de la península, a su vez las islas volcánicas en el sur formaron un archipiélago. Posteriormente se presentó un nuevo desplazamiento de la península hacia el norte entre los 6 y 5 m.a y hacia los 4 m.a la península y el Golfo casi presentaban su conformación actual, con la excepción del canal formado hacia el sur de la península que mantuvo la conexión entre el Pacífico y el reciente Golfo hasta mediados del Plioceno (~3 m.a). Además de los cambios geológicos estos eventos originaron que las condiciones oceanográficas difirieran ampliamente siendo el GC mucho más salino y con mayor temperatura que el Pacífico (Sandoval-Castillo 2011).

La formación de la península de Baja California (PBC) y el Golfo de California sin duda han moldeado la estructura genética de diversos organismos marinos. Su influencia en organismos con menor capacidad de dispersión pudiera ser mayor mientras que el efecto en especies de mayor vagilidad pudiera ser menos tangible.

En batoideos se ha encontrado una significativa diferenciación genética entre las poblaciones del Golfo de California y las del Pacífico, lo que sugiere la presencia de especies crípticas (Castillo-Páez et al. 2013, Sandoval-Castillo et al. 2004, Sandoval-Castillo y Rocha-Olivares 2011). Dos de las especies estudiadas, *Rhinobatus productus* y *Zapterix exasperata* presentan una menor vagilidad, de manera particular las poblaciones de *R. productus* en esta región se aislaron aproximadamente hace 3 m.a coincidiendo con el cierre del pasaje entre el GC y el Pacífico. Un resultado poco esperado fue el obtenido con la raya *Rhinoptera steindachneri* cuya capacidad de dispersión es mucho mayor sin embargo, también se encontró una diferenciación genética, esto sugiere una posible especiación críptica en la región del Pacífico (Sandoval-Castillo y Rocha-Olivares 2011).

Para hipotetizar el lugar de origen de las especies distribuidas en el Pacífico, podríamos plantear dos escenarios. El primero en el que hubieran tenido su origen en la región del Pacífico de la PBC con una colonización hacia el sur por parte de *M. henlei*, *M. lunulatus* y *M. albipinnis* las cuales podemos considerarlas como especies de distribución tropical y subtropical, mientras que *M. californicus* se limita a la región subtropical y el segundo con un origen hacia el sur y una posterior colonización hacia la PBC y el GC. La cercanía filogenética de *M. canis* y *M. norrisi* cuya distribución en el Atlántico Oeste incluye la región tropical del Golfo de México y sur de



Brasil podría indicar un ancestro subtropical por lo menos para las especies de mayor distribución, lo que apoyaría el segundo escenario.

Para conocer el efecto de la península como barrera geográfica, estudios sobre estructura poblacional en *M. henlei* muestran que los individuos del GC y del Pacífico representan una metapoblación con un flujo significativo y no hay evidencia de una estructura genética asociada a barreras históricas, más bien una reciente colonización en esta área (~1m.a), enfatizando una mayor capacidad de dispersión y la diferencia con otros elasmobranquios bénticos, como batoideos, en los que sí se encontró una fuerte diferenciación genética (Sandoval-Castillo 2011). Recordando que esta especie presenta una distribución discontinua hacia Ecuador y Perú, su divergencia pudiera estar más ligada a la historia del Istmo de Panamá.

Si bien la divergencia de las especies del Pacífico oriental no se relaciona directamente con los eventos vicariantes del GC, la complejidad del ambiente en esta región y los continuos cambios ambientales, pudieron favorecer la colonización de hábitats por medio de la dispersión. Como se menciona anteriormente este modelo se ha propuesto para *M. antarcticus*, *M. stevensi* y *M. lenticulatus* (Boomer et al. al. 2012).

Finalmente, en relación a la especiación ecológica (simpátrica y parapátrica), cada vez más estudios apoyan este mecanismo de divergencia, particularmente en ambientes marinos dado a las pocas barreras biogeográficas que se presentan en comparación con los ambientes terrestres. En este proceso el aislamiento reproductivo se desarrolla como consecuencia de la selección divergente sobre caracteres morfológicos, fisiológicos o de comportamiento relacionados al ambiente (Schluter 2001). La especiación simpátrica se define como la divergencia de especies sin aislamiento geográfico. Uno de los bemoles de este modelo es la dificultad de obtener datos empíricos y la dificultad de rechazar la hipótesis nula de alopatría, debido a que la mayoría de los casos en los que se puede hipotetizar la especiación simpátrica también pueden explicarse como un contacto secundario posterior a una divergencia por alopatría (Rocha y Bowen 2008). También bajo la especiación simpátrica, el desarrollo de las barreras reproductivas y la adaptación para la coexistencia se desarrollan casi simultáneamente por lo que en la naturaleza parece ser un escenario menos probable. Sin embargo, en peces óseos como los del género *Hexagrammos* se ha podido comprobar experimentalmente el aislamiento reproductivo sin la presencia de una barrera geográfica (Crow et al. al. 2010). Esto también se ha sugerido en otros

