



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
DOCTORADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA  
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA  
BIOLOGÍA MARINA

ESTRUCTURA GENÉTICA DEL PEZ DORADO (*Coryphaena hippurus*)  
DENTRO DE SU ÁMBITO DE DISTRIBUCIÓN MUNDIAL

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:  
NATALIA JULIANA BAYONA VÁSQUEZ

DR. PÍNDARO DÍAZ JAIMES  
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

COMITÉ TUTORAL  
Dra. SOFÍA ORTEGA GARCÍA (Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, IPN)  
Dr. DANIEL PIÑERO DALMAU (Instituto de Ecología, UNAM)  
Dr. AXAYACATL ROCHA OLIVARES (Centro de Investigación Científica y  
Educación Superior de Ensenada)  
Dr. LUIS EGUIARTE FRUNS (Instituto de Ecología, UNAM)

MÉXICO, D. F. AGOSTO 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**

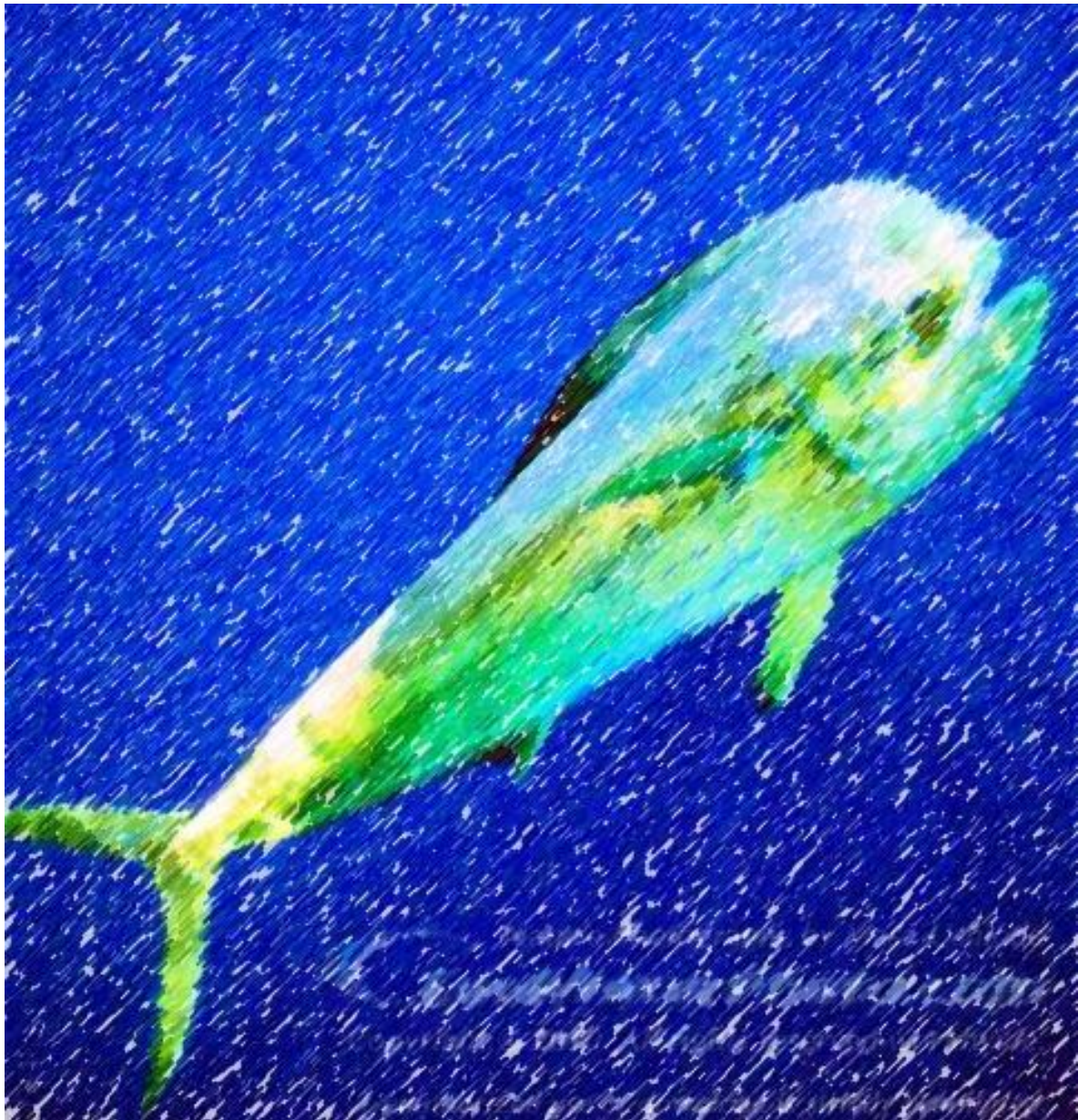


**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



U.N.A.M.

*ESTRUCTURA GENÉTICA DEL PEZ DORADO (Coryphaena hippurus)  
DENTRO DE SU ÁMBITO DE DISTRIBUCIÓN MUNDIAL*

Laboratorio de Genética de Organismos Acuáticos | MSc. NATALIA BAYONA



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología  
Universidad Nacional Autónoma de México



***ESTRUCTURA GENÉTICA DEL PEZ DORADO (*Coryphaena hippurus*)  
DENTRO DE SU ÁMBITO DE DISTRIBUCIÓN MUNDIAL***

**T E S I S**

*que para obtener el grado académico de*

***DOCTORA EN CIENCIAS***

*(Biología Marina)*

**P R E S E N T A:**

**BIOL. NATALIA JULIANA BAYONA VÁSQUEZ**

**Director de Tesis**

**Dr. PÍNDARO DÍAZ JAIMES**

**Comité Tutorial**

**Dra. SOFÍA ORTEGA GARCÍA**

**Dr. DANIEL PIÑERO DALMAU**

**Dr. AXAYACATL ROCHA OLIVARES**

**Dr. LUIS EGUIARTE FRUNS**

**MÉXICO, DF. 2015**

## Hoja de Datos del Jurado

<p><b>1.</b> Datos del alumno Bayona Vásquez Natalia Juliana Universidad Nacional Autónoma de México Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología Orientación en Biología Marina</p>
<p><b>2.</b> Datos del Tutor Dr. Píndaro Díaz Jaimes</p>
<p><b>3.</b> Datos del sinodal 1 Dra. Sofía Ortega García</p>
<p><b>4.</b> Datos del sinodal 2 Dr. Axayacatl Rocha Olivare</p>
<p><b>5.</b> Datos del sinodal 3 Dr. Daniel Piñero Dalmau</p>
<p><b>6.</b> Datos del sinodal 4 Dr. Luis Eguiarte Fruns</p>
<p><b>7.</b> Datos del trabajo escrito Estructura genética del pez dorado (<i>Coryphaena hippurus</i>) en su ámbito de distribución mundial 2015</p>

*A mi madre.*

*Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand  
more, so that we may fear less*  
**Marie Curie**

## **Agradecimientos**

Agradezco a mis padres y hermanos, quienes han significado el apoyo y la motivación para cumplir mis objetivos y quienes siempre han estado pendiente de mi desarrollo personal y académico. Les agradezco el amor y la confianza que aún en la distancia me brindaron y que fue aliciente para querer desarrollar de la mejor forma y culminar ésta etapa académica.

A mi director de tesis, Dr. Píndaro Díaz Jaimes, quien incluso antes de conocerme en persona me abrió las puertas del Laboratorio y ha sido un gran mentor a través de este recorrido académico. Gracias a sus consejos y críticas constructivas, sin los cuales no se hubiera ensamblado el documento, pero más importante aún, la científica que soy hoy en día.

De igual forma agradezco a los miembros del Comité Tutoral y Jurados, quienes desde la presentación del anteproyecto han realizado grandes contribuciones al mismo. Al Dr. Manuel Uribe Alcocer, Dr. Travis Glenn, Dr. Brant Faircloth y Todd Pierson por brindarme asesoría y ser ejemplo e inspiración de buena praxis científica.

A mi familia en México, representada por el Laboratorio de Genética de Organismos Acuáticos, quienes considero excelentes colegas y compañeros. Pero además, a la familia fuera del laboratorio, quienes hicieron del quehacer científico un camino más divertido y lleno de cariño.

Al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología por el respaldo y apoyo económico. A PAPPIT por el apoyo con recursos de los proyectos: IN208408 “Filogeografía comparativa del dorado (*Coryphæna hippurus*) y el atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*) de la cuenca del Pacífico” e IN221910 “Estructura genética y filogeografía global del dorado *Coryphaena hippurus* mediante marcadores nucleares y mitocondriales”. A CONACYT por el apoyo para realizar estudios de doctorado, así como apoyo en el proyecto: “Genómica poblacional e historia demográfica del pez dorado (*Coryphaena hippurus*) y del atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*)”

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mapa de las localidades de colecta de <i>C. hippurus</i> a lo largo del rango de distribución	Pag. 14
Figura 2	Mapa de ubicación de los sitios de colecta de muestras de dorado ( <i>C. hippurus</i> ) en la costa del Pacífico mexicano.	Pag. 15
Figura 3	Insertos de clonas obtenidas en la biblioteca genómica enriquecida con dos tipos de sondas: CT <sub>15</sub> (sonda 1) y GT <sub>12</sub> (sonda 2). Para este ensayo se seleccionaron ocho clonas al azar por cada sonda.	Pag. 28
Figura 4	Histograma del número de colonias obtenidas, secuenciadas y de las cuales se diseñaron <i>primers</i> , para cada sonda de repetición.	Pag. 28
Figura 5	Fotografía de gel de acrilamida-bisacrilamida al 6% en donde se observan los productos de amplificación del <i>locus</i> Chi062 a diferentes temperaturas de alineamiento, en muestras de diferentes poblaciones.	Pag. 29
Figura 6	Representación del total de <i>loci</i> obtenidos y de los cuales fue posible diseñar <i>primers</i> de acuerdo a la longitud del monómero.	Pag. 30
Figura 7	Curva de acumulación de genotipos.	Pag. 34
Figura 8	Número de alelos por <i>locus</i> . De izquierda a derecha: Chi008, Chi023, Chi002, Chi008A, Chi037, Chi004, Chi024, Chi062, Chi113, Chi166, Chi284, Chi357, Chi368, Chi 389, Chi430, Chi453, Chi601, Chi634, Chi652, Chi688, Chi797, Chi853, Chi878, Chi967. a) Para todas las muestras. b) Por cuenca.	Pag. 35
Figura 9	Mapa de calor de valores de significancia para la prueba de Equilibrio de Hardy-Weinberg. Los recuadros rosas representan un $p \leq 0.05$ y por lo tanto representa los <i>locus</i> /localidades para los cuales la $H_0$ de equilibrio de las frecuencias bajo Hardy-Weinberg es rechazada.	Pag. 37
Figura 10	Relación entre los estadísticos $F_{ST}$ (Weir & Cockerham, 1984) y $D$ (Jost, 2008) y el número promedio de alelos por <i>locus</i> para el presente set de datos.	Pag. 38
Figura 11	Distribución de las $F_{ST}$ calculadas con 1000 permutaciones a partir de la distribución aleatoria de los datos. La flecha indica la clase donde se encuentra el estadístico $F_{ST}$ calculado.	Pag. 39
Figura 12	Análisis Factorial de Correspondencia de las poblaciones del Pacífico, Índico, Atlántico Y Mar Mediterráneo mediante el análisis de 24 <i>loci</i> microsatelitales. Los individuos en amarillo provienen de la cuenca del Pacífico, los de azul del Índico, los blancos (círculo verde) del Atlántico y los grises del Mediterráneo.	Pag. 40
Figura 13	Mapa con los gráficos de las proporciones de mezcla para $k=4$ . El tamaño de los círculos corresponde al $N$ muestral.	Pag. 41
Figura 14	Árbol rectangular de distancias genéticas $F_{ST}$ generadas para los genotipos microsatelitales en <i>C. hippurus</i> usando TREEFIT.	Pag. 42
Figura 15	Mapa de barreras al flujo genético utilizando como réplicas las diferentes matrices de $F_{ST}$ corregidas por alelos nulos generadas para cada uno de los <i>locus</i> , así como la matriz de diferencias	Pag. 43



	entre océanos del estadístico $D'Jost$ . Las líneas más gruesas representan aquellas barreras con mayor soporte. Arriba, las barreras entre cuencas oceánicas. Abajo, las barreras entre localidades de las cuencas oceánicas.	
Figura 16	<b>a)</b> Mapa de calor para el estadístico corregido para alelos nulos $F_{ST}$ . <b>b)</b> Mapa de calor para los valores de significancia estadística, los recuadros rosas indican un valor de $p \leq 0.05$ . Sobre la diagonal se grafican los valores $p$ para el estadístico $D'Jost$ y bajo la diagonal los valores $p$ para $F_{ST}$ .	Pag. 45
Figura 17	Gráfico de barras para $K=6$ de la prueba de $LnP(D)$ desarrollada en STRUCTURE (Pritchard et al, 2000) para las localidades colectadas dentro del Océano Pacífico.	Pag. 46
Figura 18	Gráfico de barras para $K=4$ de la prueba de $LnP(D)$ desarrollada en STRUCTURE (Pritchard et al, 2000) para las localidades colectadas dentro del Océano Atlántico.	Pag. 48
Figura 19	Gráfico de barras para $K=2$ de la prueba de $LnP(D)$ desarrollada en STRUCTURE (Pritchard et al, 2000) para las localidades colectadas dentro del Océano Índico.	Pag. 50
Figura 20	Gráfico circular del flujo de migrantes entre cuencas oceánicas, a partir de los datos de $4Nm$ calculados con el software MIGRATE.	Pag. 52
Figura 21	Transporte de aguas cálidas de la corriente de Agulhas hacia la corriente de Benguela y estacionalidad de la TSA de la misma. (Modificado de: Gyory et al., 2013)	Pag. 59
Figura 22	Paneles a, b y c mapas paleo-oceanográfico del Mar Mediterráneo y regiones adyacentes a través del tiempo, algunas líneas costeras actuales se dibujaron como referencia. Gris indica extensiones de tierra, azul claro indica aguas de baja salinidad, azul oscuro regiones hiper-salinas. Panel d Fluctuaciones en el nivel del Mar durante el Pleistoceno. (Tomado de: Patarnello, 2007).	Pag. 62
Figura 23	Capturas de <i>C. hippurus</i> reportado por la FAO (Tomado de: <a href="http://www.fao.org/docrep/009/a0653e/a0653e05.htm">http://www.fao.org/docrep/009/a0653e/a0653e05.htm</a> ).	Pag. 64

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1	<i>Loci</i> aislados a partir de la biblioteca enriquecida. pb: pares de bases.	Pag. 29
Tabla 2	Resumen de lecturas y microsatélites obtenidos mediante secuenciación de siguiente generación.	Pag. 31
Tabla 3	<i>Loci</i> microsatelitales y secuencias <i>primer</i> para <i>C. hippurus</i> . * <i>Loci</i> polimórficos. En rojo se resaltan los <i>loci</i> polimórficos eliminados del análisis.	Pag. 32
Tabla 4	Tamaño muestral genotipificado por cuenca y por <i>loci</i> .	Pag. 33
Tabla 5	Estimados de diferenciación genética. Sobre la diagonal, los estadísticos de diferenciación <i>D'Jost</i> . Bajo la diagonal, valores del índice de fijación $F_{ST}$ . En rojo se resaltan aquellos valores significativos estadísticamente ( $p < 0.05$ )	Pag. 40
Tabla 6	Prueba de diferenciación jerárquica AMOVA para las cuencas oceánicas donde se encuentra <i>C. hippurus</i> .	Pag. 41
Tabla 7	<b>Tabla 7.</b> Tabla de diferenciación entre pares de localidades del Océano Pacífico. Entre paréntesis el valor $p$ de la prueba. Bajo la diagonal, estadísticos calculados de $F_{ST}$ corregidos por alelos nulos. Sobre la diagonal, estadísticos <i>D'Jost</i> . En negrita e resaltan los valores cuya significancia es $< 0.05$ , en rojo se resaltan los valores que presentaron un $p \leq 0.0002$ (corregido por Bonferroni).	Pag. 47
Tabla 8	Tabla de diferenciación entre pares de localidades del Océano Atlántico. Valor $p$ entre paréntesis. Bajo la diagonal, estadísticos calculados de $F_{ST}$ corregidos por alelos nulos. Sobre la diagonal, estadísticos <i>D'Jost</i> . En negrita se resaltan los valores que presentaron un $p \leq 0.05$ . En rojo se resaltan aquellos valores que permanecen significativos después de corregir por Bonferroni ( $\alpha = 0.0002$ )	Pag. 49
Tabla 9	Tabla de diferenciación entre pares de localidades del Océano Índico. Valores $p$ entre paréntesis. Bajo la diagonal, estadísticos calculados de $F_{ST}$ corregidos por alelos nulos. Sobre la diagonal, estadísticos <i>D'Jost</i> . En negrita se resaltan los valores que presentaron un $p \leq 0.05$ . En rojo se resaltan los valores que permanecen significativos después de la corrección por Bonferroni ( $\alpha = 0.0002$ )	Pag. 50
Tabla 10	Tabla de los resultados obtenidos en la prueba de Mantel, en la comparación de las matrices de distancias genéticas y geográficas.	Pag. 51
Tabla 11	Tamaños efectivos poblacionales recientes e históricos, estimados para cada cuenca oceánica. Entre paréntesis se presenta el valor de $\theta$ . DL: método de Desequilibrio de ligamiento. HE: método de exceso de heterocigotos.	Pag. 51
Tabla 12	Matriz bidireccional de los valores de tasa de migración $m$ calculados para cada cuenca oceánica.	Pag. 52
Tabla 13	Valores de diferenciación genética de acuerdo a las márgenes continentales. Bajo la diagonal se presentan los	Pag. 57

	valores de $\Phi_{ST}$ obtenidos por Diaz-Jaimes <i>et al.</i> (2010) para el gen mitocondrial ND2, señalando en negrita aquellos valores que resultaron significativos ( $p \leq 0.025$ ). Sobre la diagonal se presentan los valores de $D'_{Jost}$ obtenidos para los marcadores microsatelitales, señalando en negrita los valores que resultaron significativos después de Bonferroni ( $p \leq 0.006$ ).	
--	--	--

## Índice

<b>I. Resumen</b>	1
<b>II. Abstract</b>	2
<b>III. Introducción</b>	3
<b>IV. Antecedentes</b>	7
4.1 Aspectos biológicos	7
4.2 Aspectos genéticos	8
4.3 Aspectos pesqueros	9
<b>V. Hipótesis</b>	11
<b>VI. Objetivos</b>	12
6.1 Objetivo general	12
6.2 Objetivos específicos	12
<b>VII. Métodos y Materiales</b>	13
7.1 Área de estudio	13
7.2 Colecta de muestras	16
7.3 Extracción de ADN genómico	16
7.4 Aislamiento de <i>loci</i> microsatelitales	17
7.4.1 Mediante bibliotecas genómicas enriquecidas	17
7.4.2 Mediante tecnologías de secuenciación de nueva generación	17
7.5 <i>Primers</i> y amplificación por PCR	18
7.6 Genotipificación	19
7.7 Análisis de datos	20
7.7.1 Análisis de diversidad genética	20
7.7.2 Prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio por ligamiento	20
7.7.3 Análisis de estructura poblacional	23
7.7.4 Análisis de aislamiento por distancia	25
7.7.5 Estimación de tamaño efectivo poblacional y número de migrantes	25
<b>VIII. Resultados</b>	27
8.1 Extracción de ADN	27

8.2 Aislamiento de <i>loci</i> microsatelitales	27
8.2.1 Mediante bibliotecas genómicas enriquecidas	27
8.2.2 Mediante tecnologías de secuenciación de siguiente generación	30
8.3 Genotipificación	33
8.4 Análisis de datos	34
8.4.1 Análisis de diversidad genética	34
8.4.2 Prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio por ligamiento	36
8.4.3 Análisis de estructura poblacional	38
8.4.3.1 Diferenciación entre cuencas oceánicas	39
8.4.3.2 Diferenciación dentro de cuencas oceánicas	44
8.4.3.2.1 Océano Pacífico	46
8.4.3.2.2 Océano Atlántico	48
8.4.3.2.3 Océano Índico	49
8.4.4 Análisis de aislamiento por distancia	51
8.4.5 Estimación de tamaño efectivo poblacional y tasas de migración	51
<b>IX. Discusión</b>	53
9.1 Diversidad genética	53
9.2 Estructura poblacional	56
9.2.1 Barreras biogeográficas	60
9.2.2 El aislamiento del Mar Mediterráneo	61
9.2.3 Divergencia al interior de cuencas oceánicas	63
9.3 Tamaño efectivo poblacional y flujo génico	66
9.4 Implicaciones para el manejo y la conservación	70
<b>X. Conclusiones</b>	72
<b>XI. Literatura Citada</b>	73
<b>XII. Anexos</b>	91

## I. Resumen

La diferenciación genética de los peces pelágicos en el ambiente marino es controversial. Particularmente en especies altamente móviles, que presentan grandes tamaños efectivos poblacionales y por lo tanto niveles de diversidad genética altos, los cuales usualmente merman la señal de diferenciación genética. El dorado (*Coryphaena hippurus*), es un pez epi-pelágico, de distribución global, altamente migratorio. Sin embargo, la estructura poblacional de la especie y conectividad es poco entendida.

Este estudio, mediante el uso de herramientas moleculares, evalúa los patrones espaciales de la diversidad genética y la conectividad de las poblaciones entre las cuencas oceánicas, para entender la estructura genética poblacional a nivel global de la especie. Se aislaron diecinueve marcadores microsatelitales y se genotipificaron veinticuatro en un total de 725 individuos provenientes de diferentes localidades a lo largo y ancho de su rango de distribución, incluyendo el Mar Mediterráneo. La diversidad genética resultó alta, con una heterocigosis media observada de 0.815. Los estadísticos  $F_{ST}$  estimados sugieren una pequeña pero significativa divergencia entre cuencas oceánicas ( $F_{CT}= 0.013$ ;  $p = 0.036$ )

El patrón obtenido es similar al observado en otras especies de peces pelágicos, para los cuales se ha reportado divergencia entre el Indo-Pacífico y el Atlántico, además de una alta y significativa diferenciación entre las poblaciones del Atlántico y el Mar Mediterráneo. Por otro lado, cierto grado de diferenciación también fue obtenida dentro de cuencas Oceánicas, predominantemente entre el Atlántico Oriental y Occidental y el Índico Oriental y Occidental.

Este patrón espacial es atribuido, primero a procesos geológicos y paleo-climáticos que causaron que las masas de tierra continental separaran las principales cuencas oceánicas, y que restringieron la distribución y los movimientos de la especie gracias al descenso de la temperatura superficial del agua durante las glaciaciones del Pleistoceno. Adicionalmente, esta divergencia reciente puede ser promovida por factores ecológicos tales como fidelidad a sitios de agregación y movimientos limitados relacionados con características oceanográficas, tales como corrientes y frentes de diferentes masas de agua.



## II. Abstract

Genetic differentiation for pelagic fish in the marine realm is controversial. Particularly in highly mobile species, with large population sizes and therefore high genetic diversity levels, which usually hide the population genetic structure signal. Dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) is an epipelagic, widely distributed and highly mobile fish. Nevertheless, its population structure and connectivity are poorly understood.