peces arrecifales como especies de *Hippocampus* presentes en el Pacífico y el Atlántico y en los ‘hamlets o vacas’ del género *Hypoplectrus*, enfatizando su especialización en el hábitat y breve o ausente periodo de dispersión larval (Rocha y Bowen 2008).

En el modelo parapátrico la divergencia ocurre aún en presencia de cierto flujo genético entre poblaciones. Presenta dos tipos, el primero es el de gradiente en el cual especies con distribuciones continuas a lo largo de hábitat con gradientes ambientales. El segundo tipo se denomina ‘stepping stone’ ya que las especies presentan distribuciones en parches en ambientes con diferente nivel de variación ambiental (Coyne y Orr 2004). Este segundo tipo podría explicar la alta diversificación en hábitats arrecifales, en el que la mayoría de las especies presentan un alto nivel de retención larval, fomentando la reproducción selectiva y atenuando el efecto del flujo génico. Otro factor que tiene influencia en la diferenciación de subpoblaciones es la presencia de barreras intermitentes o parciales las cuales permiten que las adaptaciones locales se alcancen más rápidamente; este tipo de barreras son las más comunes en el ambiente marino (Rocha y Bowen 2008).

En cuanto a elasmobranquios, la mayoría de las especies presenta una distribución continua, en la que se enfrentan a diferentes condiciones ambientales, por lo que el modelo de gradiente parece ser una hipótesis viable especialmente para aquellas de mayor movilidad. En el caso de la raya *Rhinoptera steindachneri*, en la que se propone una especiación criptica, esta pudiera darse bajo el modelo parapátrico, ya que la península de Baja California no representa en este batoido una barrera geográfica evidente, sin embargo la fuerte variación en las condiciones ambientales a lo largo de la distribución en la región del Pacífico y el Golfo de California pudieron promover el proceso de especiación. Es importante enfatizar que el gradiente ambiental se presenta tanto en el eje horizontal de la distribución (geográfico) como en la vertical (columna de agua), y que muchas veces este segundo gradiente puede ser más fuerte. En este gradiente batimétrico las especies de *M. californicus*, *M. lunulatus*, *M. henlei* y *M. albipinnis* muestran una clara diferenciación en su distribución vertical, que involucra otras diferencias en el uso de hábitat, particularmente en sus hábitos alimentarios y que además se refleja en la morfología de los dientes (Tabla 5) En su conjunto esta información podría sugerir un proceso de especiación ecológica.

Tabla 5 Comparación de datos ecológicos y morfológicos de las especies de *Mustelus* presentes en el Pacífico Nororiental

	<i>M.californicus</i>	<i>M.lunulatus</i>	<i>M. albipinnis</i>	<i>M. henlei</i>
Uso de hábitat	0-100m (~20 m)	0-100m (~20 m)	~200m,	30~260m
Alimentación	Crustáceos y poliquetos	Crustáceos y poliquetos	Peces mictofidos y crustáceos	Peces mictofidos y crustáceos
Dientes	Molariformes o con cúspide baja y redondeada	Molariformes o con cúspide baja y redondeada	Fuertemente asimétricos con cúspide redondeada	Ligeramente asimétricos cúspide alta, aguda

#### 8.4 Perspectivas en el estudio de la especiación

Es evidente que el estudio de la especiación se requiere una vasta cantidad de información sobre biología, ecología y genética de las especies, lo cual supone un reto en particular, para aquellas especies cuyo estudio no está tan desarrollado o el acceso a las muestras es complicado como en el caso de los elasmobranquios. Otro reto es el entendimiento del desarrollo de las barreras reproductivas y su componente genético. Afortunadamente este último punto ha mostrado avances importantes a partir de la última década. Con el creciente uso de herramientas moleculares la comprobación de hipótesis biogeográficas y de especiación es más frecuente. Además, por medio de la genómica, la búsqueda de genes involucrados en la especiación provee un nuevo campo de posibilidades (Rocha y Bowen 2008).

Actualmente los criterios para una correcta identificación de los llamados genes de especiación es mucho más completa, estableciendo tres puntos: 1) el gen debe tener un efecto en el aislamiento reproductivo actual; 2) la evolución del locus debe ocurrir antes que el proceso de especiación se complete y; 3) el efecto o grado del gen en el aislamiento reproductivo al momento de su divergencia. Los genes que más se han estudiado son los involucrados en la infertilidad de los híbridos o inviabilidad (aislamiento postcigótico). Sin embargo, la identificación de genes que contribuyan en el aislamiento basado en componentes ecológicos ha sido insuficiente, considerando la frecuencia con que este proceso se puede presentar en la naturaleza. La mayoría

de los estudios se han realizado en insectos incluyendo la mosca de la fruta *Drosophila*, los lepidópteros *Heliconus* y *Ostrina*, mientras que en vertebrados se han incluido al ratón doméstico y algunos peces de la familia Gasterosteidae (Nosil y Schluter 2011).

## **Conclusiones**

El presente estudio permitió resolver satisfactoriamente las relaciones filogenéticas de la mayoría de las especies de *Mustelus*, incluidas en el análisis, principalmente mediante los marcadores mitocondriales. Si bien las topologías obtenidas con genes separados tuvieron una buena resolución, el análisis con las secuencias de ADNmt concatenadas aumentó el soporte estadístico de cada nodo por lo que es altamente recomendable el uso de más de un marcador molecular en estudios filogenéticos posteriores. Este trabajo incluye un mayor número de taxa a lo previamente publicado con excepción de la filogenia realizada por Naylor et al. (2012) y la estimación de los tiempos de divergencia obteniendo un panorama más completo de la evolución del género.

Con relación al uso de marcadores nucleares, los resultados de este trabajo pueden considerarse exploratorios ya que el número de taxa incluidos fue mucho menor que en los mitocondriales y estos genes no han sido ampliamente utilizados en la sistemática de tiburones a nivel de especie.

Para mejorar el resultado obtenido en este estudio podría realizarse un análisis bayesiano mixto en el que se concatenen en un mismo set de datos secuencias nucleares y mitocondriales.

El planteamiento de una posible especiación ecológica para las especies del género *Mustelus* presentes en el Pacífico, permite la exploración de un escenario diferente a lo hipotetizado anteriormente en elasmobranquios, pero que para otras especies marinas como peces óseos o invertebrados es más frecuente. Si bien es necesaria más información sobre estas especies la congruencia de la información ecológica y morfológica con las relaciones filogenéticas obtenidas de *M. albiginnis*, *M. henlei*, *M. californicus* y *M. lunulatus* es un primer dato a considerar en este mecanismo de especiación y en el entendimiento de su historia evolutiva.

## Referencias bibliográficas

Abercrombie, D., S. Clarke and M. Shivji. 2005. Global-scale genetic identification of hammerhead sharks: Application to assessment of the international fin trade and law enforcement. *Conservation Genetics* **6**:775-788.

Acuña-Marrero, D., J. S. Zimmerhackel, J. Mayorga and A. Hearn. 2013. First record of three shark species, *Odontaspis ferox*, *Mustelus albiginnis* and *Centrophorus squamosus*, from the Galápagos Islands. *Marine Biodiversity Records* **6**:1-6.

Avise, J. C. 2004. Molecular Markers, Natural History and Evolution. 2<sup>nd</sup> Ed .Sinauer Associates p.684

Batzoglou, S., N. Pattengale, M. Alipour, O. P. Bininda-Emonds, B. E. Moret and A. Stamatakis. 2009. How Many Bootstrap Replicates Are Necessary? *Research in Computational Molecular Biology*, **17**:337-54

Bizarro, J. J., W. D. Smith, R. E. Hueter, J. Tyminski, J. F. Márquez-Farías, L. J. L.

Castillo-Géniz, G. M. Cailliet y J. C. Villavicencio-Garayzar. 2007. El estado actual de los tiburones y rayas sujetos a explotación comercial en el Golfo de California: una investigación aplicada al mejoramiento de su manejo pesquero y conservación. *Laboratorios Marinos de Moss Landing Pub. Tec*: 261. Recuperado de <http://psrc.mlml.calstate.edu/current-research/golfo-de-california/>

Boomer, J. and A. Stow. 2010. Rapid isolation of the first set of polymorphic microsatellite loci from the Australian gummy shark, *Mustelus antarcticus* and their utility across divergent shark taxa. *Conservation Genetics Resources* **2**:393-395.