This study attempted to use molecular techniques to assess the spatial pattern of genetic diversity and connectivity of populations among ocean basins, in order to understand the species' population genetic structure at a global scale. Nineteen microsatellite loci were isolated and twenty four were genotyped in 725 samples from different locations worldwide, including the Mediterranean Sea. The genetic diversity was high with a mean observed heterocigosity of 0.815. The F-statistic estimates suggested a slight but significant divergence among ocean basins ( $F_{CT} = 0.013$ ; p value = 0.036).

The resulted pattern is similar to what has been observed in other pelagic fish, where there has been reported divergence between the Indo-Pacific and Atlantic besides a highly significant differentiation between the Atlantic and Mediterranean populations. Nevertheless, some extent of differentiations was also observed within Ocean basins, predominately within between East and West Atlantic and East and West Indian Ocean.

This spatial pattern is attributed first to geological and paleo-climate processes that originated the continental lands separating the main ocean basins, which restricted the distribution and the species' movement by the decrease of surface ocean temperature during Pleistocene glaciations. But also, this recent divergence may arise due to ecological features as site fidelity and limited movements related with oceanographic characteristics such as currents and front sea water masses.



## **ESTRUCTURA GENÉTICA DEL PEZ DORADO (*Coryphaena hippurus*) DENTRO DE SU ÁMBITO DE DISTRIBUCIÓN MUNDIAL**

### **III. Introducción**

El uso de marcadores moleculares para detectar y cuantificar la variabilidad genética en las poblaciones naturales se ha incrementado en los últimos años, propiciando la generación de una importante cantidad de datos acerca de la estructura genética presente en los organismos que habitan el ambiente marino. Estos estudios han confirmado que, por lo general, existen niveles bajos de diferenciación genética en los peces pelágicos (Ward *et al.*, 1994; Waples, 1998), en especial aquellas especies de distribución cosmopolita como los atunes (Graves, 1998; Alvarado-Bremer *et al.*, 1998; Ely *et al.*, 2005), picudos (Chow *et al.*, 1997; Buonaccorsi *et al.*, 1999; Graves & McDowell, 2003), tiburones (Keeney & Heist, 2006; Duncan *et al.*, 2006; Castro *et al.*, 2007), y en otros grupos de especies como tortugas (Bowen & Karl, 2007) y ballenas (Hoelzel *et al.*, 2002). Incluso, resulta controversial que en especies separadas por barreras geográficas evidentes como son aquellas que separan a las diferentes cuencas oceánicas, no hayan sido detectadas diferencias genéticas, tal es el caso de la ausencia de divergencia en genes mitocondriales, entre poblaciones del Pacífico y el Atlántico de algunas especies de atunes de distribución tropical y el wahoo (Graves *et al.*, 1984; Graves & Dizon, 1989; Scoles & Graves, 1993; Gonzalez *et al.*, 2008; Theisen *et al.*, 2008), al igual que en el dorado *Coryphaena hippurus* (Díaz-Jaimes *et al.*, 2010).

La homogeneidad genética entre poblaciones ampliamente distribuidas ha sido atribuida a las oportunidades de flujo genético que ofrece un ambiente en apariencia carente de barreras físicas y/o geográficas. Lo anterior propicia la mezcla de huevos, larvas y adultos en diferentes escalas de tiempo y espacio incluso entre cuencas oceánicas; además de agentes intrínsecos de la historia de vida de las especies, como altas tasas de migración (Grant & Bowen, 1998), grandes tamaños efectivos poblacionales que por lo general presentan las especies pelágicas (Ely *et al.* 2005) y que disminuye el efecto de la deriva génica sobre las poblaciones.

No obstante, una alta capacidad de dispersión y la ausencia de barreras físicas al flujo génico no necesariamente se traducen en panmixia; existen factores físicos como la distancia geográfica, las corrientes y los frentes oceánicos, entre otras, que limitan el libre flujo de





genes representando fuerzas que promueven el aislamiento de las poblaciones. Así mismo, otras características ecológicas tales como la presencia de áreas de desove y la fidelidad a las mismas (filopatría), han resultado en niveles de divergencia significativos, tal como ha sido documentado en especies como los atunes distribuidos en regiones templadas (Chow & Ushiyama, 1995; Alvarado-Bremer *et al.*, 1998).

Los estudios genéticos mediante el análisis de ADN mitocondrial en especies pelágicas de amplia distribución y características biológicas similares a la del dorado, han mostrado la existencia de dos clados ampliamente divergentes con diferencias en la frecuencia de haplotipos entre las poblaciones del Atlántico e Indo-Pacífico. Tal es el caso del atún patudo *Thunnus obesus* (Alvarado-Bremer *et al.*, 1998; Durand *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2006), la albacora *Thunnus alalunga* (Chow & Ushiyama, 1995), el pez espada *Xiphias gladius* (Alvarado-Bremer *et al.*, 1995, 2005; Rosel & Block, 1996), el pez vela *Istiophorus platypterus* y el marlín azul *Makaira nigricans* (Graves & McDowell, 2003). Dicho patrón filogeográfico ha sido explicado considerando tanto la historia de vida como los procesos históricos por los que pudieron haber atravesado estas especies (Anexo I).

La presencia de barreras geográficas han moldeado las poblaciones ocasionando la derivación de diferentes linajes en especies pelágicas mayores. Por lo que el aislamiento de estos dos linajes en especies ampliamente distribuidas ha sido atribuido a dos eventos vicariantes independientes, uno ocurrido por el surgimiento del Istmo de Panamá (Alvarado-Bremer *et al.*, 1998; Graves & McDowell, 2003; Viñas *et al.*, 2004) y el segundo durante la máxima glaciación del Pleistoceno, que creó una barrera al flujo génico entre las poblaciones del Atlántico y el Indo-Pacífico a través del Cabo de Buena Esperanza en Sudáfrica.

Existe controversia sobre la datación de cuando el Istmo de Panamá se cerró por última vez, algunos estudios sugerían que hace aproximadamente 2.5-3.5 millones de años (Ma), pero estudios más recientes indican un origen más temprano y complejo, aproximadamente hace 15Ma (Bacon *et al.*, 2015; Montes *et al.*, 2015). Este cierre significó uno de los más grandes episodios relacionados a la migración biológica tanto en masas continentales como entre masas de agua oceánica. El cierre total del Canal oceánico centroamericano hace aproximadamente 10Ma (Bacon *et al.*, 2015) propició el aislamiento de las poblaciones del Atlántico y el Pacífico, así como un cambio significativo en la fuerza y dirección de los vientos y la circulación oceánica (Cronin & Dowsett, 1996).



Por otra parte, debido a un descenso en la temperatura superficial del agua durante las glaciaciones que marcaron el Pleistoceno, la oportunidad de dispersión interoceánica a través de Sudáfrica, para la mayoría de peces pelágicos restringidos a aguas cálidas, se vio limitada (Alvarado-Bremer *et al.*, 1998; Graves & McDowell, 2003). Lo anterior resultó en la acumulación de diferencias en las frecuencias de los haplotipos entre el Atlántico y el Indo-Pacífico. No obstante, durante los períodos inter-glaciales, el contacto entre las cuencas se hizo posible dando lugar a la reanudación del flujo genético a través del Cabo de Buena Esperanza en Sudáfrica, propiciando la presencia de haplotipos del Indo-Pacífico en el Atlántico (Díaz-Jaimes *et al.*, 2010), facilitado por la corriente de aguas cálidas de Agulhas (Durand *et al.*, 2005; Gonzalez *et al.*, 2008) la cual nace en el Índico y se dirige hacia el sureste del Atlántico.

Con respecto al dorado, se realizó un estudio de la filogeografía global de la especie en el análisis del gen mitocondrial ND2 (Díaz-Jaimes *et al.*, 2010). En éste no fue posible confirmar la presencia de dos linajes mitocondriales como en la mayoría de especies pelágicas de distribución cosmopolita (Anexo I), sino por el contrario se encontró un solo linaje mitocondrial distribuido ampliamente tanto en el Atlántico como en el Indo-Pacífico. Un patrón parecido ha sido detectado en otras especies como el atún aleta amarilla *Thunnus albacares* y el atún bonito *Katsuwonis pelamis* (Ely *et al.*, 2005), ambas especies con características biológicas y distribución similar al dorado. Las hipótesis para explicar la ausencia de divergencia entre cuencas oceánicas están relacionadas con la alta capacidad de dispersión y la ausencia de áreas de desove específicas, características que promueven el flujo genético, así como por el gran tamaño efectivo poblacional que caracterizan estas especies, y que limita los efectos de la deriva genética y complica la detección de una señal de heterogeneidad, incluso cuando hay poblaciones independientes (Graves, 1998; Chow & Takeyama, 2000; Ely *et al.*, 2005; Díaz-Jaimes *et al.*, 2010).

Sin embargo, se debe ser cauteloso en las interpretaciones generadas cuando no se encuentra divergencia poblacional (Avice, 1983). Ya que la ausencia de divergencia puede ser el resultado de dos procesos diferentes. El primero se refiere a flujo genético histórico entre las poblaciones, el cual, en este caso pudo haber sido facilitado por los períodos interglaciales. Y el segundo se refiere a variación por ancestría compartida (también llamado polimorfismo ancestral), el cual define como las diferentes poblaciones comparten una sustancial cantidad de variación ancestral, ya sea por una divergencia reciente y/o una baja tasa de evolución molecular del gen en estudio.



Debido a las características del ADN mitocondrial como su herencia materna y variadas tasas mutacionales, su uso resulta adecuado para la inferencia de eventos históricos de las poblaciones (Awise, 1987). No obstante, dada la necesidad de evaluar aspectos contemporáneos de las mismas tales como: la estructura genética, el flujo génico y los tamaños efectivos poblacionales, es conveniente el uso de marcadores con tasas de evolución mayores, como aquellos nucleares denominados microsatélites.

Los microsatélites son secuencias de ADN repetidas en tándem, altamente variables de herencia codominante, que han sido en el marcador por excelencia para variedad de aplicaciones en conservación y genética poblacional (Goldstein & Schlöterer, 1999), y que proveen mayor resolución en la detección de señales de diferenciación. Para realizar un análisis consensado y robusto que permita evidenciar los actuales patrones genéticos poblacionales que presentan las especies, es necesario tener una muestra representativa a analizar en términos de distribución de la especie y de número de individuos (N); además de contar con un número significativo de *loci* para evitar errores de interpretación.

Una administración adecuada en especies sujetas a explotación requiere evaluar la estructura genética de las mismas a lo largo y ancho de su rango de distribución, con la finalidad de determinar parámetros genético-poblacionales contemporáneos como la estimación de la magnitud y dirección del flujo genético y los tamaños efectivos poblacionales, parámetros que son la base para la definición de unidades de manejo y conservación pesquera (*stocks*) y que a su vez, permitan inferir qué mecanismos evolutivos han actuado sobre las poblaciones en su rango de distribución.

La presente propuesta de investigación, representa el primer estudio que hace uso de marcadores moleculares nucleares con altas tasas de cambio en una de aquellas especies de peces marinos que no presentan patrones divergentes mediante el análisis global con ADN mitocondrial como lo es el dorado (*Coryphaena hippurus*), y que pretende resolver preguntas sobre los patrones y la arquitectura genética de la especie en la extensión de su rango de distribución, es decir en un contexto global. Así como poder discernir el número de poblaciones presentes, la magnitud y dirección de flujo génico entre éstas, así como los tamaños efectivos poblacionales.



## IV. Antecedentes

### 4.1 Aspectos biológicos

El dorado, *Coryphaena hippurus*, Linneus 1758, es una especie epipelágica de distribución circumtropical, en mares tropicales y sub-tropicales dentro de la franja de los 47° N y 38° S, 180° W y 180° E. Aunque aproximadamente el 66% del tiempo permanece entre los 0-10 m de profundidad, registra movimientos verticales diarios con inmersiones por debajo de la termoclina durante períodos de tiempo muy cortos (Furukawa *et al.*, 2011; Merten *et al.*, 2014). Se encuentra restringido a aguas cálidas mayores a los 20° C (Gibbs & Collette, 1959) y en salinidades iguales o mayores a 33‰ (Oxenford, 1999). Pueden alcanzar tamaños de hasta dos metros de longitud total y se ha registrado un peso de hasta 39.46kg en competencias de pesca deportiva en el Pacífico Costarricense en 1976 (IGFA 2014). Exhiben altas tasas de crecimiento (1.43 a 4.71 mm/día), madurez temprana (se alcanza durante el primer año de vida), con desoves parciales a lo largo del año. La longevidad del dorado es de 3 a 4 años (Massutí *et al.*, 1999) y presenta una dieta variada alimentándose principalmente de peces, cefalópodos y crustáceos (Oxenford & Hunte, 1999). Presenta un notorio dimorfismo sexual, la cabeza del macho exhibe una cresta bien desarrollada mientras que la cabeza de la hembra es redondeada (Lasso & Zapata, 1999).

El dorado presenta una alta capacidad migratoria, de la cual algunos autores estiman movimientos latitudinales de más de 1900 km con velocidades de hasta 40km/día que pueden estar asociados al movimiento de objetos a la deriva o una migración pre-desove principalmente de las hembras. Sin embargo, al parecer la especie presenta cierta preferencia y/o fidelidad a sitios de agregación y/o alimentación ya que en estudios de marcado el mayor porcentaje de las recapturas se ha realizado en el punto donde fueron liberados, incluso después de 360 días de su marcaje (Gibbs & Collette, 1959; Beardsley, 1967; Palko *et al.*, 1982; Kingsford & Defries, 1999; Farrell, 2013; Merten *et al.*, 2014a, Merten *et al.*, 2014b).

En términos generales, el dorado es una especie de corta vida ( $\leq 4$  años), de abundancia estacional, rápido crecimiento, que tiende a acercarse a aguas costeras, posiblemente presenta migraciones asociadas a la reproducción y un grado considerable de fidelidad. Todas estas características hacen que la especie pueda presentar una estructura en *stocks* compleja; por ejemplo, un gran número de pequeños *stocks* con circuitos de migración localizados como ha sido propuesto para otros peces pelágicos como el pez espada o algunos atunes, e incluso para



la especie en el Atlántico Oeste (Oxenford, 1999). Por otra parte, el estudio de parámetros de crecimiento y reproductivos ha llevado a varios autores a proponer la presencia de varias cohortes en la misma región geográfica dentro de cuencas oceánicas (Oxenford & Hunte, 1986; Alejo-Plata *et al.*, 2011).

#### 4.2 Aspectos Genéticos

Utilizando el valor-c obtenido para la especie por Hardie & Hebert (2004), el cual fue igual a 0.61 picogramos, podemos estimar que el tamaño del genoma de la especie es de aproximadamente 597Mb. En cuanto al arreglo cromosómico para el dorado, no fue sino hasta recientemente que se determinó el cariotipo para una hembra de la especie, encontrando un arreglo de  $2n = 48$  cromosomas. En la especie hermana, *C. equiselis*, las hembras presentan el mismo número de cromosomas, pero el cariotipo de los machos presentan  $2n = 47$  cromosomas, por lo que se determinó que el sistema de los cromosomas sexuales es múltiple ( $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ ) (Soares *et al.*, 2014).

A nivel regional, algunos análisis genético-poblacionales se han adelantado para la especie, haciendo uso de variedad de marcadores moleculares. Algunos de éstos han concluido homogeneidad genética espacial y/o temporal dentro de las cuencas oceánicas (Rosenblatt & Waples, 1986; Avise & Hamrick, 1996; Pla & Pujolar, 1999; Sánchez-Izquierdo, 2009; Tripp *et al.*, 2010; Díaz-Jaimes *et al.*, 2010).

La ausencia de estructura genética regional se ha atribuido, en primera instancia, a niveles altos de flujo genético favorecido por la homogeneidad del ambiente marino y la alta capacidad reproductiva y de dispersión, ya sea por deriva larvaria y/o migración de adultos que presenta la especie (Graves, 1998). Lo anterior, combinado con otros factores como un tamaño efectivo poblacional significativo asociado con una alta diversidad genética, la cual es identificada como un factor primordial responsable de los niveles bajos de divergencia detectados en especies tropicales de distribución cosmopolita, debido a que la acción de fuerzas aleatorias como la deriva genética resulta insignificante para una eficiente acumulación de diferencias entre poblaciones (Ely *et al.*, 2005; Díaz-Jaimes *et al.*, 2010).

Por otro lado, otros estudios han hallado señales de divergencia poblacional dentro de las cuencas oceánicas, dichas diferencias pueden ser producto de patrones de movilidad limitada, es decir, movimientos restringidos y fidelidad a ciertas localidades por parte de los



individuos, factor ecológico y etológicos que promueve la divergencia entre poblaciones espacialmente separadas (Oxenford & Hunte, 1986; Rocha-Olivares *et al.*, 2006; Cruz, 2009; Bayona-Vásquez, 2011; Caetano-Nunes *et al.*, 2012; Chang *et al.*, 2013).

A nivel global, se han resaltado las diferencias encontradas entre las poblaciones del Mar Mediterráneo con respecto al Atlántico (Cimmaruta *et al.*, 1998; Díaz-Jaimes *et al.*, 2010). Las diferencias conspicuas detectadas en el Mar Mediterráneo son atribuidas a procesos de vicarianza y reducción demográfica explicada por una sucesión de fluctuaciones climáticas en períodos glaciales e interglaciales que ocasionaron una disminución del nivel del mar, y lo cual significó una separación de las poblaciones del Atlántico Este y el Mar Mediterráneo.

Sin embargo, una conclusión recurrente en los trabajos genéticos de la especie es la necesidad de utilizar más y diversos marcadores moleculares para una adecuada definición de unidades poblacionales. De esta forma, la obtención de estimaciones del tamaño efectivo poblacional así como del flujo genético, resulta imprescindible para determinar la influencia de fuerzas evolutivas en la estructura de las poblaciones.

#### 4.3 Aspectos Pesqueros

El dorado forma parte importante de la captura por pesca deportiva y también son activamente explotados comercialmente por su carne, altamente valorada para consumo humano. Del 2003 al 2012, las capturas mundiales para la especie, de acuerdo a la FAO (2014), han incrementado de 85.700 toneladas (t) a 115.010 t, son explotados principalmente por pesca artesanal y las capturas en el Pacífico Oriental, han alcanzado hasta las 25.000 t (Lasso & Zapata, 1999). Aunque se han observado declives en las capturas el Pacífico Oriental, particularmente en Costa Rica y Ecuador. La especie se captura con diversos tipos de artes de pesca, incluidos palangres, redes de cerco y caña y carrete (Palko *et al.*, 1982).

El porcentaje de poblaciones explotadas en sus límites máximos sostenibles o cerca de ellos varía mucho según las áreas. Las principales áreas de pesca con mayores proporciones (69-77%) de poblaciones plenamente explotadas son las del Atlántico centro-oeste, el Atlántico centro-este, el Atlántico noroeste, el océano Indico oeste y el Pacífico noroeste, mientras que las áreas con mayores proporciones (46-60%) de poblaciones sobreexplotadas, agotada y en recuperación son las del Atlántico sudeste, Pacífico sudeste, Atlántico nordeste y las de altamar (FAO, 2007).



Peralta (2006), resalta la importancia del conocimiento de los aspectos poblacionales del dorado en relación a las actuales tendencias en el mercado internacional en cuanto a exportaciones, expresado principalmente por la llamada eco certificación para el consumo humano de los productos pesqueros y dentro del cual se encuentra involucrada esta especie. En 2006, el Mecanismo Pesquero Regional del Caribe (CRFM, por sus siglas en inglés), reconoció la incertidumbre sobre la estructura poblacional y los *stocks* pesqueros para la especie y enfatizó en la necesidad de generar datos para el recurso.

En México, la NOM-017-PESCA-1994 reserva la captura de dorado al uso exclusivo de la pesca deportiva dentro de 50 millas náuticas, situación que ha generado que la pesca comercial por parte de flotas artesanales sea clandestina. La Carta Nacional Pesquera (CNP, 2010) considera a ésta especie como un recurso con potencial de desarrollo, capaz de soportar una pesquería comercial por cooperativas de pescadores artesanales en la zona costera. Aunque se han llevado a cabo diversos estudios con la finalidad de tener bases científicas que permitan la liberación a la pesca comercial del dorado, el conflicto hasta la fecha continua debido a que para poder establecer un plan de manejo se requiere determinar, entre otras cosas, las características del o los *stocks*, así como el patrón migratorio tanto dentro de agusa mexicana como de manera general en su rango de distribución.



## V. Hipótesis

Ho:

La existencia de un solo linaje de ADN mitocondrial (ADNmt) ampliamente distribuido en poblaciones de las principales cuencas oceánicas del dorado es resultado de flujo génico a través de Sudáfrica ocurrido durante periodos interglaciales. Por tanto, es posible que las frecuencias genéticas en el ADN nuclear también sean homogéneas a lo largo del rango de distribución de la especie.

Ha:

Debido a que los microsatélites permiten el estudio de la estructura genética desde un marco evolutivo contemporáneo, es posible detectar el patrón de estructuración genética global observado en otras especies de hábitos y distribución similar a la del dorado, consistente de divergencia entre poblaciones del Indo-Pacífico y el Atlántico.





## VI. Objetivos

### 6.1 *Objetivos Generales*

Estimar la divergencia genética y el grado de flujo genético entre poblaciones de *C. hippurus*, de las cuencas del Atlántico, Índico, Pacífico y Mediterráneo, de forma que sea evaluada la existencia de poblaciones discretas en su ámbito de distribución, así como los factores que han determinado la arquitectura genética de las poblaciones de la especie.

### 6.2 *Objetivos Específicos*

- Caracterizar la diversidad genética nuclear de *C. hippurus* en las diferentes cuencas oceánicas donde se distribuye.
- Determinar si existe estructura genética inter y/o intra-oceánica, a través de la estimación de índices de divergencia, así como mediante el uso de estadística bayesiana.
- Obtener estimaciones de flujo génico entre cuencas oceánicas y entre regiones dentro de cada una de éstas.
- Estimar el tamaño efectivo poblacional de cada una de las unidades poblacionales o *stocks* identificados.



## VII. Materiales y Métodos

### 7.1 Área de Estudio

Las muestras de tejido para la especie provinieron de diferentes localidades dentro de las cuencas oceánicas en las cuales ésta se distribuye: el Océano Pacífico, el Océano Atlántico y el Océano Índico, además del Mar Mediterráneo (Ver Figura 1).

Dentro de la cuenca del Pacífico las muestras son procedentes de latitudes del norte correspondientes a las localidades de Japón (JP), Hawái (HW), Oceánicas (localidad ubicada dentro de la Zona Económica Exclusiva de México) (OC) y México (MX) (Fig. 2); del sur del Pacífico en Perú (PE), Ecuador (EC), Nueva Caledonia (NC) y Tahití (TI).

En la cuenca del Océano Índico se cuenta con muestras de Tailandia (TA) e Isla Seychelles (SE). Una muestra interoceánica del Cabo de Buena Esperanza en Sudáfrica (SA).

Y en la cuenca del Atlántico las muestras del dorado provienen del lado occidental del Atlántico Norte (EU), Atlántico Florida (FL), Golfo de México (GM), Caribe (CA) y Colombia (COL); y del lado oriental de Senegal (DK) y Túnez (TZ) (ésta última ubicada dentro del Mar Mediterráneo).



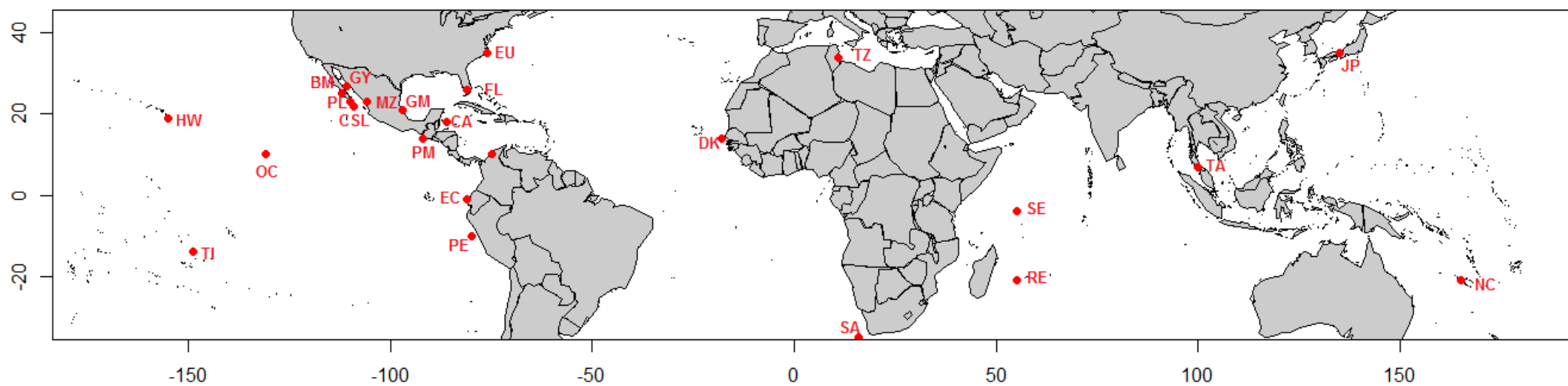
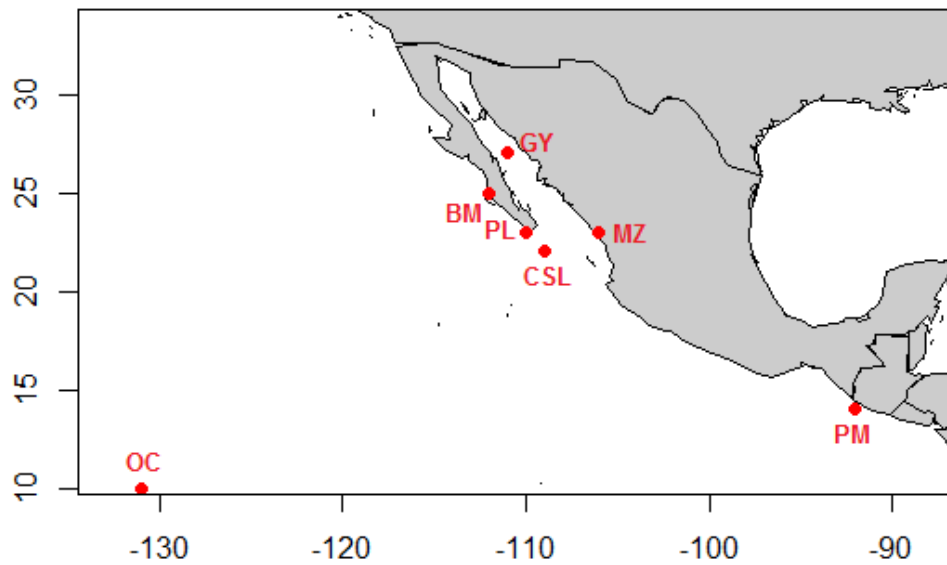


Figura 1. Mapa de las localidades de colecta de *C. hippurus* a lo largo del rango de distribución.



Debido a que existe un esfuerzo de muestreo considerable en el Pacífico mexicano (MX), cada localidad dentro de esta región será considerada independientemente. Estas localidades son: Bahía Magdalena (BM), Punta Lobos (PL), Cabo San Lucas (CSL), Guaymas (GY), Mazatlán (MZ) y Puerto Madero (PM), zona económica exclusiva (OC) (Fig. 2)



**Fig. 2.** Mapa de ubicación de los sitios de colecta de muestras de dorado (*C. hippurus*) en la costa del Pacífico mexicano.



## 7.2 Colecta de Muestras

Las muestras fueron obtenidas principalmente del desembarque de especímenes por parte de las pesquerías comerciales, artesanales y deportivas. Éstas fueron preservadas en etanol al 70% o solución buffer DMSO, para su posterior procesamiento y análisis.

Éstas se han colectado en colaboración con otros grupos de investigación, destacando el apoyo de Dr. Jean D. Durand del Institut de Recherche pour le Développement, Station Méditerranéenne de l'Environnement Littoral, Francia; Daniel Saúl Ore del Centro de Genética y Biología Molecular de la Universidad de San Martín de Porras en Perú; la Dra. Sofía Ortega de CICIMAR, México; Dr. Felipe Galván de CICIMAR, México; el Dr. David Itano de la Universidad de Hawái; del Dr. Douglas Adams del Florida Fish & Wildlife Conservation Commission Fish & Wildlife Research Institute, USA y la Dra. Elena González del Museo Nacional de Ciencias Naturales de España; además a las biólogas Andrea Ramírez y Paola Palacios en Colombia.

El ADN de cada individuo se encuentra almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  e inventariado en el Laboratorio de Genética de Organismos Acuáticos del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

## 7.3 Extracción de ADN genómico

El ADN genómico total se aisló por el método propuesto por Laird *et al.* (1991) que consiste en incubar un trozo de tejido en 500  $\mu\text{L}$  de buffer de Lisis (100mM Tris-HCl pH 8.5, 50 mM EDTA, 2% SDS y 20 mM NaCl) conteniendo 15  $\mu\text{L}$  de proteinasa K durante 3-4 hrs a  $55^{\circ}\text{C}$  y su posterior precipitación con isopropanol, limpieza con etanol y rehidratación en 50-100  $\mu\text{L}$  de buffer TE. Por otro lado, algunas muestras fueron procesadas con ayuda del Kit de extracción de ADN de Wizard Genomics de Promega® siguiendo el protocolo de extracción a partir de cola de ratón.



## 7.4 Aislamiento de loci microsatélites

### 7.4.1 Mediante bibliotecas genómicas enriquecidas

Para el aislamiento de *loci* microsatélites se siguió el protocolo de Glenn & Schable (2005) con algunas modificaciones. Esta metodología consiste en una serie de técnicas optimizadas para construir bibliotecas altamente enriquecidas para *loci* microsatelitales. Para el paso de digestión con enzimas de restricción se utilizó la enzima Rsa I que reconoce el sitio de corte GT-AC. Se usaron sondas biotiniladas con motivos de repetición (CT)<sub>15</sub> y (GT)<sub>12</sub> para el enriquecimiento. En la etapa de clonación y transformación se emplearon los kits TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing y células electrocompetentes DH5α.

Se realizaron pruebas para determinar el tamaño de los fragmentos mediante PCR con *primers* M13 (-20) (5' GTA AAA CGA CGG CCA G 3') y verificación en gel de agarosa, además de procedimiento para descubrir microsatélites en clonas reportado por Wang *et al.* (2007) el cual consiste en realizar un PCR usando como *primers* las secuencias de los vectores, pero además un oligo del motivo de repetición n veces, el cuál ocasionara en la reacción que para aquellas clonas que traen el inserto el producto de amplificación sea un barrido de amplicones de diferentes tamaños y se pueda distinguir de aquellos insertos que no contienen el micro satélite y que presentarán una banda única como producto de amplificación.

Algunas de las clonas positivas resultantes se secuenciaron con el fin de encontrar motivos de repetición con regiones flanqueantes, que permitan un adecuado diseño de secuencias *primer* para su posterior síntesis.

### 7.4.2 Mediante tecnologías de secuenciación de nueva generación

Adicionalmente a la metodología mencionada anteriormente, se utilizaron tecnologías de Secuenciación de Nueva Generación (NGS, por sus siglas en inglés) con el fin de acceder a motivos de repetición no sólo dinucleotídicos, sino también tri-, tetra-, etc. Para llevar a cabo el experimento se extrajo ADN de alta calidad mediante el método con sales publicado por Aijanabi & Martinez (1997). Ésta muestra fue enviada a la Universidad de Georgia y procesada en el laboratorio del Dr. Travis Glenn, en donde se siguió un protocolo general de



fragmentación de ADN por sonicación usando COVARIS® y ligación de adaptadores Illumina® a los fragmentos.

Las librerías se corrieron en una fracción de línea de Illumina Hi-Seq (extremos pareados-100 nucleótidos). Los archivos fastq resultantes fueron filtrados dependiendo de la calidad de las secuencias y analizados para la identificación de microsatélites y diseño de primers utilizando el programa MSATCOMMANDER (Faircloth, 2008).

Se buscaron con especial énfasis microsatélites con motivos tetranucleotídicos, teniendo en cuenta esto, y a partir de los archivos de salida del software, se utilizó un filtro que calcula el número de veces que se observa la secuencia *primer* (tanto de ida como de regreso) en las lecturas totales obtenidas, y se seleccionó aquellos *primers* que no presentaran duplicados o múltiples coincidencias, con el fin de evitar amplificaciones inespecíficas.

### 7.5 Primers y amplificación por PCR

Además del uso de los *primers* aislados por la técnica de clonación, se analizaron cinco *primers* previamente diseñados por el grupo de investigación del Dr. Robert Chapman partiendo de la información de secuencias de los clones que contienen microsatélites publicada por Elby *et al.* (2002) en GenBank (códigos de acceso: AY189832, AY135028, AY135027, AY135026 y AY135025).

Para los *primers* desarrollados por Chapman y colaboradores, se realizó una estandarización del protocolo de amplificación partiendo de las temperaturas de alineamiento calculadas para cada par de *primers* por medio de la reacción en cadena de la enzima polimerasa (PCR). Las reacciones se llevaron a cabo en un PX2 Thermal Cycler Thermo Electro Corporation de 96 pozos o en Axygen® MaxyGene™ Thermal Cycler, también de 96 pozos. Las reacciones fueron a un volumen final de 10µl que contenían de 10-100 ng de DNA, 1Xde buffer de reacción, de 1.5 a 3mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.8mM de mezcla de DNTP's, 0.25 -1 pmol/µl de cada uno de los *primers* (-F y -R) y 0.025-0.05 U de TaqPlatinum® Polymerase, al *primer* -F se le adicionó en el extremo 5' un fluoroforo (color: PET rojo, VIC verde, NED amarillo ó 5-FAM azul) marcado para el posterior reconocimiento en el análisis de fragmentos por electroforesis capilar. Las condiciones de los ciclos fueron: 95° C por cinco minutos seguido de 35 ciclos de 95° C durante 1 minuto, temperatura de alineamiento (la cual varía entre *loci*) por 1



minuto, y temperatura de desnaturalización, 72°C por un minuto, con una extensión final a 72° C por 10 minutos.

Para el set de *primers* aislados en el presente proyecto, y durante el proceso de estandarización de la amplificación de los mismos y pruebas de polimorfismo, se utilizaron dos protocolos de amplificación que tienen en común la adición en el extremo 5' del *primer* - F una cola de secuencia universal M13 (5'GTAAAACGACGGCCAGT3'). Ésta secuencia M13 es reconocida por un tercer primer con la misma secuencia el cual lleva el fluoróforo correspondiente (6-FAM, VIC, NED o PET), las condiciones de amplificación se realizaron según el protocolo de Boutin-Ganache, *et al.* (2001). La diferencia entre éstos dos protocolos es que para cierto set de *primers* se utilizó el kit Dream Taq DNA Polimerasa de Thermo Scientific® guardando las concentraciones anteriormente descritas y las condiciones de amplificación: 95°C por 5 minutos, 25 ciclos a 94°C por 30 segundos, una primera temperatura de alineamiento de 56°C por 45 segundos, y una extensión a 72°C por 45 segundos, seguido por 8 ciclos donde la temperatura de alineamiento cambia a 50°C, finalmente una extensión por 10 minutos a 72°C. Mientras que el otro protocolo y para otro set de *primers* se utilizó el kit Type-it Microsatellite PCR Kit de Qiagen® a un volumen final de 5µl y utilizando las concentraciones y condiciones de amplificación indicadas por los fabricantes con una pequeña modificación de las temperaturas de alineamiento, cuyas condiciones son: fueron: 95°C por 5 minutos, 35 ciclos a 95°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto, y una extensión a 72°C por 1 minuto, y extensión final por 10 minutos a 72°C.

Posteriormente se realizó una separación y visualización de los productos amplificados en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 6% con tinción de nitrato de plata para determinar rangos alélicos.

### 7.6 Genotipificación

Una vez superado el proceso de estandarización e identificados los rangos alélicos, se utilizaron paneles múltiples de microsatélites, es decir, una combinación de los productos de la reacción de PCR para diferentes *loci*, los cuales fueron corridos en una sola línea de electroforesis capilar (multiplex PCR). Se realizaron las mezclas pertinentes para hacer eficientes los tiempos y recursos, teniendo en cuenta la superposición o cercanía de rangos





alélicos de los *loci* y a los cuales se les adicionó un estándar de tamaño Liz500. Lo anterior usando el protocolo anteriormente descrito con el kit Type-it Microsatellite PCR Kit de Qiagen®.

La electroforesis para la visualización, genotipificación y análisis de las bandas se realizó en el secuenciador automático 3100 Avant ABI Prism<sup>MR</sup> con el apoyo del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología de la UNAM, México D.F y la Facilidad de Secuenciación de ADN de la Universidad de Illinois. El análisis de los fluorogramas se hizo mediante los software PeakScanner v. 1.0 y GeneMapper 5.0, ambos de Applied Biosystems®. El uso de estos programas permitió definir el tamaño alélico y condición genética (homocigotos o heterocigotos) y tamaños alélicos para cada una de las muestras para cada uno de los *locus*.

## 7.7 *Análisis de datos*

### 7.7.1 Análisis de diversidad genética

Para cada *locus* y localidad se realizó un conteo directo de alelos, para estimar el número promedio de alelos, la riqueza alélica, frecuencias alélicas y heterocigosidades observadas y esperadas, mediante el software GenALEX v. 6.4 (Peakall & Smouse, 2006). Con el fin de determinar el poder de discriminación entre individuos únicos dado una muestra aleatoria de  $n$  loci, se realizó una curva de acumulación de genotipos con ayuda del paquete poppr (Kamvar *et al.*, 2014), en R 3.1.2. Para permitir hacer comparaciones entre localidades con tamaños de muestra desiguales se hizo un análisis de rarefacción con la ayuda del software HP-Rare 1.1 (Kalinowski, 2005) que nos permite calcular la riqueza alélica asumiendo que todas las poblaciones presentan un tamaño muestral ponderado igual al tamaño de muestra más pequeño tanto por cuencas oceánicas como para las localidades.

### 7.7.2 Prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio por ligamiento

Una vez determinado el número de alelos, se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas, y se obtuvieron los valores de heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y heterocigosidad esperada ( $H_e$ ). A partir de éstas se realizaron pruebas exactas para evaluar la hipótesis de equilibrio de Hardy-Weinberg, empleando el software Arlequín versión 3.5 (Excoffier *et al.*, 2005) y la



función `HWE.test` del paquete `adegenet` 1.4-2 (Jombart, 2008) implementado en el software estadístico R 3.1.2 (R Development Core Team, 2008).

`HWE.test` utiliza otra función llamada `diseq`, para un marcador la función calcula los coeficientes de correlación  $D$  (diferencia en las frecuencias entre heterocigotos observados y heterocigotos esperados),  $D'$  (re escalamiento de  $D$ ) y  $r$  (coeficiente de correlación entre los alelos, calculados a partir de  $D'$ ) para cada par de alelos, adicionalmente de un valor para cada medida para todos los alelos, además del cálculo del intervalo de confianza de la prueba de *bootstrap* para éstos estimados. Por lo que para cada par alélico:

$D$  se define como un medio de la diferencia entre las frecuencias del número observado y esperado de heterocigotos

$$D = \frac{1}{2}(p_{ij} + p_{ji}) - p_{ij}$$

$D'$  re-escala  $D$  para abarcar el rango  $[-1,1]$

$$D' = \frac{D}{D_{max}}$$

donde, si  $D > 0$ :

$$D_{max} = \min p_i p_j, p_j p_i = p_i p_j$$

o si  $D < 0$ :

$$D_{max} = \min p_i(1 - p_j), p_j = 1 - p_i$$

$r$  es el coeficiente de relación entre los dos alelos:

$$r = \frac{-D}{\sqrt{(p_i * (1 - p_i) p_j (1 - p_j))}}$$

Donde

$p_i$  se define como la probabilidad observada del alelo  $i$

$p_j$  se define como la probabilidad observada del alelo  $j$ , y



$p_{ij}$  se define como la probabilidad observada del par  $ij$ .

Cuando hay más de dos alelos, los valores de estos estadísticos se obtienen por el cálculo de una media ponderada del valor absoluto de cada par de alelos, donde se determina el peso por la frecuencia esperada:

$$D_{total} = \sum_{i \neq j} |D_{ij}| * p_{ij}$$

Finalmente utiliza la función `chisq.test` para calcular el valor  $p$  de la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg usando un método de remuestreo por permutación. Se determinó si los entrecruzamientos ocurren al azar.

Adicionalmente se calculó la probabilidad de presencia de alelos nulos, de dominancia de alelos pequeños (por errores de amplificación de alelos de mayor tamaño), así mismo de errores ocasionados por bandas fantasmas (errores debidos al resbalón de la polimerasa en el proceso de PCR) con el programa GenePop v 4.0 (Raymond & Rousset, 1995). Además, se realizó un mapa de calor de los valores de significancia de HWE  $3\theta$  (Sarkar, 2008) del software estadístico R 3.1.2 (R Development Core Team, 2008).

La segregación independiente de los *loci* fue corroborada mediante la función LD implementada en el paquete `poppr` 1.1.4 (Kamvar *et al.*, 2014) y `genetics` 1.3.8.1 (Warnes, 2003) del software estadístico R 3.1.2 (R Development Core Team, 2008). La cual calcula el índice de asociación  $I_A$  (Brown *et al.*, 1980; Agapow & Burt, 2001), el cual se define:

$$I_A = \left( \frac{V_o}{V_e} \right) - 1$$

Donde

$V_o$  es la varianza observada de las distancias entre pares

$V_e$  es la varianza esperada en ausencia de desequilibrio por ligamiento

Agapow & Burt (2001) demostraron que  $I_A$  incrementa constantemente con el número de *loci*, por lo que desarrollaron el índice  $\hat{r}_d$ , éste se refiere a un coeficiente de estandarización de covarianzas que resulta independiente del número de *loci*, el cual compara covarianzas



asociadas a la varianza observada en la distancia entre pares por *locus* y la varianza esperada en ausencia de desequilibrio por ligamiento:

$$\bar{r}_d = \frac{\sum \sum cov_{j,k}}{\sum \sum \sqrt{var_j * var_k}}$$

Donde  $var_j$  y  $var_k$  son las varianzas de la distancia entre pares para el *locus*  $j$  y  $k$ , respectivamente.

### 7.7.3 Análisis de estructura poblacional

Con el fin de estimar la diferenciación genética se usaron dos aproximaciones. La primera, mediante la estimación de los estadísticos F de Wright,  $F_{ST}$  (Weir & Cockerham, 1984), los cuales miden la varianza de las frecuencias alélicas entre poblaciones como la probabilidad de que dos pares de alelos tomados al azar sean iguales por estado de las subpoblaciones con respecto a la población total ( $F_{ST}$ ), bajo consideraciones y supuestos tales como, un modelo mutacional de sitios infinitos y tamaños de muestra desiguales. Sin embargo, como ha sido señalado por varios autores (Hedrick, 2005; Jost, 2008), éste estadístico no alcanza un valor de 1.0 en un sistema con más de dos alelos, incluso cuando no hay alelos compartidos entre poblaciones, debido a que siempre existirá un grado de heterocigosidad dentro de las poblaciones. Y dado a que el presente proyecto analiza marcadores microsatelitales, con un gran número de alelos, el uso de éstos estadísticos puede llevar a ciertos sesgos. Es por lo anterior, que en el presente estudio también se incorpora el estadístico introducido por Jost (2008),  $D'_{Jost}$ , el cual mide la fracción de la variación alélica entre poblaciones, pero puede alcanzar un valor de 1 en los casos de completa diferenciación e incluso con altos valores de variación dentro de las poblaciones, y particularmente útil cuando los marcadores tienen altas tasas de mutación, como es el caso de los microsatélites.

Los valores de  $F_{ST}$  fueron corregidos por la presencia de alelos nulos con ayuda del software FreeNa (Chapuis & Estoup, 2007), el cual estima la frecuencia de alelos nulos para cada *locus* y población usando el algoritmo de Maximización de la Esperanza (EM, por sus siglas en inglés) (Dempster *et al.*, 1977) y hace una re estimación de los valores de  $F_{ST}$  teniendo en cuenta tan solo los tamaños alélicos visibles y las frecuencias de alelos nulos. Los valores de significancia se obtuvieron a partir de los límites inferiores y superiores de los intervalos de confianza de las distribuciones de los valores de  $F_{ST}$  de las pruebas de *bootstrap*. A partir de los valores de  $F_{ST}$  sin corrección y corregidos para cada *locus*, se realizó una prueba no



paramétrica de Wilcoxon ( $w$ ) para evaluar la diferencia entre los valores. Para los valores obtenidos sin y con corrección para las comparaciones por pares se realizó una prueba de congruencia entre matrices de distancia utilizando las funciones `CADM.global` del paquete `ape 3.2` (Paradis *et al.*, 2004) en el software estadístico R 3.1.2 (R Development Core Team, 2008), los cuales calculan el coeficiente de concordancia  $W$  (Kendall & Babington-Smith, 1939) entre matrices a través de una prueba de permutaciones. Dicha prueba también se realizó con el fin de comparar los valores de las matrices de comparación entre localidades de los estadístico  $F_{ST}$  y  $D'_{Jost}$ . Así como una prueba de Wilcoxon para la comparación de los valores para cada *locus*.

Los estadísticos  $D'_{Jost}$  global, por *locus* y entre pares de localidades y cuencas oceánicas fueron calculados con ayuda de la función `fastDivPart` del paquete `diversity 1.9.73` (Keenan *et al.*, 2013) en el software R 3.1.2 (R Development Core Team, 2008). El cual también realiza las gráficas de comportamiento de dichos estadísticos de acuerdo al número de alelos.

Además, para graficar y visualizar las diferencias entre los genotipos de las diferentes localidades se hizo un análisis de correspondencia factorial mediante el software GENETIX 4.05 (Belkhir *et al.*, 2004).

Para inferir el número de poblaciones se utilizó el software STRUCTURE 2.1 (Pritchard *et al.*, 2000) el cual utiliza métodos bayesianos a partir de la información de los genotipos por medio de una distribución de probabilidades calculadas con cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC), calculando así el logaritmo de la probabilidad de un parámetro  $K$  (número de *clusters*) dado. Tanto para el análisis de cuencas como para el análisis de localidades se asumió un modelo de mezcla suponiendo que los individuos presentan una ancestría mezclada y frecuencias alélicas correlacionadas debido a procesos de migración. Se realizaron 6 réplicas para el cálculo de probabilidad de cada  $K$  (de  $K = 1$  hasta  $K = 5$ ), los parámetros utilizados fueron una longitud de *burning* de 100.000, seguido por una longitud de la corrida de 1.000.000 de pasos. A partir de la matriz  $Q$ , originada por STRUCTURE, y para el  $K$  más probable, se creó un mapa de mezcla con ayuda de las bibliotecas `maps 2.3-9` (Becker & Wilks, 1993) y `plotrix 3.5-11` (Lemon, 2006) en el software R 3.1.2 (R Development Core Team, 2008).