Boomer, J. J., R. G. Harcourt, M. P. Francis and A. J. Stow. 2012. Genetic divergence, speciation and biogeography of *Mustelus* (sharks) in the central Indo-Pacific and Australasia. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **64**:697-703.

Castillo-Páez, A., O. Sosa-Nishizaki, J. Sandoval-Castillo, F. Galván-Magaña, M.-d.-P. Blanco-Parra and A. Rocha-Olivares. 2013. Strong Population Structure and Shallow Mitochondrial Phylogeny in the Banded Guitarfish, *Zapteryx exasperata* (Jordan y Gilbert, 1880) from the Northern Mexican Pacific. *Journal of Heredity*. 105: 91-10

Castro-Aguirre, J. L., A. Antuna-Mendiola, A. F. Adrián Felipe González-Acosta and D. I. C.-A. J. 2005. *Mustelus albipinnis* sp. nov. (Chondrichthyes: Carcharhiniformes:Triakidae) de la costa suroccidental de Baja California Sur, México. *Hidrobiologica* **15**: 123–130.

Compagno, L. J. V. 1984. Sharks of the world. An annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. Part 2. Carcharhiniformes. *FAO Fisheries Synopsis* **4**:251-655

Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. 2004 Plan de Acción Nacional para el Manejo y Conservación de Tiburones, Rayas y Especies Afines en México. SAGARPA. Instituto Nacional de la Pesca, México, D.F., . p. 85. Recuperado de [www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/\\_cona\\_plan\\_de\\_manejo\\_de\\_tiburones\\_y\\_rayas](http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/_cona_plan_de_manejo_de_tiburones_y_rayas)

Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca.2012. Anuario estadístico de acuicultura y pesca. SAGARPA, México, D.F. Recuperado de [http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona\\_anuario\\_estadistico\\_de\\_pesca](http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona_anuario_estadistico_de_pesca)

Corrigan, S. and L. B. Beheregaray. 2009. A recent shark radiation: Molecular phylogeny, biogeography and speciation of wobbegong sharks (family: Orectolobidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **52**:205-216.

Coyne, J. A. and H. A. Orr. 2004. Speciation. Sinauer Associates p. 545

Crow, K. D., H. Munehara and G. Bernardi. 2010. Sympatric speciation in a genus of marine reef fishes. *Molecular Ecology* **19**:2089-2105.

Chiari, Y., A. van der Meijden, O. Madsen, M. Vences and A. Meyer. 2009. Base composition, selection, and phylogenetic significance of indels in the recombination activating gene-1 in vertebrates. *Frontiers in Zoology* **6**:1-15.

Diario Oficial de la Federación. 2007. Norma Oficial Mexicana NOM-029-PESC-2006. Pesca responsable de tiburones y rayas: Especificaciones para su aprovechamiento. SAGARPA, México D.F.

Recuperado de [www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4962277&fecha=14/02/2007](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4962277&fecha=14/02/2007)

Excoffier, L. and H. E. L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* **10**:564-567.

Gemmell, N. J. and S. Akiyama. 1996. An efficient method for the extraction of DNA from vertebrate tissues. *Trends in Genetics* **12**:338-339.

Gregory, T. R. 2008. Understanding Evolutionary Trees. *Evolution: Education and Outreach* **1**:121-137.

Heemstra, P. C. 1973. A review of the shark genus *Mustelus* (Squaliformes: Carcharhinidae). (PhD Thesis, University of Miami).

Heled, J. and A. J. Drummond. 2010. Bayesian Inference of Species Trees from Multilocus Data. *Molecular Biology and Evolution* **27**:570-580.

Iglésias, S. P., G. Lecointre and D. Y. Sellos. 2005. Extensive paraphyly within sharks of the order Carcharhiniformes inferred from nuclear and mitochondrial genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **34**:569-583.

IUCN. 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>.

Jacobs, D. K., T. A. Haney and K. D. Louie. 2004. Genes, diversity and geological process on the Pacific Coast *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* **32**:601-652.

Lim, D. D., P. Motta, K. Mara and A. P. Martin. 2010. Phylogeny of hammerhead sharks (Family Sphyrnidae) inferred from mitochondrial and nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **55**:572-579.

López, J. A., J. A. Ryburn, O. Fedrigo and G. J. P. Naylor. 2006. Phylogeny of sharks of the family Triakidae (Carcharhiniformes) and its implications for the evolution of carcharhiniform placental viviparity. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **40**:50-60.