Para evaluar en donde están concentradas las diferencias encontradas, si dentro de las poblaciones, entre las poblaciones, o entre regiones (en este caso cuencas oceánicas), se



realizó una prueba de varianza molecular (AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992) en el software Arlequín versión 3.5 (Excoffier *et al.*, 2006). Adicionalmente, se diseñaron análisis AMOVAs para cada cuenca oceánica, en los cuales se hizo un agrupamiento de las localidades de cada margen continental, para evaluar diferencias Este-Oeste con ayuda de las funciones `poppr.amova` y `randtest` del paquete `poppr 1.1.4` (Kamvar *et al.*, 2014).

Para identificar áreas geográficas asociadas a discontinuidades genéticas se utilizó el software BARRIER v. 2 (Manni *et al.*, 2004) el cual implementa un algoritmo de Monmonier que identifica barreras asociadas a altas heterogeneidades genéticas en un mapa donde las muestras están representadas de acuerdo a sus coordenadas geográficas y conectadas por una triangulación Delaunay con límites asociados a las medidas de diferenciación genética ( $F_{ST}$  y  $D'Jost$ ).

Para ilustrar gráficamente las distancias genéticas entre cuencas oceánicas se utilizó el software TREEFIT (Kalinowski, 2009) que construye una matriz de distancias entre pares de estadísticos  $F_{ST}$  (Weir & Cockerham, 1984) y utiliza estos valores para construir un árbol evolutivo usando el método de agrupamiento UPGMA, en el cual la longitud de las ramas refleja la distancia genética entre sitios. El programa, además, genera un valor cuadrado de  $R$  que expresa estadísticamente la proporción de la variación en la matriz de distancias que es explicada por el árbol, es decir, qué tan bien la figura representa los datos. Un alto valor de  $R$  indica que el valor de  $F_{ST}$  calculado está bien ilustrado en el árbol. El árbol generado en TREEFIT fue graficado usando FIGTREE v. 1.4.2 (Rambaut, 2014)

Además, en los análisis dentro de cuencas oceánicas, se calcularon las redes de mínima expansión de la población usando la distancia de Bruvo (Bruvo *et al.*, 2004), la cual toma en cuenta un modelo mutacional paso a paso. Método implementado en el paquete `poppr 1.14` (Kamvar *et al.*, 2014), por medio de la función `bruvo.msn`.

#### 7.7.4 Análisis de aislamiento por distancia

Se puso a prueba la hipótesis que el modelo de diferenciación es del tipo de aislamiento por distancia entre las muestras, para esto el *test* o prueba de Mantel fue desarrollado utilizando el software IBD (Bohonak, 2002). En la cual se considera la correlación entre estimaciones de flujo genético entre pares de localidades (estadísticos  $F_{ST}$  corregidos por alelos nulos y estadístico  $D'Jost$ ) y las distancias geográficas en logaritmo de kilómetros, calculadas en una



o múltiples líneas rectas siguiendo la ruta oceánica (que no incluyan masas continentales) más lógica y corta entre los puntos.

#### 7.7.5 Estimación de tamaño efectivo poblacional y número de migrantes

Para la estimaciones de los tamaños efectivos recientes, se utilizó el software  $N_{EESTIMATOR}$  2.01 (Do *et al.*, 2014) el cual estima el número efectivo de individuos desovantes en una población genéticamente cerrada (bajo un modelo Wright-Fisher) usando genotipos diploides de una muestra de la población. Utiliza seis métodos en general, sin embargo, para cumplir el objeto del presente trabajo se utilizaron dos, el método de exceso de heterocigotos y el método de desequilibrio de ligamiento. El método de exceso de heterocigotos (Pudovkin *et al.*, 1996) mide el incremento en las proporciones observadas de heterocigotos por encima de la esperada en poblaciones bajo equilibrio de Hardy-Weinberg, como resultado de diferencias en las frecuencias alélicas entre sexos. Dado que una sola generación es suficiente para recuperar las proporciones en Hardy-Weinberg. El método de desequilibrio de ligamiento usado por Bartley (1992) mide la desviación de las frecuencias gaméticas con respecto a las esperadas en un sistema con apareamiento al azar, la cual depende de la asociación de los alelos de diferentes *loci*. Ambos métodos proveen un estimado del tamaño efectivo de los parentales que dieron progenie de la cual fue tomada la muestra, sin embargo se debe tener en cuenta que el método de desequilibrio de ligamiento está influenciado por efectos o cambios en tamaños poblacionales ocurridos en generaciones anteriores a la parental, es decir, por efectos históricos (Waples, 2005).

Para cada localidad se calculó el tamaño efectivo poblacional histórico a partir de los valores de theta, mediante el software MIGRATE 3.6.6 (Beerli, 2006). Éste considera la fórmula  $\theta = 4N_e\mu$ , donde  $N_e$  es el tamaño efectivo poblacional y  $\mu$  la tasa de mutación del marcador en evaluación. Adicionalmente, con el uso mismo software se obtuvo la tasa de migración a partir de las estimaciones de  $M$ , que es igual a  $m/\mu$ , donde  $m$  es la tasa de migración por generación. Los análisis se llevaron a cabo utilizando el método inferencia Bayesiana y considerando el modelo de evolución gradual para microsatélites. Las corridas consistieron en una longitud de *burning* de 10000 generaciones y una longitud *post burn-in* de 100000 generaciones y cada corrida consta de 1 cadena larga con un sistema de calentamiento de cuatro temperaturas de 1, 1.5, 3.0 y 1000000. Los valores de  $m$  calculados fueron graficados en círculo con ayuda de los paquetes *migest* 1.6 (Abel & Sander, 2014), *plyr* 1.8.1



(Wickham, 2011) y `circlize 0.2.4` (Gu *et al*, 2014) en el software R 3.1.2 (R Development Core Team, 2008).





## VIII. RESULTADOS

### *8.1 Extracción de ADN*

Todas las muestras de tejido almacenadas fueron exitosamente procesadas por el protocolo de extracción de ácidos nucleicos detallada en la sección de metodología, y aunque la cantidad y calidad del ADN es ampliamente variable entre las mismas, la mayoría resultaron exitosas en la posterior amplificación.

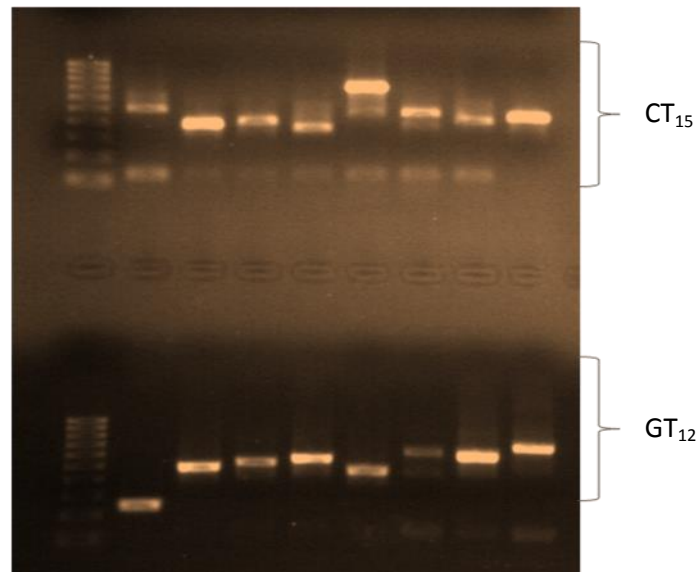
### *8.2 Aislamiento de loci microsatelitales*

#### *8.2.1 Mediante bibliotecas genómicas enriquecidas*

Para el desarrollo de este protocolo se realizó una estancia de investigación en el Laboratorio de Genética para la Conservación del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste-CIBNOR en la ciudad de La Paz, Baja California Sur, México; la cual fue dirigida por el Dr. Francisco García de León.

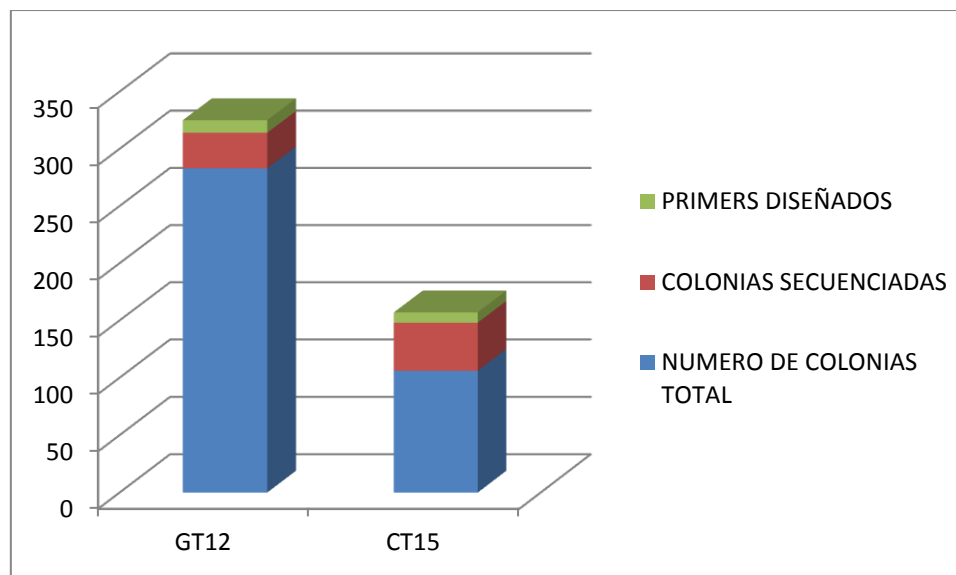
Allí, se siguió el procedimiento señalado en la sección metodológica, con dos sondas de repetición dinucleotídica (CT<sub>15</sub> y GT<sub>12</sub>) de las cuales se obtuvieron 121 colonias para el motivo CT<sub>15</sub> y 303 colonias con motivo GT<sub>12</sub> las cuales se verificó que tuviesen insertos de tamaño variable (Fig. 3). Las pruebas para descubrir microsatélites se realizaron en un total de 51 clonas con repetición CT<sub>15</sub> y 66 clonas con repetición GT<sub>12</sub>, de las cuales se secuenciaron 31 y 42, respectivamente (Fig. 4).





**Fig. 3.** Insertos de clonas obtenidas en la biblioteca genómica enriquecida con dos tipos de sondas: CT<sub>15</sub> (sonda 1) y GT<sub>12</sub> (sonda 2). Para este ensayo se seleccionaron ocho clonas al azar por cada sonda.

A partir de las clonas secuenciadas, se diseñaron 31 pares de *primers* en total, de éstos se seleccionaron siete pares para ser sintetizados (**Chy026, Chy051, Chy062, Chy063, Chy217, Chy235 y Chy237**) (Fig. 4) (Tabla 1).



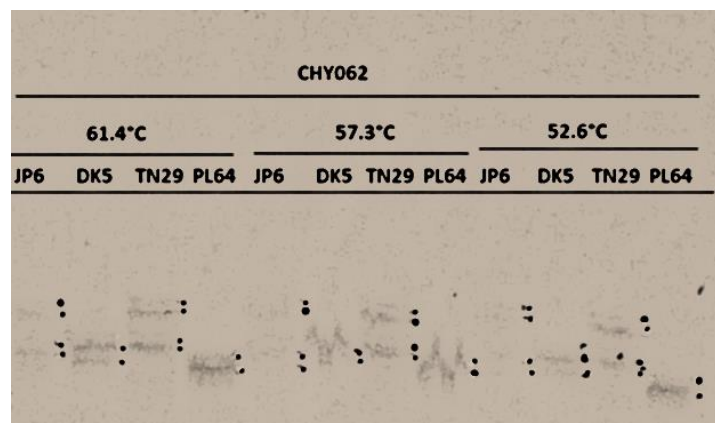
**Fig. 4.** Histograma del número de colonias obtenidas, secuenciadas y de las cuales se diseñaron *primers*, para cada sonda de repetición.



**Tabla 1.** *Loci* aislados a partir de la biblioteca enriquecida. pb: pares de bases.

<b>Locus</b>	<b>Motivo de repetición</b>	<b>Tamaño esperado (pb)</b>
<b>Chi026</b>	(GT) <sub>9</sub>	110
<b>Chi051</b>	(AG) <sub>15</sub>	280
<b>Chi062</b>	(GA) <sub>6</sub>	176
<b>Chi063</b>	(CA) <sub>22</sub>	218
<b>Chi217</b>	(GT) <sub>15</sub>	81
<b>Chi235</b>	(CA) <sub>10</sub>	250
<b>Chi237</b>	(CA) <sub>32</sub>	178

Los *loci* **Chi026**, **Chi063** y **Chi235** resultaron monomórficos. Los *loci* **Chi051**, **Chi217** y **Chi237** presentaron varios artefactos por lo que no fueron incluidos en el análisis. Por lo tanto, el único *locus* a incluir aislado mediante bibliotecas genómicas enriquecidas es el **Chi062** (Figura. 5)

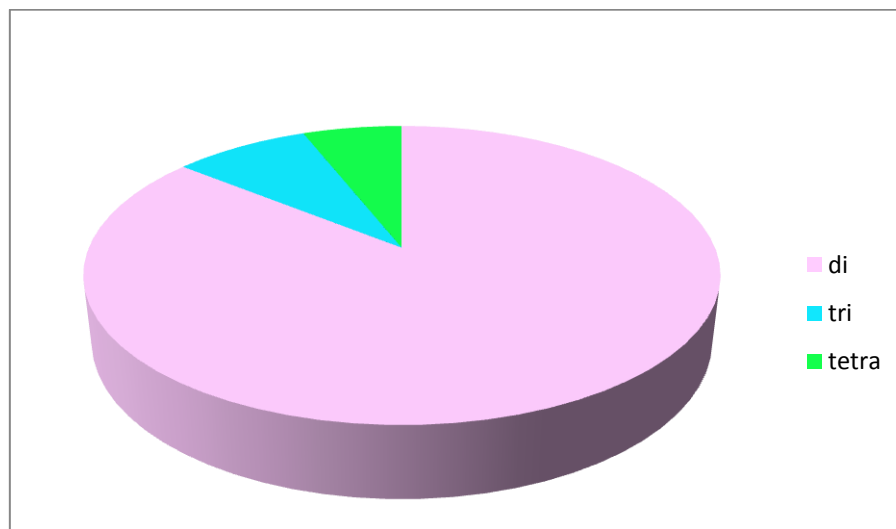


**Fig. 5.** Fotografía de gel de acrilamida-bisacrilamida al 6% en donde se observan los productos de amplificación del *locus* Chi062 a diferentes temperaturas de alineamiento, en muestras de diferentes poblaciones.



### 8.2.2 Mediante tecnologías de secuenciación de siguiente generación

Se obtuvieron un total de 14.320.628 lecturas de 100pb, de las cuales 179.767 (1.25%) contienen microsatélites. La distribución de los motivos de repetición se encuentra en la Fig. 6 y Tabla 2, resaltando que el motivo de repetición más común es AC (62.9%). Se obtuvieron 3521 *loci* tetranucleótidos de los cuales fue posible diseñar *primers*. De los cuales 265 pasaron el filtro de secuencias de *primer* únicas.



**Fig. 6.** Representación del total de microsatélites obtenidos y de los cuales fue posible diseñar *primers* de acuerdo a la longitud del monómero.



**Tabla 2.** Resumen de lecturas y microsatélites obtenidos mediante NGS.

Motivo	Totales	Con primers	Total bases
Total	191108	58528	5755271
AC	119868	39480	3590060
TC	37230	9815	1013046
TCC	3269	1531	87348
ATC	3263	1064	99807
AT	4046	896	109032
AAC	1510	636	45069
TGC	1217	617	34908
TCTG	2799	596	87820
AAAC	1169	506	32384
TTC	1139	486	34047
ATGG	1738	481	58312
ATCT	6508	412	338560
AAAG	815	229	26692
AGTG	1411	215	45620
ATT	887	196	25536
TTCC	395	186	11344
ACTG	539	179	16360
AGGG	284	135	7176
AATG	371	133	10544
CGG	172	107	4467
TGCG	364	102	11228
ACC	212	93	5565
AGT	430	77	13482
AATC	274	72	9424
ATAC	467	72	15480
TGCC	211	58	6644
AAAT	131	29	3408
TCCG	88	25	2404
TTGG	55	22	1640
AACT	72	19	2892
AGCC	27	12	780
AGCG	17	10	468
ACCG	21	8	556
TCG	10	7	276
AAGT	8	7	220
AATT	15	5	420
TGGG	3	3	72
AGGT	55	2	1780
ATCG	3	2	76
CG	12	2	252
AACG	1	1	24
CCCG	1	0	24



De estos 265 se sintetizaron 26 pares de *primers* cuyos análisis de polimorfismo arrojaron que veinte presentan más de dos alelos en poblaciones de *C. hippurus* (Tabla 3). Es necesario resaltar que dos de éstos *loci*, Chi456 y Chi462, presentaron problemas en el proceso de estandarización y genotipificación, ya que hubo amplificación de bandas inespecíficas que producían ruido y una disminución de la señal, por lo que no fue posible realizar la genotipificación. Por lo anterior, estos dos loci fueron eliminados de los análisis subsecuentes.

**Tabla 3.** *Loci* microsatelitales y secuencias *primer* para *C. hippurus*. \*Loci polimórficos. En rojo se resaltan los *loci* polimórficos eliminados del análisis.

NOMBRE	MOTIVO	SECUENCIA PRIMER –F (5'-3')	SECUENCIA PRIMER –R (5'-3')
Chi004*	TGGT <sub>(12)</sub>	CAAACCTCAGGGCAGAACACG	TTTGGTTTGCATTTGGACCC
Chi024*	ACTG <sub>(9)</sub>	CAGAAACGTAGCTCCTTCTGGC	TTCGTTGAGACTCTAGGGATGG
Chi113*	AGGG <sub>(6)</sub>	AGGAGGCTGGACAGGAGG	ACTTCCTTCATGCTTTTCTGC
Chi166*	ACTG <sub>(15)</sub>	ATGCTGTGTTAATTCCCCGC	GTCTGGTATGAGTGATGTCTCAGC
Chi187	AAAT <sub>(14)</sub>	TACGAGACCTGCAAAACGGC	GGAGTGGGACTGAAGCAAGG
Chi284*	TTCC <sub>(7)</sub>	TGTGGGAGAGGTCATTGCC	AGAGGCAAGAGTGATGGTGC
Chi357*	AGGG <sub>(6)</sub>	TTTGTTTTGCTCTGCGTTGC	TTTTTCAGCCCTTCGACCC
Chi368*	ATCC <sub>(17)</sub>	GGAAACTTCTGCTTGTAACCTGG	AATCACTTTGGAGTGAAGCCG
Chi389*	AATG <sub>(6)</sub>	GAGTCAAAGAGAGGTGGAGCG	AAAAGGTAGAAAAGAGCAGCCG
Chi420	ATCT <sub>(6)</sub>	AACTGGATAAGGACGGGTTCC	CAGTTGAAGGATTTTGTCTAGATTAGG
Chi430*	GTTT <sub>(9)</sub>	ACTTTTGCATGATTGCGAGG	AAGCAAAGGATTTGCATCAGC
Chi453*	GGAT <sub>(10)</sub>	TCATCTGCAAGCAGAGTAGCC	AAGAGAAAGTCACGCAGCCC
Chi456*	AGGT <sub>(6)</sub>	TGAGAGCATCAGAGAAAGAGGG	TAAATTGTGAGGCTGCTGC
Chi462*	AGTG <sub>(9)</sub>	TTATCTTTGTGGCATTACCC	CAGTGCAGTAGAATGAAAGCTGG
Chi601*	AAAG <sub>(15)</sub>	TCAGTGCTTCAGAAATGCAGG	CATAGCTACATTTAGGCCCGC
Chi632	TGCG <sub>(7)</sub>	GGATGGGAAGTACAGATGAGGC	ATGACTCCTGAGGAATGCCG
Chi634*	ATAG <sub>(7)</sub> TA <sub>(10)</sub>	TCTCGCTGCCTCTCTGTAACC	GCGCAGCTTACCTTTTAGCC
Chi652*	AGTC <sub>(8)</sub>	TCCTGGCCAGAGAAGTTCC	GTTTGGGCCACATCAAACC
Chi688*	CACT <sub>(14)</sub>	AGTTGCCATCAGTTGGGG	AAGTCAGAAGCAATGATGTGGG
Chi759	TCTG <sub>(6)</sub>	CTGCAGGACCGAGTCATACG	AGGCATTCCACTTCCTACG
Chi797*	GTCT <sub>(10)</sub>	CTCCACATGCTTAAGGTGGC	GCCTTCATTTGGAGAACTGAGC
Chi811	TGCC <sub>(7)</sub>	GCTCCTGGTGTCTCTGCTCC	CCTGCTCTCTGAATCATGCC
Chi815	TCTG <sub>(6)</sub>	TGAAAGAGTTTATGGGCGGC	AGCACGAGCAGACAGACGG
Chi853*	CAAA <sub>(10)</sub>	TGGATTTGCCTTAAACAGCG	TTACGCTGAGCATCAGGAGG
Chi878*	AAAG <sub>(7)</sub>	TGAGCACTTTTGTCTTTGACC	AAAAGATCAAGCTGCTTTCTTACC
Chi967*	TGCC <sub>(6)</sub> CCTG <sub>(6)</sub>	GTGGTAGAGGTGGAGAGGGG	GGCTCCACTGTTTAGAGGGC





### 8.3 Genotipificación

En total fueron genotipificados 24 *loci* en 24 localidades a lo largo y ancho del rango de distribución de *C. hippurus* que sumaron un total de 725 individuos (Tabla 4).

**Tabla 4.** Tamaño muestral genotipificado por cuenca y por *locus*.

Locus\Pop	PACÍFICO	ÍNDICO	ATLÁNTICO	MEDITERRANEO	TOTAL
Chi008	433	64	158	46	701
Chi023	434	64	162	46	706
Chi002	434	64	152	46	696
Chi008A	433	64	147	46	690
Chi037	433	64	143	46	686
Chi004	325	54	101	0	480
Chi024	311	37	70	0	418
Chi062	281	55	128	46	510
Chi113	209	37	73	0	319
Chi166	177	32	63	0	272
Chi284	300	33	67	0	400
Chi357	263	51	71	0	385
Chi368	213	54	120	43	430
Chi389	323	55	129	39	546
Chi430	314	45	127	42	528
Chi453	311	50	117	29	507
Chi601	193	32	65	0	290
Chi634	183	49	65	0	297
Chi652	311	53	103	0	467
Chi688	272	52	104	40	468
Chi797	278	54	83	0	415
Chi853	336	44	107	37	524
Chi878	227	19	47	42	335
Chi967	323	61	142	35	561





## 8.4 Análisis de datos

### 8.4.1 Análisis de diversidad genética

Los veinticuatro *loci* analizados resultaron altamente polimórficos. El polimorfismo para cada cuenca oceánica resultó del 100%, excepto para el Mar Mediterráneo el cual presentó un polimorfismo del 54.17%. La curva de acumulación de genotipos muestra que se alcanza una fase de meseta con aproximadamente 10 *loci*. Lo cual quiere decir que la diversidad genética de la especie ha sido bien muestreada considerando el presente set de datos. De igual forma se encontró que todos los *loci* resultan informativos.

La diversidad alélica obtenida (número de alelos/número de *loci*) fue de 19.83. El número de alelos por *locus* va de 11 (Chi004 y Chi453) hasta 60 (Chi634). A nivel de cuencas oceánicas el promedio general (promedio sobre todos los *loci*) fue de 13.2 alelos, partiendo del Mar Mediterráneo con un promedio de 5.0 alelos hasta el Océano Pacífico con 18.7 alelos en promedio. A nivel de localidades dentro de los océanos, este promedio fluctuó entre 3.1 para Japón (JP) hasta 12.2 para Ecuador (EC). En el análisis de riqueza alélica y rarefacción asumiendo un tamaño mínimo muestral de 46 individuos para el análisis de cuencas encontramos que el Océano Índico presenta el valor más alto (10.64) y Mar Mediterráneo el más bajo (7.00), a nivel de localidades partiendo de 8 individuos para el análisis, Seychelles presenta el valor más alto (7.29) y Túnez sigue manteniendo el valor más bajo (5.24) (Ver Anexo II). En general se obtuvieron alelos privados para todos los *loci* y localidades excepto Chi037 y Chi237 y PM, JP, SA, GM, respectivamente.

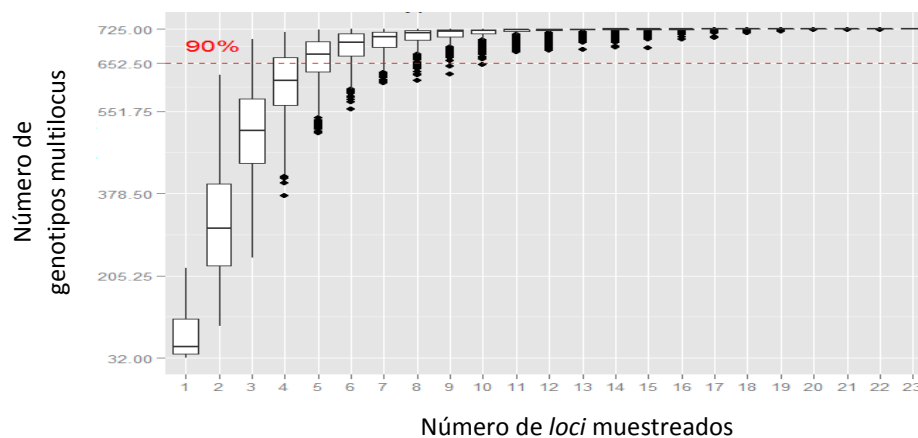
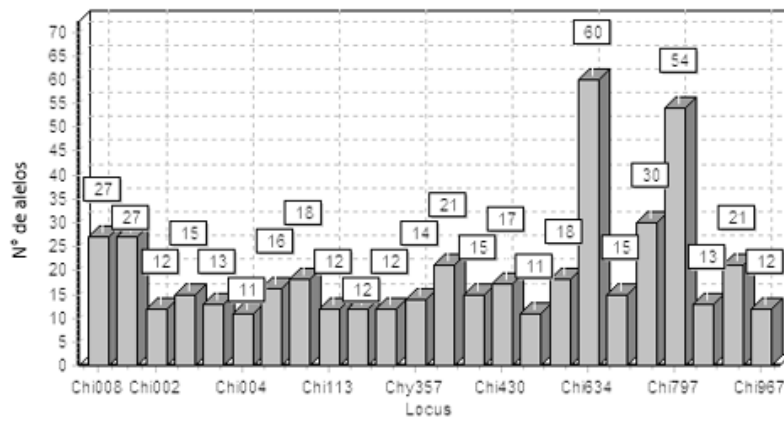


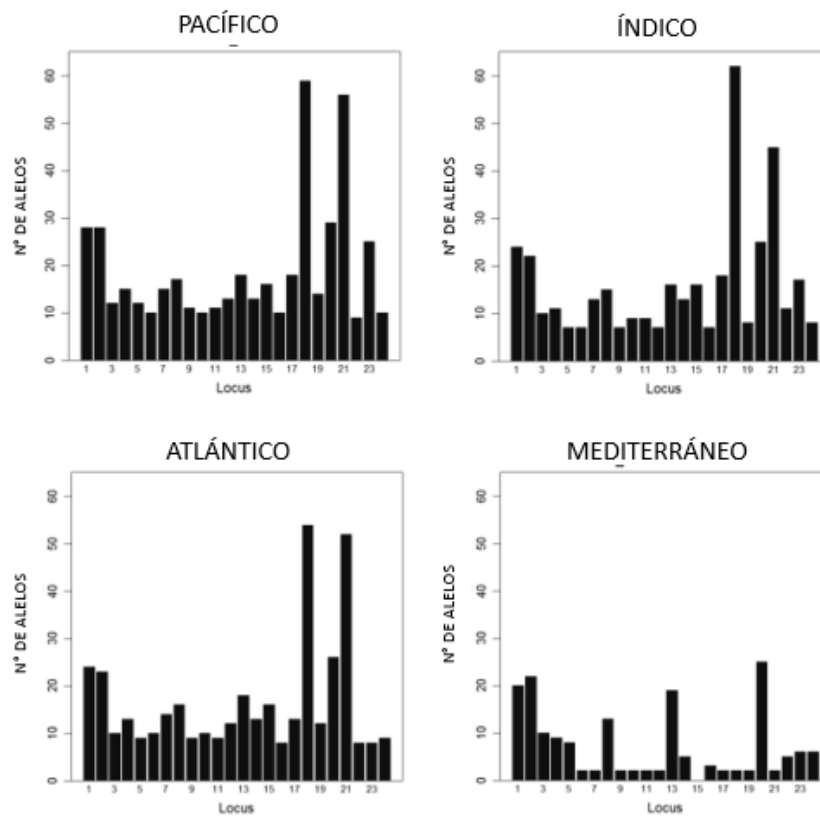
Fig. 7. Curva de acumulación de genotipos.



a)



b)



**Fig. 8.** Número de alelos por *locus*. De izquierda a derecha: Chi008, Chi023, Chi002, Chi008A, Chi037, Chi004, Chi024, Chi062, Chi113, Chi166, Chi284, Chi357, Chi368, Chi 389, Chi430, Chi453, Chi601, Chi634, Chi652, Chi688, Chi797, Chi853, Chi878, Chi967. a) Para todas las muestras. b) Por cuenca.



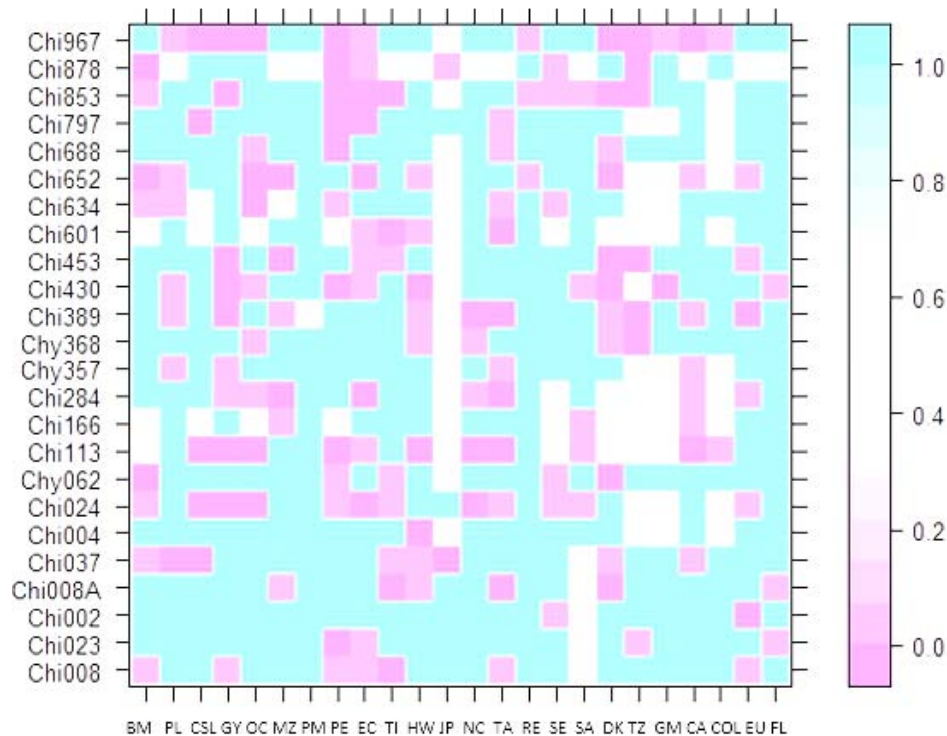
La heterocigosis observada media para las cuencas oceánicas fue de 0.596 ( $\pm 0.28$ ) fluctuando entre valores de 0.356 (Mar Mediterráneo) y 0.693 (Océano Índico), con valores por localidad desde 0.258 (JP) hasta 0.758 (PM) (ver Anexo II). La heterocigosis esperada promedio fue de 0.689 y se encontró de 0.383 (Mar Mediterráneo) a 0.814 (Océano Índico) variando por localidad de 0.253 (JP) a 0.768 (EC) (Anexo II).

#### 8.4.2 Prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio por ligamiento

Se determinó la desviación de las frecuencias de los heterocigotos observados y esperados a las frecuencias esperadas bajo equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W), por población, por *locus* y se realizaron permutaciones de los datos para determinar el valor  $p$  de la prueba (Anexo II). Por otra parte, al analizar las muestras en términos de cuencas oceánicas, se encontró que para todas ellas hubo un alto porcentaje de *loci* en desequilibrio de H-W (PAC: 83.3%, IND: 79.2% y ATL: 75.0%). Al analizar las localidades dentro de cada cuenca éstos porcentajes disminuyeron, se encontró que aquella que presentó un mayor número de *loci* en desequilibrio de H-W fue Perú (PE) con 12 *loci* de 22 registrados y aquella con menor número fue PM ya que ninguno resultó significativo. Chi113, es el *locus* con un mayor porcentaje de localidades en desequilibrio de las frecuencias esperadas bajo H-W, el 77.8% de las localidades genotipificadas. La localidad con una mayor proporción de *loci* fue PE (54.5%) seguida por EC (54.1%).

Todos los *loci* que resultaron significativamente desviados al equilibrio de Hardy-Weinberg se deben a un déficit de heterocigotos. Sin embargo no existe un patrón de desequilibrio por déficit de heterocigotos en todos los *loci* de una población, ni para todas las poblaciones de un solo *locus* (ver Fig. 9 y ver Anexo II). Por lo anterior, se realizó un análisis para estimar la frecuencia de alelos nulos, en el que confirmamos que el error de genotipificación/alelos nulos puede ser una de las causantes de observar las altas proporciones de *locus* en desequilibrio a los valores esperados bajo Hardy-Weinberg y los estimados de diferenciación  $F_{ST}$  fueron corregidos teniendo en cuenta dichas frecuencias.





**Fig. 9.** Mapa de calor de valores de significancia para la prueba de Equilibrio de Hardy-Weinberg. Los recuadros rosas representan un  $p \leq 0.05$  y por lo tanto representa los *locus*/localidades para los cuales la  $H_0$  de equilibrio de las frecuencias bajo Hardy-Weinberg es rechazada.

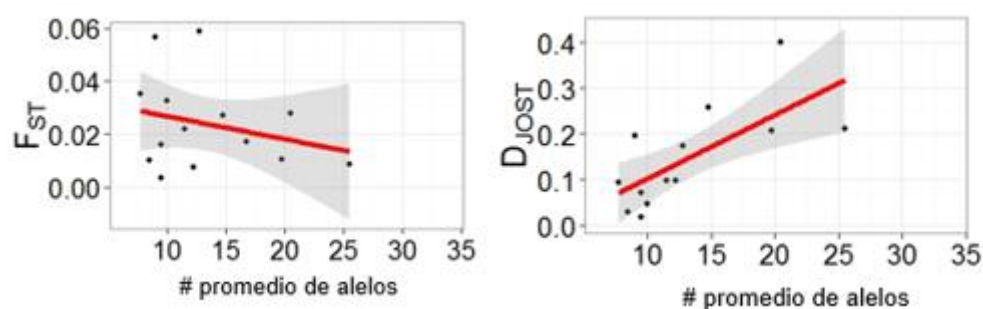
Adicionalmente, se puso a prueba la hipótesis de segregación independiente entre pares de *loci*. Ninguna cuenca oceánica se desvió significativamente, sin embargo en el análisis de las localidades sí se presentaron algunos pares en desequilibrio por ligamiento, en total 309 pruebas de las 6624 (4.7%) que se realizaron resultaron significativas, no se encontró algún par de *loci* que se encontrará en desequilibrio para todas las localidades y/o cuencas oceánicas, así como ninguna cuenca/localidad que presentará un alto porcentaje de *loci* en desequilibrio por ligamiento (Anexo IV). Considerando el número de cromosomas que presenta la especie ( $2n=48$ ), así como el tamaño del mismo, es posible asumir la independencia de los *loci* evaluados en el presente proyecto.



### 8.4.3 Análisis de estructura poblacional

Dado que existe la posible presencia de alelos nulos para varios *loci* en las localidades muestreadas, se determinó si la frecuencia de los mismos afecta de forma significativa los valores de fijación obtenidos ( $F_{ST}$ ), encontrando que no existen diferencias significativas en los valores obtenidos después de la corrección de la frecuencias por alelos nulos en las estimaciones de  $F_{ST}$ , tanto por *locus* ( $w = 187, p = 0.290$ ), como para las  $F_{ST}$ 's obtenidas en las comparaciones entre pares de muestras ( $W = 0.997; p = 0.001$ ).

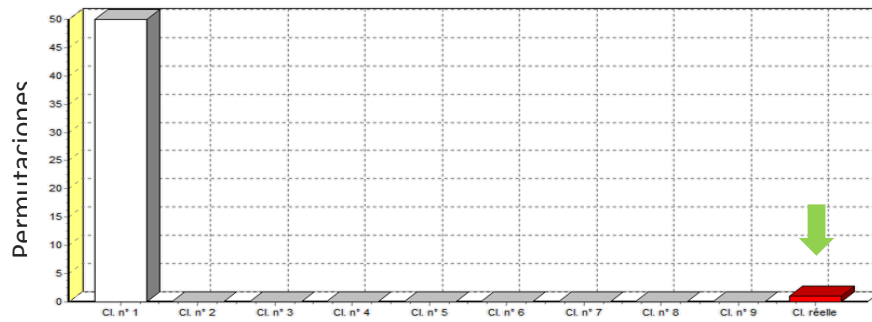
En cuanto a los estadísticos de diferenciación que fueron calculados ( $D'_{Jost}$  y  $F_{ST}$ ) se observa que a medida que aumenta el número de alelos promedio registrados, los estadísticos calculados se comportan de forma diferente pero de acuerdo a lo que se espera dado la naturaleza de los mismos (Fig. 10). Alternativamente, realizamos una correlación de matrices con el fin de poner a prueba la congruencia entre los valores de los estadísticos. Los resultados arrojan un coeficiente de concordancia de Kendall (Kendall & Babington Smith, 1939) notablemente alto  $W = 0.979$  y significativo ( $p = 0.001$ ) para las matrices de comparación de cuencas oceánicas, similar al obtenido para las matrices de comparación entre localidades ( $W = 0.879, p = 0.001$ ). Lo anterior significa que la hipótesis nula de no relación entre matrices es rechazada y por lo tanto hay congruencia entre los valores obtenidos para los diferentes estadísticos de diferenciación, sin embargo si encontramos diferencias en cuanto a la significancia estadística de los mismos.



**Fig. 10.** Relación entre los estadísticos  $F_{ST}$  (Weir & Cockerham, 1984) y  $D'_{Jost}$  (Jost, 2008) y el número promedio de alelos por *locus* para el presente set de datos.

El  $F_{ST}$  global = 0.0617 y el estadístico  $D'_{Jost}$  global = 0.4045, ambos altamente significativos ( $p < 0.001$ ) (Fig. 11).





**Fig. 11.** Distribución de las  $F_{ST}$  calculadas con 1000 permutaciones a partir de la distribución aleatoria de los datos. La flecha indica la clase donde se encuentra el estadístico  $F_{ST}$  calculado.

Los estadísticos de diferenciación estimados por cada *locus* resultaron diferentes entre los mismos ( $w = 300$ ,  $p < 0.001$ ). Los estadísticos corregidos de Weir (1996) resultaron máximos para Chi023 ( $F_{ST}=0.358$ ) y menor para Chi023 ( $F_{ST}=0.007$ ), así como estimados  $D'Jost$ , fue mayor el valor para Chi634 ( $D=0.713$ ) y menor para Chi002 ( $D=0.128$ ) (ver Anexo III).

#### 8.4.3.1 Diferenciación entre cuencas oceánicas

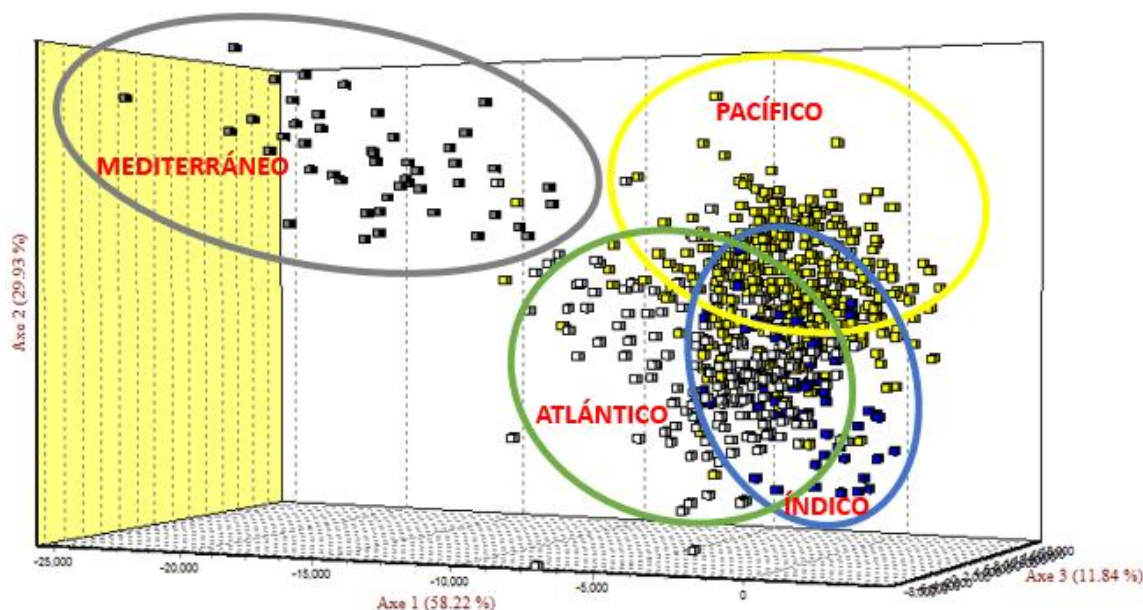
A nivel de cuencas oceánicas, los valores de  $F_{ST}$  calculados para las comparaciones entre pares de cuencas arrojan diferencias mayores y significativas ( $\alpha=0.05$ ) para todas las comparaciones, obteniendo los valores más altos entre la cuenca del Mar Mediterráneo comparado con las otras cuencas. El mismo patrón se presenta para los estadísticos  $D'Jost$ , aunque con valores mayores; además una de las comparaciones no resulta estadísticamente significativa, que corresponde a la comparación entre el Océano Índico y el Océano Atlántico ( $p = 0.116$ ). Después de aplicar la corrección de Bonferroni a los datos obtenemos que las diferencias son conspicuas entre Mediterráneo y todo lo demás, y entre Pacífico y Atlántico, para los dos estadísticos (Tabla 5).



**Tabla 5.** Estimados de diferenciación genética. Sobre la diagonal, los estadísticos de diferenciación  $D'_{Jost}$ . Bajo la diagonal, valores del índice de fijación  $F_{ST}$ . En rojo se resaltan aquellos valores significativos estadísticamente después de aplicar la corrección por Bonferroni ( $\alpha = 0.008$ ) y entre paréntesis el valor  $p$ .

PACÍFICO	ATLÁNTICO	ÍNDICO	MEDITERRÁNEO	
*	<b>0.0213</b> ( $<0.0001$ )	<b>0.0288</b> (0.011)	<b>0.0419</b> ( $<0.0001$ )	PACÍFICO
<b>0.0096</b> ( $<0.0001$ )	*	0.0147 (0.116)	<b>0.0493</b> ( $<0.0001$ )	ATLÁNTICO
<b>0.0126</b> (0.001)	<b>0.008</b> (0.015)	*	<b>0.0491</b> ( $<0.0001$ )	ÍNDICO
<b>0.0581</b> ( $<0.0001$ )	<b>0.067</b> ( $<0.0001$ )	<b>0.0631</b> ( $<0.0001$ )	*	MEDITERRÁNEO

Adicionalmente se realizó un análisis factorial de correspondencia, en el cual se visualiza claramente la distribución diferencial de las poblaciones provenientes de las diferentes cuencas oceánicas (Fig 12).



**Fig. 12.** Análisis Factorial de Correspondencia de las poblaciones del Pacífico, Índico, Atlántico Y Mar Mediterráneo mediante el análisis de 24 *loci* microsatelitales. Los individuos en amarillo provienen de la cuenca del Pacífico, los de azul del Índico, los blancos (círculo verde) del Atlántico y los grises del Mediterráneo.

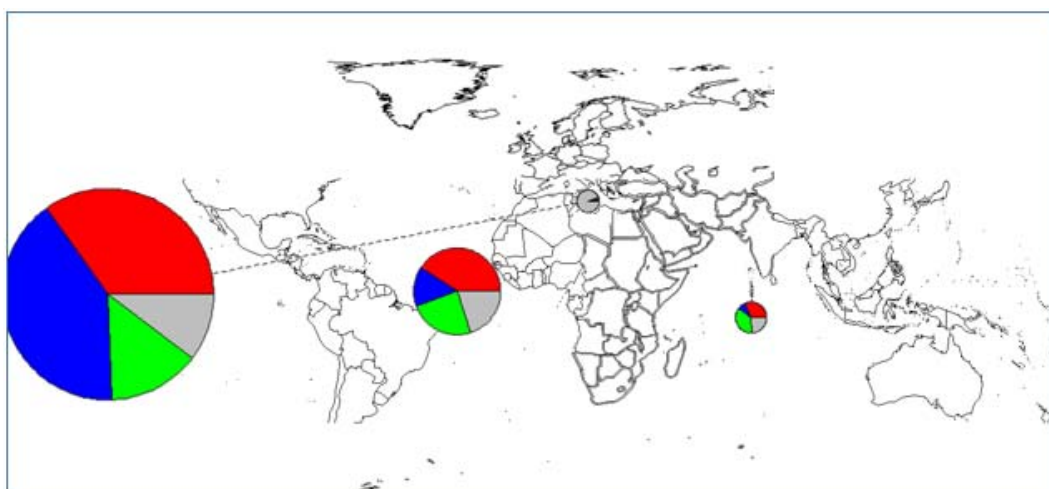


El análisis bayesiano mediante Structure (Pritchard *et al.*, 2000) para determinar el número de clusters más probable, dio como resultado que el valor más alto de la probabilidad dado los datos ( $P(D)$ ), es para  $k = 4$  cuando el  $\ln$  promedio de las seis réplicas equivale a  $-46382$  (Fig. 13).

El análisis jerárquico de varianza molecular AMOVA se realizó considerando todas las localidades en el mismo set de datos y agrupándolas de acuerdo a la cuenca oceánica a la que pertenece (Pacífico, Atlántico, Índico y Mar Mediterráneo). En la prueba se obtuvo un valor de  $F_{CT} = 0.013$  y significativo ( $p = 0.036 \pm 0.005$ ) (Tabla 6). Las estimaciones de la varianza al interior de las poblaciones ( $F_{IT}$ ), y entre localidades dentro de los grupos ( $F_{SC}$ ), además de resultar negativas no tuvieron soporte estadístico. Sin embargo, al sacar del análisis la población de Túnez en el Mar Mediterráneo, la señal de diferenciación entre grupos (cuencas oceánicas) se pierde resultando en un  $F_{CT} = 0.0003$  ( $p = 0.869 \pm 0.0108$ ).