Lluch-Cota, S. E., E. A. Aragón-Noriega, F. Arreguín-Sánchez, D. Aurióles-Gamboa, J. Jesús Bautista-Romero, R. C. Brusca, R. Cervantes-Duarte, R. Cortés-Altamirano, P. Del-Monte-Luna, A. Esquivel-Herrera, G. Fernández, M. E. Hendrickx, S. Hernández-Vázquez, H. Herrera-Cervantes, M. Kahru, M. Lavín, D. Lluch-Belda, D. B. Lluch-Cota, J. López-Martínez, S. G. Marinone, M. O. Nevárez-Martínez, S. Ortega-García, E. Palacios-Castro, A. Parés-Sierra, G. Ponce-Díaz, M. Ramírez-Rodríguez, C. A. Salinas-Zavala, R. A. Schwartzlose and A. P. Sierra-Beltrán. 2007. The Gulf of California: Review of ecosystem status and sustainability challenges. *Progress in Oceanography* **73**:1-26.

Maddison, W. P. and L. L. Knowles. 2006. Inferring Phylogeny Despite Incomplete Lineage Sorting. *Systematic Biology* **55**:21-30.

Magnussen, J. E., E. K. Pikitch, S. C. Clarke, C. Nicholson, A. R. Hoelzel and M. S. Shivji. 2007. Genetic tracking of basking shark products in international trade. *Animal Conservation* **10**:199-207.

Marquez-Farias, F. 2000. Tiburones del Golfo de California. SEMARNAP, México Recuperado de [http://www.inapesca.gob.mx/portal/documentos/publicaciones/pelagicos/libro\\_Rojo.pdf](http://www.inapesca.gob.mx/portal/documentos/publicaciones/pelagicos/libro_Rojo.pdf)



- Martin, A. P. 1999. Substitution rates of organelle and nuclear genes in sharks: implicating metabolic rate (again). *Molecular Biology and Evolution* **16**:996-1002.
- Martinez- Castilla, L. 2007. Reconstrucción de la historia de cambio de los caracteres. In L. Eguiarte, V. Souza and X. Aguirre, (Eds.): *Ecología molecular*, p. 87-152. Instituto Nacional de Ecología, México.
- Méndez-Loeza, I. 2004. Hábitos alimentarios de los cazones *Mustelus californicus* y *Mustelus lunulatus* (Triakidae) en el alto Golfo de California (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma de Baja California. México p.59
- Musick, J. A. and J. K. Ellis. 2005. Reproductive Evolution of Chondrichthyans. In W. C. Hamlett, (Ed.): *Reproductive Biology and Phylogeny of Chondrichthyes: Sharks, Batoids, and Chimaeras*, p. 45-79. Science Publishers. U.S.A
- Naylor, G. J. P., J. N. Caira, K. Jensen, K. A. M. Rosana, N. Straube and L. C. 2012. Elasmobranch Phylogeny: A mitochondrial estimate based on 595 species.. In J.C. Carrier, (Ed.): *The Biology of Sharks and Their Relatives*. pp. 31-56. CRC Press, Taylor & Francis
- Naylor, G. J. P., J. A. Ryburn, O. Fedrigo and A. López. 2005. Phylogenetic relationships among the major lineages of sharks and rays deduced from multiple genes. In W. H. a. B. Jamieson, (Ed.): *In Reproductive Biology and Phylogeny of Chondrichthyans (Sharks, skates, stingrays and chimaeras)*. p. 1-25. University of Queensland Press.
- Network, T. M. C. S. 2012. What do we need to know about speciation? *Trends in ecology & evolution* **27**:27-39.

Norris, R. and P. Hull. 2012. The temporal dimension of marine speciation. *Evolutionary Ecology* **26**:393-415.

Nosil, P. and D. Schluter. 2011. The genes underlying the process of speciation. *Trends in ecology & evolution* **26**:160-167.

Palumbi, S. R. 1994. Genetic Divergence, Reproductive Isolation, and Marine Speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics* **25**:547-572.

Pank, M., M. Stanhope, L. Natanson, N. Kohler and M. Shivji. 2001. Rapid and Simultaneous Identification of Body Parts from the Morphologically Similar Sharks *Carcharhinus obscurus* and *Carcharhinus plumbeus* (Carcharhinidae) Using Multiplex PCR. *Marine Biotechnology* **3**:231-240.

Paton, T. A., A. J. Baker, J. G. Groth and G. F. Barrowclough. 2003. RAG-1 sequences resolve phylogenetic relationships within Charadriiform birds. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **29**:268-278.