**Tabla 6.** Prueba de diferenciación jerárquica AMOVA para las cuencas oceánicas donde se encuentra *C. hippurus*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
<b>Entre cuencas</b>	16.106	0.02077	1.30
<b>Entre poblaciones dentro de las cuencas</b>	-0.433	-0.0275	-1.72
<b>Entre poblaciones Dentro individuos</b>	1115.381	-0.01306	-0.82
	1172.500	1.61724	101.24
	4314.324	2.1211	

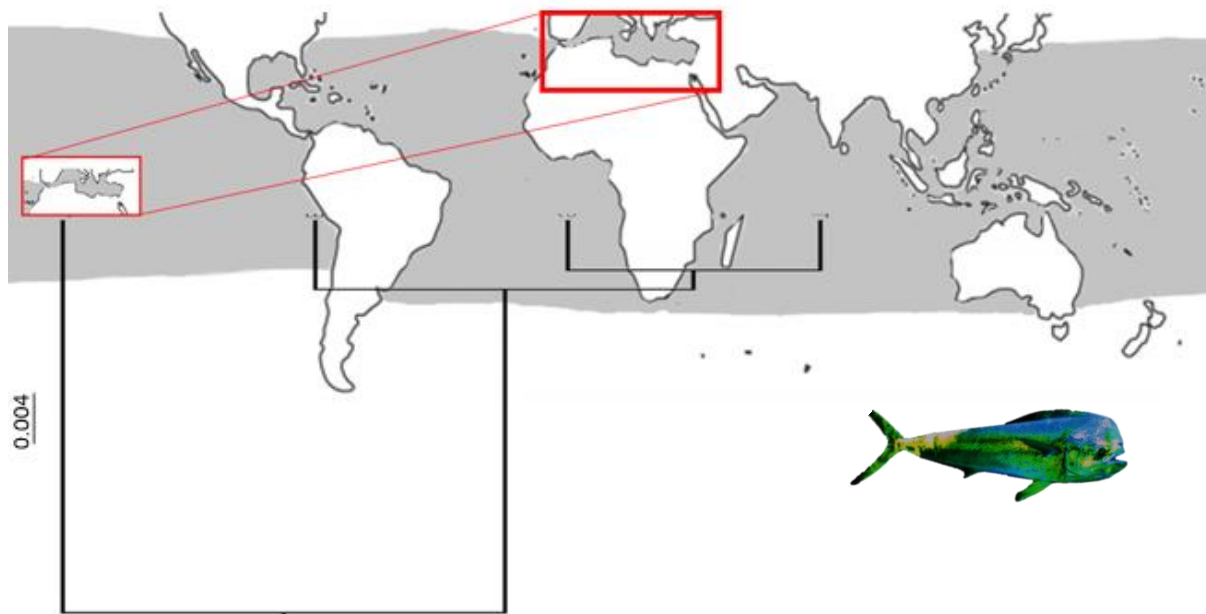


**Fig. 13.** Mapa con los gráficos de las proporciones de mezcla para  $k=4$ . El tamaño de los círculos corresponde al  $N$  muestral.





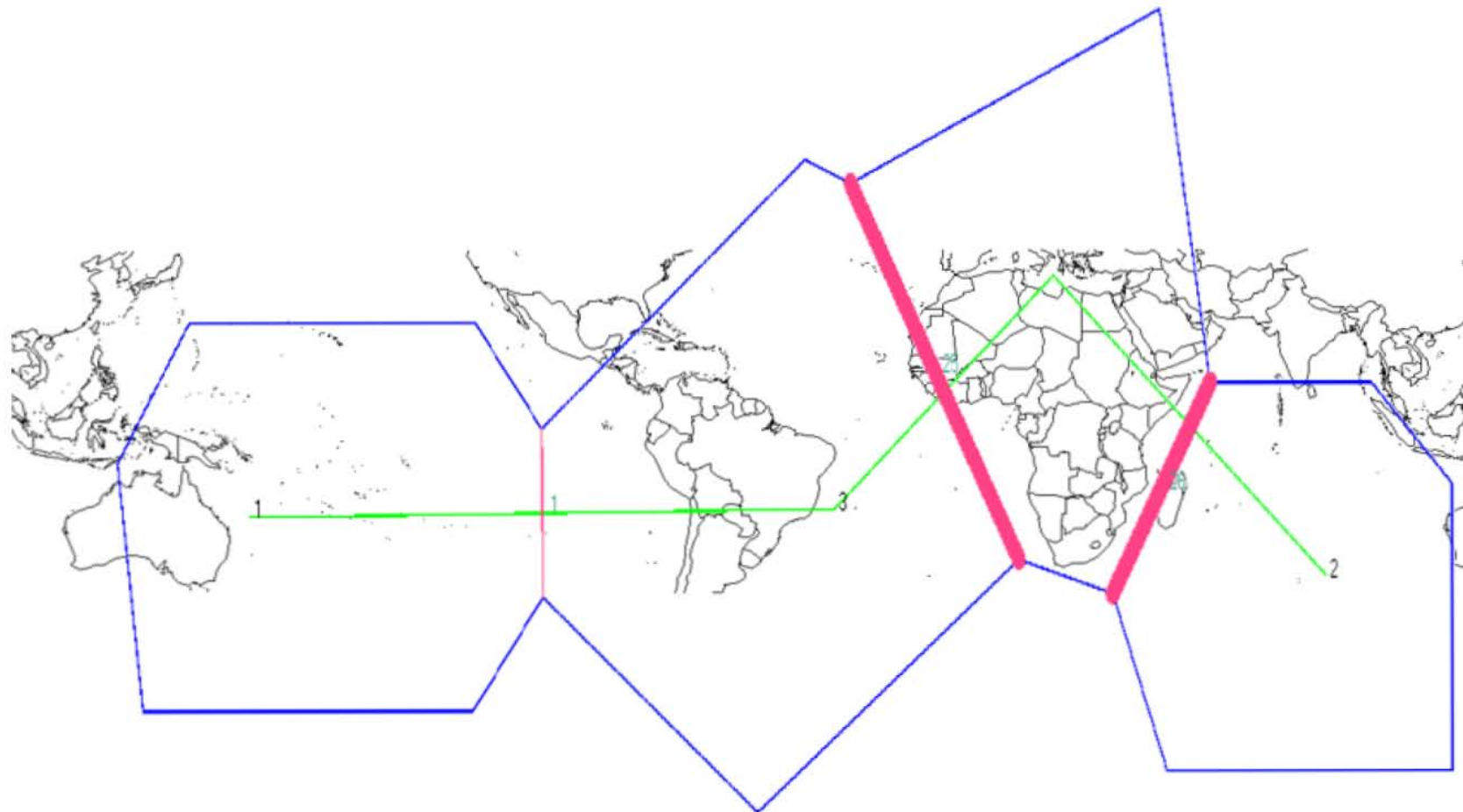
El árbol de distancia genéticas obtenido revela, como se ha observado en los análisis anteriores que la mayor distancia genética la presenta la población del Mar Mediterráneo. Además agrupa con distancias similares las poblaciones del Índico y del Atlántico alejadas por una rama más larga de la población del Pacífico (Fig. 14). El valor  $R$  obtenido fue igual a 0.989, indicando que ésta figura describe las distancias genéticas que reflejan los datos con alto grado de confianza.



**Fig. 14.** Árbol rectangular de distancias genéticas  $F_{ST}$  generadas para los genotipos microsatelitales en *C. hippurus* usando TREEFIT.

Para determinar donde se ubicaban las principales barreras geográficas, se construyó un mapa de barreras utilizando como réplicas las diferentes matrices de  $F_{ST}$  generadas para cada uno de los *locus* (Fig. 15).





**Fig 15.** Mapa de barreras al flujo genético utilizando como réplicas las diferentes matrices de  $F_{ST}$  corregidas por alelos nulos generadas para cada uno de los *locus*, así como la matriz de diferencias entre océanos del estadístico  $D'Jost$ . Las líneas más gruesas representan aquellas barreras con mayor soporte.

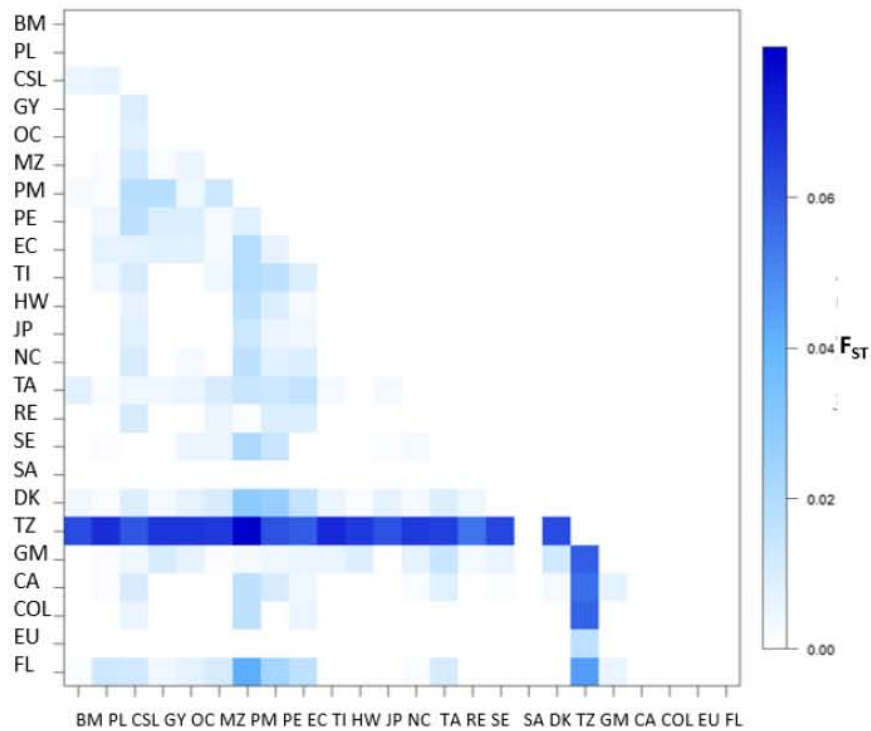


#### 8.4.3.2 Diferenciación dentro de cuencas oceánicas

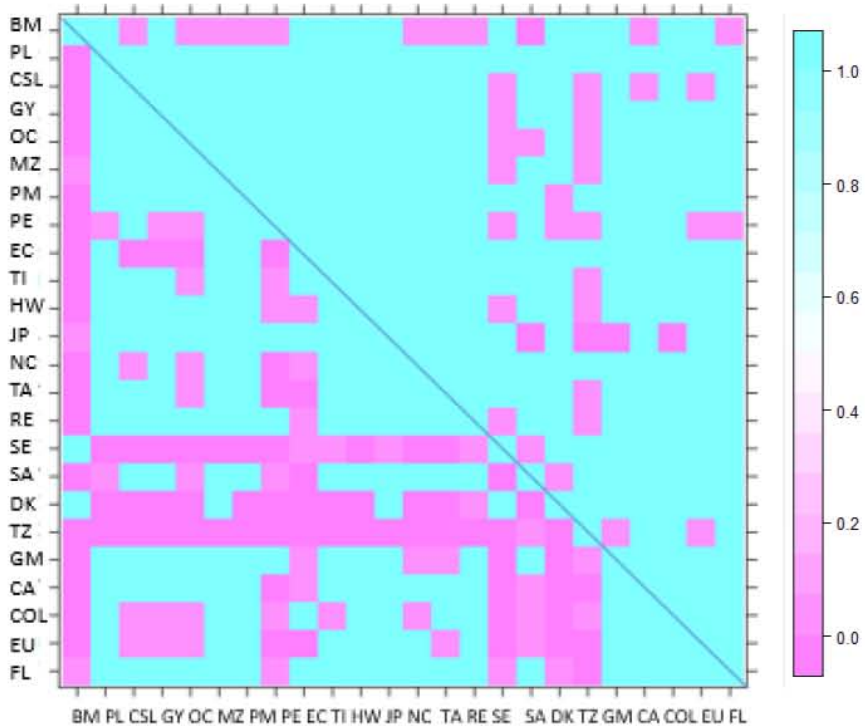
Las comparaciones entre pares de localidades arrojan  $F_{ST}$  con valores que van desde  $<0.001$  hasta 0.158 y valores de  $D'_{Jost}$  desde 0.000 hasta 0.264 (Tablas 7, 8 y 9). La población que en general presentó los valores de diferenciación más altos fue Túnez (Mar Mediterráneo) (Fig.16a) presentando un  $F_{ST}$  promedio de 0.088 y un  $D'_{Jost}$  promedio de 0.051. Como se puede apreciar en la Fig. 16a para los  $F_{ST}$  (patrón similar al  $D'_{Jost}$ ), otras localidades presentan en general estadísticos de diferenciación altos como lo son Cabo San Lucas (CSL) y Puerto Madero (PM) en México, Perú (PE), Ecuador (EC), Tailandia (TA), Senegal (DK), Golfo de México (GM) y Florida (FL). Sin embargo, las pruebas de permutación para determinar la significancia del estadístico dieron como resultado, considerando un valor  $\alpha = 0.0002$  (corregido por Bonferroni), que los  $F_{ST}$  no resultan estadísticamente diferentes. Para los estadísticos  $D'_{Jost}$ , dentro de las cuencas oceánicas, resultan significativas después de Bonferroni las comparaciones de Ecuador (EC), Sur África (SA) y Senegal (DK) (Fig. 16b).



a)



b)

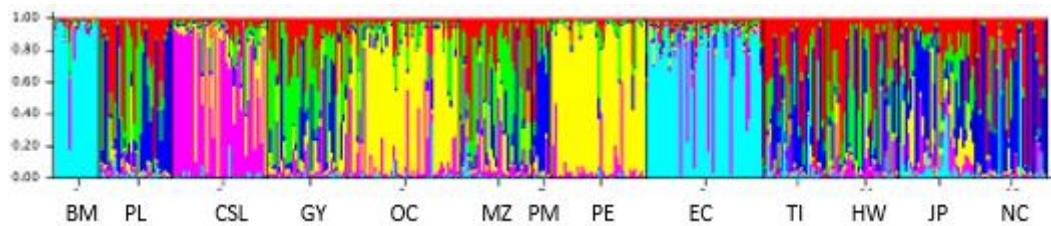


**Fig. 16 a)** Mapa de calor para el estadístico corregidos para alelos nulos  $F_{ST}$ . **b)** Mapa de calor para los valores de significancia estadística, los recuadros rosas indican un valor de  $p \leq 0.05$  (sin corrección por Bonferroni). Sobre la diagonal se grafican los valores  $p$  para el estadístico  $D'Jost$  y bajo la diagonal los valores  $p$  para  $F_{ST}$ .



#### 8.4.3.2.1 Océano Pacífico

Dentro del Océano Pacífico se obtienen diferencias significativas particularmente para la localidad de Bahía Magdalena para los dos estadísticos, y particularmente para el estadístico *D'Jost*, se obtienen valores significativos también para comparaciones hechas entre Perú y Ecuador, lo anterior considerando un  $\alpha = 0.05$  (Tabla 7). Sin embargo, una vez aplicada la corrección de Bonferroni se obtiene un  $\alpha = 0.0002$ , lo que origina que los únicos valores que permanecen significativos son para el estadístico *D'Jost* en algunas comparaciones con BM y otras con EC. En el análisis bayesiano para determinar el número más probable de poblaciones  $k = 6$  resultó ser aquella con mayor probabilidad ( $\ln(D) = -228681.7$ ) y donde al parecer las muestras del Pacífico central y occidental pertenecen a un mismo cluster, mientras que aquellas provenientes del Pacífico Oriental presentan una estructuración más compleja (Fig. 17).



**Fig. 17.** Gráfico de barras para  $K=6$  de la prueba de  $\ln P(D)$  desarrollada en STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000) para las localidades colectadas dentro del Océano Pacífico.

El AMOVA para determinar la estructura entre márgenes continentales, en el caso del Océano Pacífico se incluyó un tercer grupo correspondiente al Pacífico Central (Hawái + Tahití), se obtuvo un valor de  $F_{CT} = 0.001$  pero sin significancia estadística ( $p = 0.951$ ).



**Tabla 7.** Tabla de diferenciación entre pares de localidades del Océano Pacífico. Entre paréntesis el valor *p* de la prueba. Bajo la diagonal, estadísticos calculados de  $F_{ST}$  corregidos por alelos nulos. Sobre la diagonal, estadísticos *D'Jost*. En negrita e resaltan los valores cuya significancia es < 0.05, en rojo se resaltan los valores que presentaron un  $p \leq 0.0002$  (corregido por Bonferroni).

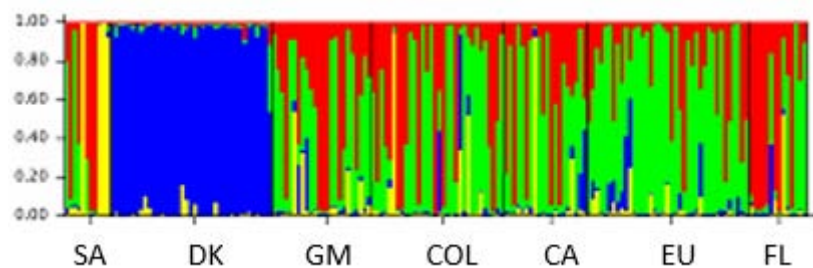
	PACÍFICO ORIENTAL									CENTRAL		OCCIDENTAL	
	BM	PL	CSL	GY	OC	MZ	PM	PE	EC	TI	HW	JP	NC
<b>BM</b>		<b>0.1421</b>	<b>0.2140</b>	<b>0.2086</b>	<b>0.2108</b>	<b>0.1277</b>	<b>0.1659</b>	<b>0.2646</b>	<b>0.1177</b>	<b>0.1259</b>	<b>0.1622</b>	<b>0.0104</b>	<b>0.1903</b>
		(<0.001)	(<0.001)	(<0.001)	(<0.001)	(0.0019)	(<0.001)	(<0.001)	(0.0001)	(0.0003)	(<0.001)	(0.0273)	(<0.001)
<b>PL</b>	0.0780		0.0133	0.0028	0.0165	0.0180	0.0000	<b>0.0427</b>	0.0360	0.0132	0.0089	-0.0003	0.0014
	(0.0770)		(0.4963)	(0.8822)	(0.2747)	(0.4451)	(>0.999)	(0.0288)	(0.0733)	(0.7106)	(0.6427)	(>0.999)	(0.9473)
<b>CSL</b>	<b>0.1230</b>	0.0390		0.0073	0.0108	0.0051	0.0065	0.0279	<b>0.0635</b>	0.0581	0.0199	-0.0001	<b>0.0551</b>
	(0.0148)	(0.1014)		(0.6404)	(0.5153)	(0.8162)	(0.8881)	(0.0666)	(0.0004)	(0.1011)	(0.1918)	(>0.999)	(0.0194)
<b>GY</b>	0.1110	0.0180	0.0250		0.0206	0.0001	0.0003	<b>0.0351</b>	<b>0.0860</b>	0.0374	0.0086	-0.0004	0.0304
	(0.0613)	(0.3931)	(0.1056)		(0.1005)	(0.9969)	(0.9961)	(0.0219)	(<0.001)	(0.2655)	(0.6209)	(>0.999)	(0.0986)
<b>OC</b>	<b>0.1350</b>	0.0350	0.0280	0.0260		0.0059	0.0115	<b>0.0254</b>	<b>0.0841</b>	<b>0.0659</b>	0.0228	-0.0010	<b>0.0624</b>
	(0.0336)	(0.2125)	(0.0775)	(0.1722)		(0.7245)	(0.8045)	(0.0225)	(<0.001)	(0.0246)	(0.1319)	(>0.999)	(0.0040)
<b>MZ</b>	<b>0.1120</b>	0.0250	0.0380	0.0210	0.0240		0.0000	0.0224	0.0356	0.0211	0.0086	-0.0017	0.0447
	(0.0459)	(0.2205)	(0.1141)	(0.2532)	(0.3446)		(>0.999)	(0.2352)	(0.2451)	(0.5797)	(0.6204)	(>0.999)	(0.0731)
<b>PM</b>	<b>0.0890</b>	0.0240	0.0590	0.0420	0.0650	0.0450		0.0311	0.0260	0.0169	0.0061	0.0000	0.0001
	(0.0393)	(0.3054)	(0.1004)	(0.2565)	(0.1688)	(0.2691)		(0.5522)	(0.6543)	(0.7824)	(0.8991)	(>0.999)	(0.9986)
<b>PE</b>	<b>0.1580</b>	0.0640	0.0400	0.0500	0.0250	0.0420	0.0770		<b>0.1115</b>	<b>0.0933</b>	<b>0.0427</b>	0.0000	<b>0.0980</b>
	(0.0118)	(0.0993)	(0.0601)	(0.1469)	(0.1586)	(0.2288)	(0.0938)		(<0.001)	(0.0151)	(0.0165)	(>0.999)	(0.0001)
<b>EC</b>	0.0720	0.0310	0.0800	0.0770	0.0900	0.0540	0.0520	0.0980		0.0391	<b>0.0490</b>	0.0000	<b>0.0699</b>
	(0.1080)	(0.1557)	(0.1729)	(0.1939)	(0.1648)	(0.1955)	(0.1229)	(0.0982)		(0.2341)	(0.0074)	(>0.999)	(0.0075)
<b>TI</b>	0.0710	0.0170	0.0510	0.0230	0.0500	0.0370	0.0330	0.0870	0.0340		0.0077	-0.0041	0.0029
	(0.1028)	(0.2772)	(0.0717)	(0.2211)	(0.1614)	(0.1428)	(0.1494)	(0.0761)	(0.1574)		(0.8111)	(>0.999)	(0.9166)
<b>HW</b>	0.1000	0.0210	0.0330	0.0190	0.0310	0.0070	0.0340	0.0540	0.0420	0.0180		-0.0014	0.0038
	(0.0548)	(0.2345)	(0.0818)	(0.1841)	(0.1145)	(0.3347)	(0.2514)	(0.0661)	(0.1930)	(0.1685)		(>0.999)	(0.8530)
<b>JP</b>	0.0490	0.0020	0.0200	0.0090	0.0070	0.0060	0.0120	0.0070	0.0400	0.0040	0.0020		0.0000
	(0.5230)	(0.8573)	(0.1826)	(0.5411)	(0.5142)	(0.6913)	(0.3941)	(0.4441)	(0.4965)	(>0.999)	(>0.999)		(>0.999)
<b>NC</b>	<b>0.0930</b>	0.0140	0.0600	0.0310	0.0620	0.0420	0.0280	0.0870	0.0450	0.0010	0.0210	0.0090	
	(0.0411)	(0.4530)	(0.0913)	(0.2469)	(0.1255)	(0.1438)	(0.1650)	(0.0768)	(0.1436)	(0.9276)	(0.1929)	(0.6162)	



#### 8.4.3.2.2 Océano Atlántico

Es necesario resaltar que para los análisis realizados en esta sección se omitió la localidad del Mediterráneo, ya que ésta fue analizada aisladamente en la sección entre cuencas oceánicas.

En la tabla de diferenciación entre pares dentro del Océano Atlántico, la única diferencia significativa para los estadísticos  $F_{ST}$  es la comparación entre Sur África (SA) y Dakar (DK), sin embargo después de aplicar Bonferroni, similar a la cuenca del Pacífico, ninguna comparación mantiene significancia estadística. Para el estadístico  $D'_{Jost}$ , se obtienen valores significativos las comparaciones hechas en SA y DK con respecto al resto de localidades, ésta última localidad permanece significativa después de Bonferroni (Tabla 8). En el análisis bayesiano para determinar el número más probable de poblaciones  $k = 4$  resultó ser aquella con mayor probabilidad ( $\ln(D) = -10057.6$ ). Sin embargo, en la gráfica de barras de mezcla se aprecia que la única población ampliamente diferenciada del resto corresponde a Dakar (Fig. 18).



**Fig. 18.** Gráfico de barras para  $K=4$  de la prueba de  $\ln P(D)$  desarrollada en STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000) para las localidades colectadas dentro del Océano Atlántico.

El análisis molecular de varianza para determinar la estructura entre márgenes continentales, Este y Oeste, arrojó un valor de  $F_{CT} = 0.011$  pero sin significancia estadística ( $p = 0.951$ ).



**Tabla 8.** Tabla de diferenciación entre pares de localidades del Océano Atlántico. Valor  $p$  entre paréntesis. Bajo la diagonal, estadísticos calculados de  $F_{ST}$  corregidos por alelos nulos. Sobre la diagonal, estadísticos  $D'Jost$ . En negrita se resaltan los valores que presentaron un  $p \leq 0.05$ . En rojo se resaltan aquellos valores que permanecen significativos después de corregir por Bonferroni ( $\alpha = 0.0002$ )

	SA	DK	GM	CA	COL	EU	FL
SA		<b>0.1321</b> (<0.001)	0.0078 (0.3919)	<b>0.0663</b> (0.0339)	<b>0.0243</b> (0.0091)	<b>0.0950</b> (0.0040)	0.0411 (0.2832)
DK	<b>0.1160</b> (0.0091)		<b>0.0469</b> (<0.001)	<b>0.0768</b> (<0.001)	<b>0.0611</b> (<0.001)	<b>0.0930</b> (<0.001)	<b>0.0821</b> (0.0208)
GM	0.0460 (0.2078)	0.0720 (0.1059)		0.0042 (0.6113)	0.0071 (0.4333)	0.0165 (0.0696)	0.0033 (0.7848)
CA	0.0450 (0.0616)	0.0650 (0.0892)	0.0210 (0.3164)		0.0184 (0.1835)	0.0109 (0.5694)	0.0099 (0.8123)
COL	0.0430 (0.1838)	0.1080 (0.1630)	0.0420 (0.4736)	0.0160 (0.2730)		0.0180 (0.1410)	0.0024 (0.8807)
EU	0.0930 (0.0914)	0.0830 (0.1012)	0.0350 (0.2143)	0.0250 (0.1580)	0.0300 (0.1732)		0.0178 (0.7016)
FL	0.0640 (0.2246)	0.0840 (0.0543)	0.0170 (0.2846)	0.0130 (0.3496)	0.0100 (0.4801)	0.0400 (0.1843)	

#### 8.4.3.2.3 Océano Índico

Al igual que para el Océano Atlántico, las muestras provenientes de Sur África, fueron incluidas en el presente análisis.

En la tabla de diferenciación entre pares dentro del Océano Índico, la única diferencia significativa para los estadísticos  $F_{ST}$  es la comparación entre Islas Seychelles e Islas Reunión, cuya significancia se pierde después de la corrección de Bonferroni. Para el estadístico  $D'Jost$ , se obtienen valores significativos las comparaciones hechas entre SE y las demás localidades (Tabla 9). El número más probable de poblaciones resultó en  $k = 2$  ( $\ln(D) = -4933.3$ ) (Fig. 19).

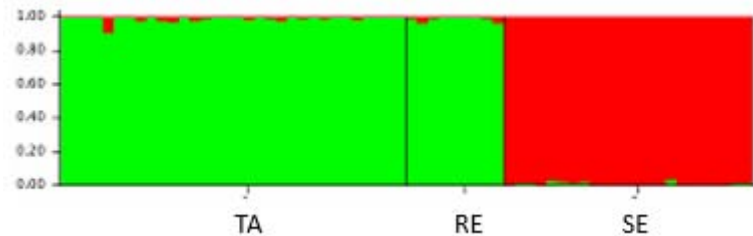




**Tabla 9.** Tabla de diferenciación entre pares de localidades del Océano Índico. Valores  $p$  entre paréntesis. Bajo la diagonal, estadísticos calculados de  $F_{ST}$  corregidos por alelos nulos. Sobre la diagonal, estadísticos  $D'_{Jost}$ . En negrita se resaltan los valores que presentaron un  $p \leq 0.05$ . En rojo se resaltan los valores que permanecen significativos después de la corrección por Bonferroni ( $\alpha = 0.0002$ )

	TA	RE	SE	SA
TA		0.0175	<b>0.1166</b>	0.0356
		0.7064	0.0000	0.2150
RE	0.0370		<b>0.1124</b>	0.0207
		0.2478	0.0123	0.6042
SE	0.1110	<b>0.1040</b>		<b>0.1421</b>
		0.0505	0.0372	0.0000
SA	0.0290	0.0510	0.1560	
		0.0993	0.2468	0.0262

El análisis molecular de varianza para determinar la estructura entre márgenes continentales, Este y Oeste, arrojó un valor de  $F_{CT} = 0.013$  pero no significativo estadísticamente ( $p = 0.386$ )



**Fig. 19.** Gráfico de barras para  $K=2$  de la prueba de  $\ln P(D)$  desarrollada en STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000) para las localidades colectadas dentro del Océano Índico.



#### 8.4.4 Análisis de Aislamiento por Distancia

En la prueba de Mantel, tanto con la matriz de  $F_{ST}$  como con los estadísticos  $D'Jost$ , la correlación de las distancias genéticas y geográficas resultan carentes de significancia estadística ( $p > 0.05$ ) (Tabla 10).

**Tabla 10.** Tabla de los resultados obtenidos en la prueba de Mantel, en la comparación de las matrices de distancias genéticas y geográficas.

	$F_{ST}$ & LOG DIST(KM)	D'JOST & LOG DIST(KM)
<b>Z</b>	61.5070	54.6093
<b>R</b>	0.0487	-0.0192
<b>P</b>	0.250	0.636

#### 8.4.5 Tamaños efectivos poblacionales y migración

De los valores de estimación de tamaños efectivos poblacionales recientes obtenemos que el Océano Pacífico es aquel que presenta el mayor valor y el menor valor para la localidad ubicada dentro del Mar Mediterráneo. En cuanto a los valores históricos obtenidos mediante el análisis coalescente, y utilizando una tasa mutacional por generación ( $\mu$ ) de  $10^{-4}$ , en tres de los cuatro casos resultaron menores que los valores recientes, excepto para el Índico. El mayor valor lo presenta Océano Índico y el menor valor lo presenta el Océano Pacífico (Tabla 11). La tasa de migración histórica entre las cuencas oceánicas oscila entre 0.00052 ( $m_{MED \rightarrow PAC}$ ) y 0.00454 ( $m_{PAC \rightarrow ATL}$ ) (Tabla 12) (Fig. 20).

La prueba de Wilcoxon en la cual se compararon los valores  $N_e$  recientes e históricos, se encontró que hay diferencias estadísticamente significativas entre las dos comparaciones ( $w = 78, p = 0.002$ ).

**Tabla 11.** Tamaños efectivos poblacionales recientes e históricos, estimados para cada cuenca oceánica. Entre paréntesis se presenta el valor de  $\theta$ . DL: método de Desequilibrio de ligamiento. HE: método de exceso de heterocigotos.

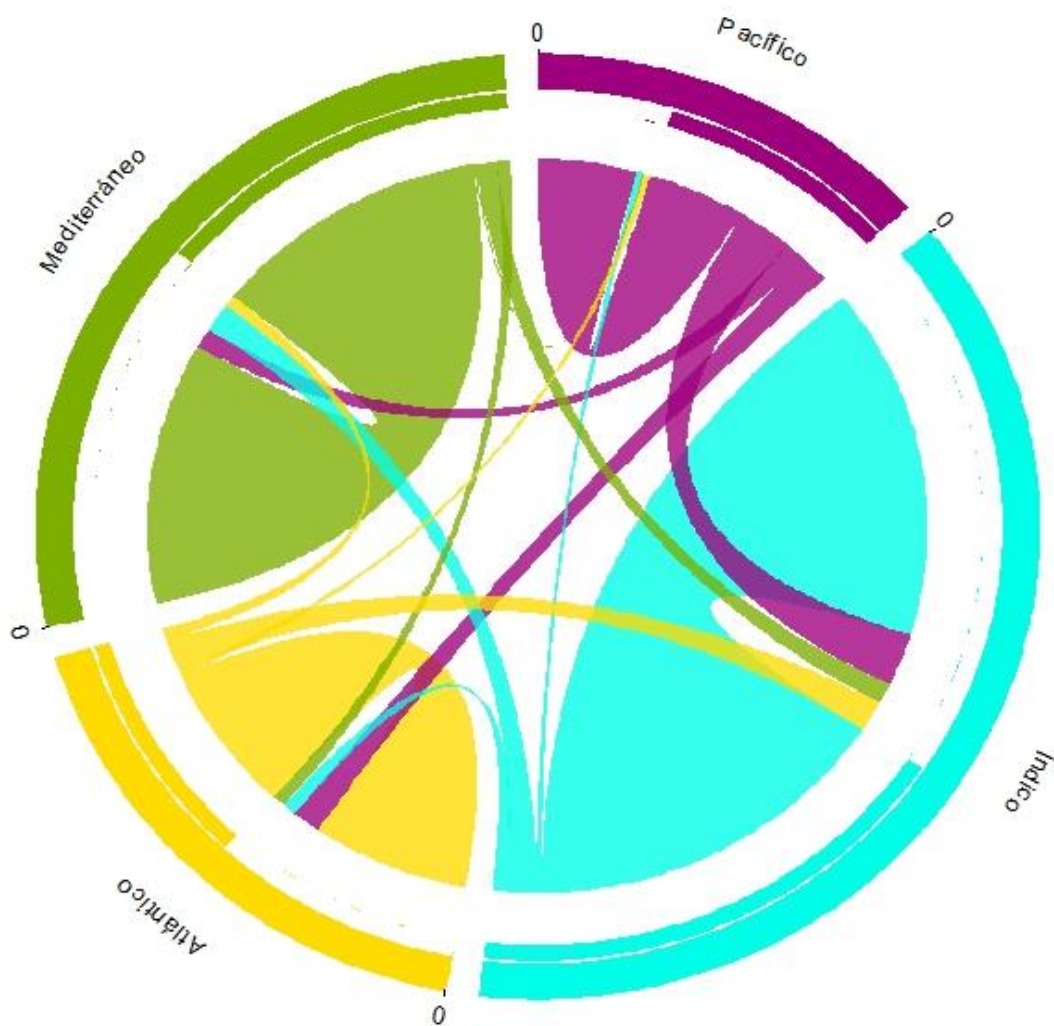
	<i>Ne reciente estimado</i>		<i>Ne histórico estimado</i>
	<b>DL</b>	<b>EH</b>	
<b>Océano Pacífico</b>	462.4	Infinito	856.9 (0.343)
<b>Océano Índico</b>	175.7	Infinito	3224.1(1.290)
<b>Océano Atlántico</b>	201.2	Infinito	2411.4 (0.964)
<b>Mar Mediterráneo</b>	88.9	Infinito	1365.7 (0.546)



**Tabla 12.** Matriz bidireccional de los valores de tasa de migración  $m$  calculados para cada cuenca oceánica

		Destino			
		Pacífico	Índico	Atlántico	Mediterráneo
Origen	Pacífico		0.0037537	0.0045395	0.0019164
	Índico	0.0014477		0.0022029	0.0026978
	Atlántico	0.0015793	0.0022155		0.0011107
	Mediterráneo	0.000518	0.0014804	0.0020643	

**Fig. 20.** Gráfico circular del flujo de migrantes entre cuencas oceánicas, a partir de los datos de  $4Nm$  calculados con el software MIGRATE.



## IX. DISCUSIÓN

El análisis de los 24 *loci* microsatelitales en localidades provenientes de las tres principales cuencas oceánicas y el Mar Mediterráneo ha permitido ilustrar la estructura genética del dorado, la cual no se había podido elucidar en estudios previos. Lo anterior corrobora que la ampliación del número de marcadores moleculares permite una resolución más fina en cuanto a los patrones genéticos presentes en las poblaciones de la especie y por lo tanto brinda mayor información sobre los posibles *stocks* que presenta el recurso en el rango de distribución y las características de los mismos.

En el presente trabajo se abordaron dos tipos de metodologías para el aislamiento de *loci* especie específicos para *C. hippurus* y como era de esperar, es evidente que el uso de nuevas tecnologías como lo es la secuenciación de nueva generación, permite que la obtención de secuencias genómicas para el descubrimiento y genotipificación de marcadores moleculares en especies no modelo, sea mucho más eficiente (Davey *et al.*, 2011). Existen diferencias importantes en el tiempo y trabajo invertido entre cada técnica, el cuál para los métodos tradicionales significa meses de esfuerzo, especial cuidado y estandarización en los pasos de ligación al vector y clonación, adicionalmente de la manipulación de las células. Lo anterior se ve reflejado en las diferencias en el número resultante de *loci* polimórficos que fueron incluidos en éste estudio. El cual representó para la técnica de clonación el 1.37% (se utilizó 1 *locus* de 73 que fueron secuenciados) y el 69.23% para la técnica NGS (se utilizaron 18 *loci* de 26 que fueron sintetizados). Las tecnologías NGS permiten una eficiente identificación de un amplio número de *loci* microsatelitales por una fracción del costo y esfuerzo comparado con las aproximaciones tradicionales, lo cual la convierte actualmente en la opción más fácil y ampliamente usada para aislar éste tipo de marcadores (Zalapa *et al.*, 2012)

### 9.1 Diversidad Genética

Neff & Gross (2001) en un estudio de regiones microsatelitales di-nucleótidos conteniendo el motivo AC, las cuales representaron el 63% de los *loci* observados mediante NGS en el presente estudio, argumentan que en peces las regiones microsatelitales tienden a ser largas (muchas repeticiones) y presentar un alto número de alelos, más que en cualquier otra clase de organismos. Esto posiblemente asociado a que la longitud de un microsatélite es un factor con una importante influencia en la tasa de mutación del mismo. Lo anterior es consistente



con lo observado en el presente estudio, ya que los *loci* con mayor número de alelos en general presentaban más de 10 repeticiones (ej., Chi368 y Chi688). Gracias a lo anterior y a que se incluyeron marcadores nucleares ampliamente variables tipo microsatélite tanto dinucleotídicos como tetranucleotídicos, se obtuvo alto rango en el número de alelos por *loci*, con valores desde 11 hasta 60 alelos. El número promedio de alelos para marcadores dinucleótidos resultó de 18.6 y para marcadores tetra-nucleótidos fue de 20.1, sin embargo se debe tener en cuenta que éste último promedio está afectado por dos *loci* que presentaron más de cincuenta alelos.

Los parámetros de heterocigosidad observada y esperada calculados, resultaron en promedio más bajos para los reportados anteriormente para la especie (Tripp-Valdez *et al.*, 2010) pero similares a otras especies de hábitos pelágicos y amplia distribución como el atún patudo y el atún aleta azul (Appleyard *et al.*, 2001; Carlsson *et al.*, 2004; Gonzales *et al.*, 2005). La mayoría de las pruebas que presentaron desviación al Equilibrio de Hardy-Weinberg fue por un déficit de heterocigotos, no obstante, similares resultados se han encontrado en otras especie pelágicas (Appleyard *et al.*, 2001; Carlsson *et al.*, 2004; Kotoulas *et al.*, 2006; Díaz-Jaimes & Uribe-Alcocer, 2006; Gonzales *et al.*, 2008) y son atribuidos además de la presencia de alelos nulos, a una posible subestructura poblacional (Kotoulas *et al.*, 2006), o a sesgos en el muestreo de alelos debido a la sobre representación de algunos de estos, cuando el muestreo es de individuos cercanamente emparentados.

El efecto Wahlund (Wahlund, 1928) se define como la reducción en la heterocigosis debido a una mezcla de individuos de diferentes fuentes genéticamente diferentes. La mayoría de poblaciones naturales se desvían en cierto grado de la condición ideal de apareamiento aleatorio en aquellas especies cuyo rango de distribución excede la distancia que recorre un individuo en su período de vida por lo cual, en algunos casos, es improbable que el entrecruzamiento sea totalmente aleatorio. Por lo anterior, una especie con migración restringida puede presentar más homocigotos de los esperados bajo la suposición de apareamiento al azar, condición conocida como efecto Wahlund. Este efecto, en peces pelágicos, ha sido asociado a áreas de desove o crianza como se ha reportado en *Thunnus obesus*, *Thunnus thynnus* y *Negaprion brevirostris* (Gonzales *et al.*, 2008; Carlsson *et al.*, 2004; Feldheim *et al.*, 2001).

Hay algunas evidencias que nos indican que esta hipótesis no es plausible para el caso del dorado. Primero, porque no se observa congruencia entre todos los *loci* para los casos de las localidades en donde se reportó un déficit significativo de heterocigotos, por lo cual no se



pueden atribuir estos resultados al sistema de apareamiento (endogamia) ni a una posible subestructuración poblacional que origina un efecto Wahlund. Y segundo, aunque se han identificado áreas de mayor actividad de desove asociadas principalmente a la estación del año en coincidencia con los picos de máxima captura (estacionalidad del recurso) (Alejo-Plata *et al.*, 2011; Zuñiga- Flores *et al.*, 2008); también existe evidencia de un desove continuo por largos períodos (Oxenford, 1999), lo cual ha atribuido al recurso una estrategia reproductiva asincrónica con alta fecundidad (Alejo-Plata *et al.*, 2011). Por lo anterior, aunque se han mencionado la posible fidelidad a sitios de agregación y/ alimentación (Kingsford & Defries, 1999), no se tiene la evidencia para indicar la existencia de áreas de desove para el dorado, las cuales en términos poblacionales en caso de existir causarían una segregación genética, como ha sido reportado en otras especies (*Thunnus obesus*, *Thunnus thynnus* y *Negaprion brevirostris*), cuyo déficit de heterocigotos ha sido atribuido a un efecto Wahlund.

Por otro lado, Hedgecock (1994a), sugirió que en algunos organismos marinos, incluidos los peces, pueden existir tasas de fecundidad altas y tasas de mortalidad altas en etapas tempranas del ciclo de vida, sugiriendo también que para un año dado la mayoría de los jóvenes reclutados pueden descender de un número reducido de progenitores debido a una sobrevivencia diferenciada de gametos y/o larvas resultado de diferencias en las condiciones oceanográficas y de nutrientes, entre zonas próximas. Lo anterior propicia que las poblaciones no se dispersen en el ambiente marino de forma aleatoria, por tanto no hay una co-ocurrencia en espacio y tiempo de individuos relacionados. Bajo este escenario, es necesario recalcar que los fenotipos favorecidos en el ambiente marino pueden variar frecuentemente entre generaciones (Waples, 2002), lo anterior explicado porque los procesos oceanográficos y las condiciones que afectan la reproducción de animales marinos varían no solamente entre años sino también dentro y entre estaciones (Hedgecock, 1994b).

Considerando el comportamiento gregario del dorado, y a que tiende a formar cardúmenes de individuos de la misma clase de edad, es posible que la estructura de la especie sea espacial y temporalmente más compleja, haciendo posible la ocurrencia de diferencias en las frecuencias alélicas entre cohortes. Alejo-Plata y colaboradores (2011) sugieren la presencia de grupos de diferentes tamaños que se acercan a la costa en diferentes épocas del año asociada a una migración pre-desove, hipótesis que ha sido propuesta por otros autores (Kraul, 1999). Considerando, que el muestreo del presente proyecto, aunque ocupa una escala espacial representativa de la distribución de la especie, puede presentar éste tipo de sesgos en



los datos ya que el muestreo es temporalmente asimétrico, podríamos concluir que el alto número de desviaciones al Equilibrio H-W que presenta el set de datos puede ser resultado de un efecto de sub-estructuración ocasionado por el muestreo de diferentes cohortes temporales asociadas a una variación en el éxito reproductivo, el cual simula un efecto Wahlund.

## 9.2 Estructura poblacional

Estudios recientes indican que algunos teleósteos marinos y elasmobranquios, pueden presentar una estructuración genética más pronunciada que la que se espera en especies de distribución cosmopolita (Graves, 1998; Hueter *et al.*, 2004). El patrón de estructuración genética más relevante obtenido en el presente proyecto es el que indica que existe una diferenciación en la distribución de las frecuencias genéticas a nivel de cuencas oceánicas, principalmente entre las cuencas del Atlántico, Pacífico y Mediterráneo, siendo el Océano Índico en algún grado similar a las demás cuencas.

Para realizar una comparación de los resultados de diferenciación obtenidos con el ADNmt y los marcadores microsatelitales aquí aplicados, se realizó un análisis similar al reportado por Díaz-Jaimes *et al.* (2010) en donde estima los estadísticos de diferenciación de acuerdo a márgenes continentales. Sin embargo, la comparación de la estructura genética de los diferentes estudios debe hacerse con base en aquellos estadísticos que no dependan de la variación genética dentro de las poblaciones (Meirmans, 2006). Es por lo anterior que para este fin se decidió utilizar el estadístico  $D'_{jost}$  (Tabla 13).

Las diferencias detectadas entre las márgenes de las cuencas oceánicas con microsatélites, resultan en cierta medida consistentes con los resultados del análisis mitocondrial (Díaz-Jaimes *et al.*, 2010). A excepción que en el caso de los microsatélites encontramos que las muestras provenientes del Índico occidental (SE y RE) no resultan diferentes de las muestras provenientes del Atlántico Oriental (SA y DK) y ambas ampliamente divergentes del resto de regiones. Se debe resaltar, que dicho patrón no se observa en el ADNmt posiblemente a que en éste la localidad de Seychelles no fue incluida, y es aquella que muestra la mayor señal de diferenciación dentro de la cuenca oceánica (Fig. 19).



**Tabla 13.** Valores de diferenciación genética de acuerdo a las márgenes continentales. Bajo la diagonal se presentan los valores de  $\Phi_{ST}$  obtenidos por Diaz-Jaimes *et al.* (2010) para el gen mitocondrial ND2, señalando en negrita aquellos valores que resultaron significativos ( $p \leq 0.025$ ). Sobre la diagonal se presentan los valores de  $D'_{Jost}$  obtenidos para los marcadores microsatelitales, señalando en negrita los valores que resultaron significativos después de Bonferroni ( $p \leq 0.006$ ).

	P-OCC	P-C	P-OR	A-OCC	A-OR	I-OCC	I-OR	MED
P-OCC		0.0027	0.0207	0.0217	<b>0.1169</b>	<b>0.0837</b>	0.0203	<b>0.0425</b>
P-C	0.009		0.0182	0.008	<b>0.0954</b>	<b>0.0694</b>	0.028	<b>0.0441</b>
P-OR	-0.002	<b>0.017</b>		<b>0.0217</b>	<b>0.0923</b>	<b>0.0779</b>	0.0294	<b>0.0427</b>
A-OCC	-0.002	0.015	-0.001		<b>0.109</b>	<b>0.0847</b>	0.0177	<b>0.0482</b>
A-OR	<b>0.033</b>	0.004	<b>0.033</b>	<b>0.025</b>		0.046	<b>0.0993</b>	<b>0.0752</b>
I-OCC	-0.005	0.016	-0.001	-0.003	<b>0.027</b>		<b>0.1108</b>	<b>0.0823</b>
I-OR	0.005	-0.003	0.004	0.003	-0.001	0.002		<b>0.032</b>
MED	<b>0.560</b>	<b>0.517</b>	<b>0.545</b>	<b>0.561</b>	<b>0.466</b>	<b>0.571</b>	<b>0.533</b>	

En detalle, el patrón de estructuración que sugiere los marcadores nucleares en conjunto con los marcadores mitocondriales a nivel global es el siguiente. De la Tabla 5 podemos deducir que hay dos barreras importantes, la primera se refiere a aquella que separa el Mar Mediterráneo del Océano Atlántico (y el resto de cuencas oceánicas) y la segunda se refiere a la masa continental americana que separa el Océano Pacífico y Atlántico, gracias al completo aislamiento facilitado por la emergencia del Istmo de Panamá.