Pérez-Jiménez, J. C. 2006. Biología y taxonomía de los tiburones del género *Mustelus* (Elasmobranchii) de la región norte del Golfo de California. p. 173 (Tesis de doctorado) Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.

Pérez-Jiménez, J. C., O. S. Nishizaki, J. L. Castillo Geniz and D. Buth. 2005. A New Eastern North Pacific Smoothhound Shark (Genus *Mustelus*, Family Triakidae) from the Gulf of California. *Copeia* **2005**:834-845.

Pérez-Jiménez, J. C., A. Rocha-Olivares and O. Sosa-Nishizaki. 2012. Morphological and molecular differentiation of smooth-hound sharks (Genus *Mustelus*, Family Triakidae) from the Gulf of California. *Journal of Applied Ichthyology* **29**:268-270.

Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* **25**:1253-1256.

Rocha, L. A. and B. W. Bowen. 2008. Speciation in coral-reef fishes. *Journal of Fish Biology* **72**:1101-1121.

Rocha, L. A., K. C. Lindeman, C. R. Rocha and H. A. Lessios. 2008. Historical biogeography and speciation in the reef fish genus *Haemulon* (Teleostei: Haemulidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **48**:918-928.

Rodríguez-Quiroz, G., E. A. Aragón-Noriega, W. Valenzuela-Quiñónez and H. M. Esparza-Leal. 2010. Artisanal fisheries in the conservation zones of the Upper Gulf of California. *Revista de biología marina y oceanografía* **45**:89-98.

Ronquist, F. and J. P. Huelsenbeck. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**:1572-1574.

Rosa, M. R. and O. B. F. Gadig. 2010. Taxonomic comments and an identification key to species for the Smooth-hound sharks genus *Mustelus* Link, 1790 (Chondrichthyes: Triakidae) from the Western South Atlantic. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* **5**:401-413.

Sandoval-Castillo, J., A. Rocha-Olivares, C. Villavicencio-Garayzar and E. Balart. 2004. Cryptic isolation of Gulf of California shovelnose guitarfish evidenced by mitochondrial DNA. *Marine Biology* **145**:983-988.

Sandoval-Castillo, J. and A. Rocha-Olivares. 2011. Deep Mitochondrial Divergence in Baja California Populations of an Aquilopelagic Elasmobranch: The Golden Cownose Ray. *Journal of Heredity* **102**:269-274.

Sandoval-Castillo, J. R. 2011. Evolutionary history, seascape genetics and speciation in elasmobranchs from the Gulf of California.(Ph Thesis). Macquarie University.

Santana-Morales, O., J. L. Castillo-Geniz, O. Sosa-Nishizaki and C. Rodríguez-Medrano. 2004. Catálogo de tiburones, rayas y quimeras (Condricthyes) que habitan en las aguas del norte del Golfo de California. p. 119. Reporte técnico Laboratorio de Ecología Pesquera, CICESE. [biblioteca.cicese.mx/libros/cat-omar.pdf](http://biblioteca.cicese.mx/libros/cat-omar.pdf)

Schluter, D. 2001. Ecology and the origin of species. *Trends in ecology & evolution* **16**:372-380.

Schultz, J. K., K. A. Feldheim, S. H. Gruber, M. V. Ashley, T. M. McGovern and B. W. Bowen. 2008. Global phylogeography and seascape genetics of the lemon sharks (genus *Negaprion*). *Molecular Ecology* **17**:5336-5348.

Sims, D. W. 2003. Tractable models for testing theories about natural strategies: foraging behaviour and habitat selection of free-ranging sharks. *Journal of Fish Biology* **63**:53-73.

Steppan, S. J., B. L. Storz and R. S. Hoffmann. 2004. Nuclear DNA phylogeny of the squirrels (Mammalia: Rodentia) and the evolution of arboreality from c-myc and RAG1. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **30**:703-719.

Swofford, D. L., G. J. Olsen, P. J. Waddell, and D. M. Hillis. 1996. Phylogenetic inference. in D. M. Hillis, C. Moritz, and B. Mable (eds.) *Molecular Systematics* Pages 407-425 (2nd ed.), Sinauer Associates.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.

Vannuccini, S. 1999. Shark utilization, marketing and trade *FAO Tech Fish Pap* pp. 1–470. FAO.

Vélez-Zuazo, X. and I. Agnarsson. 2011. Shark tales: A molecular species-level phylogeny of sharks (Selachimorpha, Chondrichthyes). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **58**:207-217.