Las huellas de los procesos históricos que han separado el Indo-Pacífico del Atlántico se reflejan en el análisis mitocondrial de varias especies pelágicas de amplia distribución (Chow & Ushiana, 1995; Graves & McDowell, 1995; Heist *et al.*, 1996; Buonaccorsi *et al.*, 2001; Graves & McDowell, 2003; Viñas *et al.*, 2004; Alvarado-Bremer *et al.*, 1998, Durand *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2005; Martinez *et al.*, 2006; Duncan *et al.*, 2006; Keeney & Heist, 2006; Castro *et al.*, 2007). Lo particular es que, para algunas de estas especies, la señal de divergencia se sigue obteniendo en el análisis de marcadores de mayor tasa evolutiva que reflejan patrones contemporáneos como los microsatélites (Buonaccorsi *et al.*, 2001; Graves & McDowell, 2003; Keeney & Heist, 2006), lo que indica que para estas especies, al igual que en el dorado, siguen existiendo barreras que promueven dicha divergencia.

Pero además de lo anterior, hay un patrón de estructuración relacionado con el Océano Índico interesante y que se aprecia gracias a los estimados de divergencia obtenidos dentro de cuencas oceánicas (Tablas 8 y 9), los estimados de divergencia mitocondriales y nucleares de las agrupaciones a partir de márgenes continentales (Tabla 13) y de la visualización de las

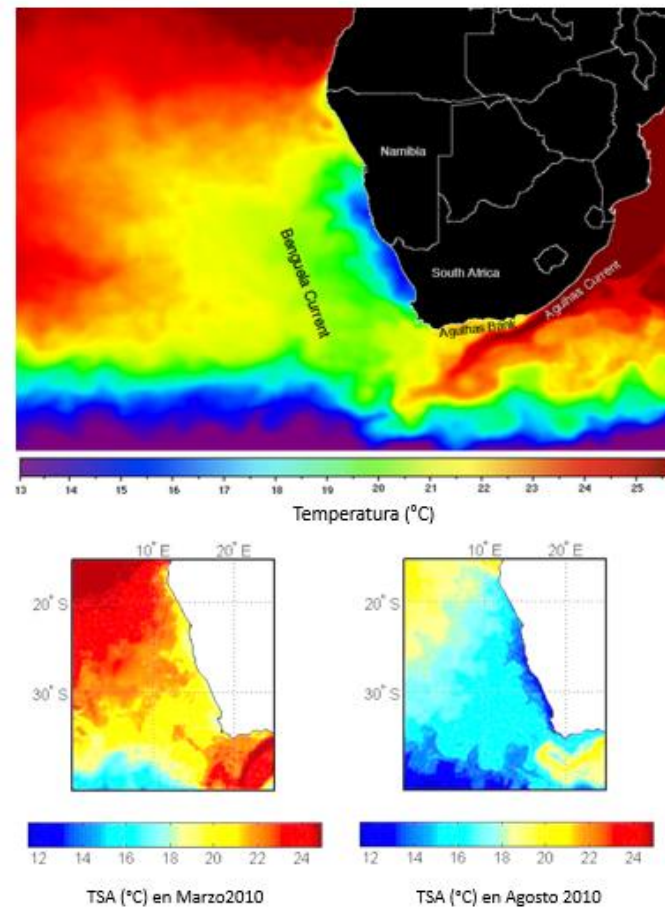




barreras obtenidas a partir de los estimados de divergencia (Fig. 15). Este patrón sugiere que las muestras provenientes de la región oriental del Océano Atlántico y la región occidental del Océano Índico forman una población, la cual es divergente del resto de regiones.

Lo anterior significa, que el contacto secundario entre individuos de diferentes cuencas a través del Cabo de Buena Esperanza ha sido extensivo pero regional, y repercute en el patrón de estructura poblacional de la especie. Desde una perspectiva oceanográfica, en el Océano Índico la corriente sur ecuatorial se bifurca en la corriente de Mozambique y la corriente del este de Madagascar, éstas corrientes se unen en el sur de Madagascar y alimentan a la corriente de Agulhas que se dirige al oeste. Una buena parte de ésta corriente se une a la corriente sur del Océano Índico y otra parte se transforma en la corriente cálida de Agulhas que rodea el Cabo de Buena Esperanza, por donde potencialmente se podrían dispersar aquellas especies con preferencia de aguas cálidas. Más adelante, esta corriente se incorpora en el sur este del Atlántico a la corriente fría de Benguela en forma de anillos y eddies (Tomczak & Godfrey, 1994), cuya temperatura y características de velocidad y dirección pueden estar limitando el establecimiento de adultos y subadultos de la especie en el Océano Atlántico. Sin embargo, esta limitación puede ser ampliamente estacional ya que la temperatura superficial del agua (TSA) en la corriente de Benguela es afectada a lo largo del año por advección, probablemente por la extensión de la Corriente de Agulhas (Fig. 21), temporada en los cuales individuos de la especie, ayudados por las dirección y magnitud de la corriente así como de las temperaturas de la misma ( $>20^{\circ}\text{C}$ ) se pueden estar incorporando en el Atlántico oriental. Lo anterior es soportado por investigaciones en la especie que asocian los hábitos migratorios de la especie con fenómenos oceanográficos como corrientes y giros (Merten *et al.*, 2014a).





**Fig. 21.** Transporte de aguas cálidas de la corriente de Agulhas hacia la corriente de Benguela y estacionalidad de la TSA de la misma. (Modificado de: Gyory *et al.*, 2013)

Las diferencias dentro del Océano Atlántico llevan a evaluar los aspectos de la historia de vida de la especie que pueden explicar dicho patrón. *C. hippurus* exhibe un hábito “hogareño” y de migración limitada (no superiores a los 2000km), con una sensibilidad espacial fuerte de la distribución de los organismos a la temperatura superficial del agua (Kingsford & Defries, 1999; Rocha-Olivares *et al.*, 2006; Farrell, 2013; Merten *et al.*, 2014a; Merten *et al.*, 2014b). Lo anterior, aunado con el rápido crecimiento que presenta la especie, en donde un juvenil de 16.5 cm puede desarrollarse en 50 días (Massutí *et al.*, 1999; Rocha-Olivares *et al.*, 2006), llevan a suponer que la homogenización de las frecuencias genéticas globales gracias a la apertura del pasaje en el sur de África es un proceso más complejo y tardío.



### 9.2.1 Barreras Biogeográficas

La distribución cosmopolita de *C. hippurus* cruza barreras biogeográficas bien documentadas que incluye montañas submarinas, archipiélagos de coral, ambientes pelágicos, entre otros. La diferenciación poblacional detectada en el presente estudio puede ser debida a la dificultad de mantener el flujo génico a una escala global.

Ciertas barreras biogeográficas merecen particular atención en el presente estudio. La primera, se refiere al surgimiento del Istmo de Panamá (Alvarado-Bremer *et al.*, 1998; Graves & McDowell, 2003; Viñas *et al.*, 2004) que separa las cuencas del Atlántico y del Pacífico. Tradicionalmente se hablaba que dicha barrera surgió hace más de 3 millones de años (Cronin & Dowsett, 1996), sin embargo estudios recientes sugieren un origen más temprano de hace aproximadamente 13-15 Ma (Montes *et al.*, 2015). En dicho proceso Panamá emergió para completar la fusión de los continentes de Norte, Centro y Sur América. Lo que ocasionó que la conexión marina en el Océano Pacífico y el Mar Caribe fuese interrumpida y que claramente significa una anulación del flujo génico entre ambas cuencas haciendo que las poblaciones de ambos lados evolucionen independientemente. Este proceso que modificó la salinidad del Mar Caribe y afectó los patrones de circulación oceánica y clima, repercutió en gran cantidad de especies marinas incluyendo el dorado, permitiendo así que pese a sus grandes tamaños efectivos poblacionales, la ausencia de flujo génico originará una evolución independiente de los linajes.

La segunda se refiere al estrecho de Gibraltar que separa al Mar Mediterráneo del Océano Atlántico y que también ha sido evidenciada como barrera al flujo génico en otras especies pelágicas como el pez espada (Kotoulas *et al.*, 1995), el atún aleta azul (Carlsson *et al.*, 2004), la albacora (Viñas *et al.*, 2004), el delfín listado (García-Martínez *et al.*, 1999) e incluso en tortugas (Bowen *et al.*, 1993) y que discute detalladamente en la siguiente sección.

Y por último, otro importante proceso vicariante que ha originado una interrupción del flujo genético entre las cuencas del Atlántico y el Índico se refiere a la máxima glaciación del Pleistoceno que provocó una barrera al flujo génico entre las poblaciones del Atlántico y el Indo-Pacífico a través del Cabo de Buena Esperanza en el Sur de África debido a las bajas temperaturas del agua en los períodos glaciares y cuyo registro ha sido detectado en otras especies como atunes e istiofóridos (Alvarado-Bremer *et al.*, 1998; Graves & McDowell, 2003). Ésta separación pudo haber originado poblaciones asociadas a relictos glaciales las cuales divergieron del resto, pero gracias al flujo de migrantes ocurrido durante los períodos



interglaciales del Pleistoceno dichas diferencias se han minimizado, principalmente en el margen continental que corresponde al cono africano.

### 9.2.2 El aislamiento del Mar Mediterráneo

El Mar Mediterráneo es una cuenca semi-cerrada que consiste de dos sistemas parcialmente aislados (este-oeste) conectados por el Estrecho de Sicilia y el Estrecho de Messina (Robinson, 2001). Más de 8500 especies de organismos macroscópicos se han reportado para esta cuenca (Longhurst, 1998; Bianchi & Morri 2000), representando entre el 4% y el 18% de la biodiversidad marina global en una cuenca que tan solo representa el 0.82% de la superficie marina y el 0.32% del volumen de los océanos del mundo (Patarnello *et al.*, 2007). Adicionalmente, más de un cuarto de las especies marinas son endémicas del Mediterráneo (Tortonese, 1985).

Esta alta biodiversidad ha sido atribuida a la compleja historia geológica del Mediterráneo. En los últimos millones de años, el Mar Mediterráneo ha estado casi en completa sequía, durante la “Crisis Salina del Messiniense” (CSM) en el Mioceno, hace aproximadamente 5.33 Ma (Hsü *et al.*, 1973; Krijgsman *et al.*, 1999); de igual forma, la cuenca ha sido afectada por los períodos glaciales fríos seguidos de períodos cálidos del Cuaternario (~3Ma) (Patarnello *et al.*, 2007) (Fig. 22). La biota presente hoy en día es principalmente el resultado de procesos de colonización mayormente desde el Océano Atlántico (Almada *et al.*, 2001; Domingues *et al.* 2005) y en menor medida desde el Mar Rojo. De hecho, después del período de aislamiento y el período de desecación que duró alrededor de 0.5 Ma, la re-inundación de la cuenca del Mediterráneo fue posible gracias al flujo de aguas del Atlántico a través del recién abierto Estrecho de Gibraltar.

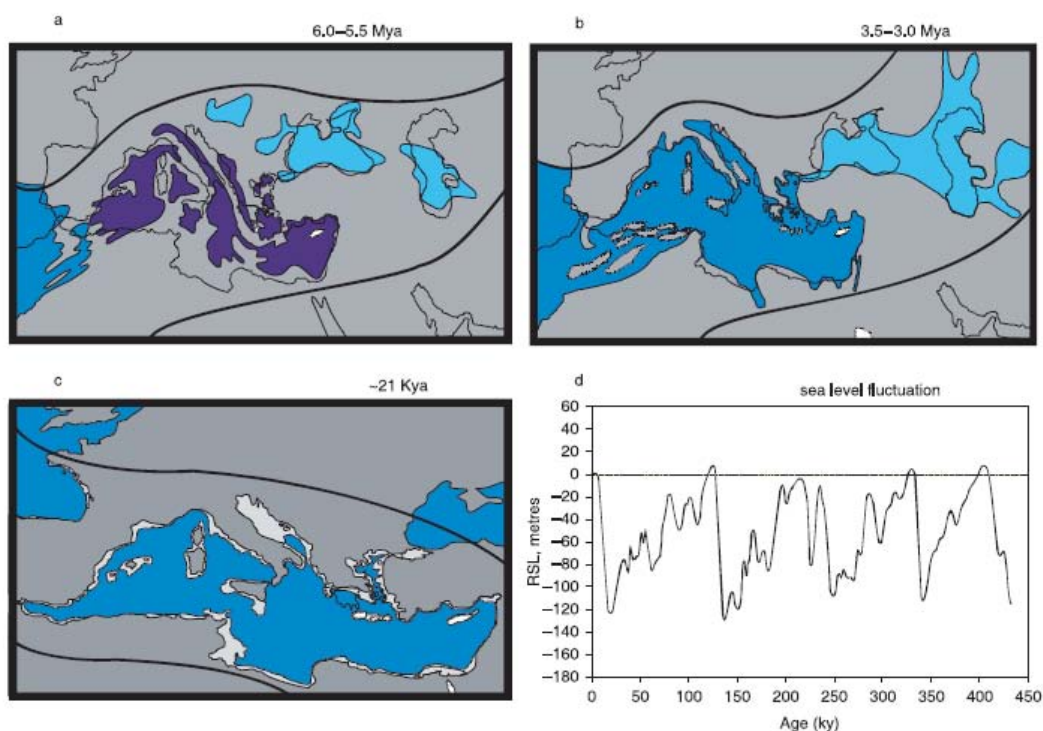
Para *C. hippurus*, Pla & Pujolar (1999) no encontraron diferencias en las frecuencias genéticas de aloenzimas dentro de la cuenca del Mediterráneo. Sin embargo, Diaz-Jaimes *et al.* (2010) en el análisis del gen mitocondrial ND2, al igual que en el presente proyecto, encontraron una señal de divergencia importante de esta cuenca con respecto a los demás Océanos, presentando los valores más altos de diferenciación ( $\Phi_{ST} \geq 0.47$ ,  $F_{ST} \geq 0.058$ , respectivamente). Esto sugiere un nivel notablemente bajo o incluso nulo de flujo génico entre los individuos que allí habitan y las poblaciones externas, que pudo haber sido fuertemente influenciado por procesos vicariantes y oceanográficos e hidrográficos que han



podido repercutir de forma importante sobre la conectividad de las poblaciones (Cowen *et al.*, 2000; Werner *et al.*, 2007).

En primera instancia, las glaciaciones del Pleistoceno que pudieron haber fomentado de forma importante la segregación poblacional. Y en segundo, ciertas características oceanográficas de la cuenca como la circulación superficial, la cual es dominada por giros ciclónicos de gran escala permanentes que pueden estar actuando como supresores del movimiento de larvas y adultos, ya que se sabe que para la especie existe una gran asociación entre la dispersión y/o reclutamiento de individuos y las características oceanográficas, promoviendo o limitando los movimientos a lo largo del rango de distribución (Merten *et al.*, 2014a).

Los altos niveles de subdivisión poblacional entre muestras del Mar Mediterráneo y del Océano Atlántico parece soportar la hipótesis de que el Estrecho de Gibraltar actúa como una barrera parcial a la dispersión en especies tales como *Engraulis encrasicolus* (Bembo *et al.* 1996), *Platichthys* spp. (Borsa *et al.* 1997), *Mytilus galloprovincialis* (Quesada *et al.* 1995), *Xiphias gladius* (Alvarado-Bremer *et al.*, 1995), y *Sarda sarda* (Viñas *et al.*, 2010).



**Fig. 22.** Paneles a, b y c mapas paleo-oceanográfico del Mar Mediterráneo y regiones adyacentes a través del tiempo, algunas líneas costeras actuales se dibujaron como referencia. Gris indica



extensiones de tierra, azul claro indica aguas de baja salinidad, azul oscuro regiones hiper-salinas. Panel d Fluctuaciones en el nivel del Mar durante el Pleistoceno. (Tomado de: Patarnello, 2007).

La colonización del Mar Mediterráneo desde el océano Atlántico se cree ocurrió en el Pleistoceno (Peres, 1985) y desde entonces la dispersión entre los dos cuerpos de agua ha sido intermitentemente restringida, durante las glaciaciones del Cuaternario cuando los bajos niveles de mar resultaron en un estrechamiento o cerramiento total del Estrecho de Gibraltar (Maldonado, 1985). Después de los dramáticos eventos de la CSM, el nivel del mar varió regularmente durante el Plioceno y el Pleistoceno. Los niveles mínimos fueron hace 140 000 años (-130m) y 30 000 años (-120m), lo cual repercutió en la topografía de la cuenca y en los regímenes de flujo de aguas en el Mar Mediterráneo y el Océano Atlántico (Patarnello *et al.*, 2007), especialmente cuando se considera que hoy en día la cuenca tiene una profundidad de 286 m.

### 9.2.3 Divergencia al interior de cuencas oceánicas

Como se observa en el análisis de diferenciación dentro de las cuencas oceánicas, existen ciertas localidades significativamente diferentes de otras. Sin embargo, el patrón observado no corresponde a márgenes continentales, excepto para el Océano Atlántico.

Dentro del Océano Pacífico, la localidad de Bahía Magdalena es aquella que representa una diferencia tanto en el análisis con los estadísticos  $D'Jost$  como en el análisis con los estadísticos  $F_{ST}$  ( $F_{ST} \geq 0.10$ ). Seguida por las localidades de Ecuador y Perú cuando se toma en cuenta las pruebas significativas para el estadístico  $D'Jost$ .

Estas localidades significativamente diferentes dentro del Océano Pacífico, incluso con respecto a localidades del mismo margen continental, están en los límites de la distribución de la especie dentro del Océano Pacífico Oriental. Los límites de la distribución de *C. hippurus* en el Océano Pacífico Oriental, hace parte de las grandes regiones de límites de corrientes orientales del Océano mundial, presentando zonas de mezcla de aguas tropicales y templadas. En el norte, la Corriente de California y en el Sur la Corriente Peruana que es una extensión de la Corriente de Humboldt (Bakun & Nelson, 1991). Bahía Magdalena (BM), es el área considerada como el límite sur de la zona de transición entre aguas subárticas y subtropicales en el Océano Pacífico Nor-Oriental (Zaitsev *et al.*, 2014).



Se debe tener en cuenta que los patrones genéticos contemporáneos pueden reflejar, no sólo la acción de fuerzas externas, sino también en algunos casos patrones de recolonización (Hewitt, 2004). Si estos eventos de colonización ocurren simplemente por una expansión en el rango de distribución, puede ocurrir diferenciación genética ya que las nuevas mutaciones que se originen en el límite de la onda de expansión contienen frecuencias mucho más altas que en poblaciones estacionarias, un proceso conocido como navegación de genes o en inglés *gene surfing* (Edmonds *et al.*, 2004; Hallatschek & Nelson, 2008).

Norton (1999) sugiere una expansión del hábitat en *C. hippurus* hacia el Norte de la distribución en el Océano Pacífico Oriental, la cual coincide con el incremento de la temperatura oceánica y un cambio en la ciclogénesis, el cual origina una disminución de los sistemas de surgencia en la costa norte Mexicana. Por lo anterior, es posible que la señal de diferenciación obtenida en las localidades que representan el límite de la distribución en el Océano Pacífico Oriental se puede atribuir a un efecto de *gene surfing* asociada a una expansión poblacional.

La similitud del resto de localidades dentro del Océano Pacífico, ha sido reportada en otros estudios, todos éstos concuerdan al concluir que no hay una señal de estructura o divergencia entre/dentro de localidades del Océano Pacífico (Díaz-Jaimes *et al.*, 2006; Díaz-Jaimes *et al.*, 2010; Tripp-Váldez *et al.*, 2010) y cuyos resultados son atribuidos a alta actividad migratoria y capacidad reproductiva, además de grandes tamaños efectivos poblacionales que mitigan el efecto de la deriva genética. Resultados similares han sido reportados para el mismo Océano en especies pelágicas semejantes como lo son el Marlín Azul *Makaira mazara*, Marlín Negro *Makaira indica* (Graves & McDowell, 2003), Patudo *Thunnus obesus* (Gonzalez *et al.*, 2008) Atún aleta amarilla *Thunnus albacares* y Atún bonito *Katsuwonus pelamis* (Ely *et al.*, 2005)

Para la cuenca del Océano Atlántico las principales diferencias se localizan en la población de Dakar, Senegal, y el Sur de África, en el Atlántico Este, con respecto a las demás localidades, tomando en cuenta los estadísticos  $D'Jost (\geq 0.047, p \leq 0.002)$  y como se observa en el análisis Bayesiano. Dichas diferencias entre el Atlántico Este y Oeste también han sido encontradas en el análisis del gen mitocondrial ND2 (Díaz-Jaimes *et al.*, 2010) y es un patrón también hallado en otras especies de hábito similar como atún aleta azul (Carlsson *et al.*, 2007), pez espada (Alvarado-Bremer *et al.*, 2005) y el marlín azul (Buonaccorsi *et al.*, 1999) los cuales se han atribuido principalmente a la existencia de áreas de desove. No obstante, no existen reportes de áreas específicas de reproducción para el dorado en alguna región en



específico dentro de su ámbito de distribución, por lo que eventualmente estos resultados estarían sugiriendo, como se mencionó anteriormente, que en el dorado la dispersión transoceánica, por lo menos en el Océano Atlántico, es limitada.

Es necesario resaltar que el análisis genético del Atlántico Oeste no arrojan diferencias genéticas de las localidades ubicadas en éste margen continental, resultados similares a los reportados en los estudios con los genes mitocondriales citocromo *b* y ND2 (Cruz-Bastida, 2009; Díaz-Jaimes *et al.*, 2010), en los cuales no se detecta diferenciación genética, pese a que estudios sobre la biología de la especie y el análisis molecular del marcador IDH-2, indican la presencia de una estructura en *stock* compleja que se sugiere es el resultado de dos grupos localizados al norte y al sur del Mar Caribe (Oxenford & Hunte, 1986; Oxenford, 1999; Merten *et al.*, 2014b). Por otro lado, investigaciones sobre los rasgos reproductivos y tasas de crecimiento de individuos capturados en la costa norte y sur de Puerto Rico no arrojaron diferencias (Perez *et al.*, 1992; Rivera-Betancourt, 1994) pese a que la presencia de dos posibles *stocks* ha sido sugerida a partir de los datos de picos de abundancia y tamaño (Perez & Sandovy, 1991).

Lo anterior sugiere que los reportes donde se registran diferencias en el Atlántico Occidental Central deben ser examinados con detalle. En caso de que la existencia de diferentes circuitos de migración concurren en la región, la falta de diferenciación genética puede sugerir que estos gracias a la amplia variación espacial y temporalmente (Merten *et al.*, 2014b) sumado a las características biológicas de la especie como desove continuo, rápido crecimiento, entre otras, puede estar homogenizando genéticamente dichos circuitos.

Lo anterior, es soportado por los ensayo de *Caribbean Regional Fisheries Mechanism*. En el 2006, se condujo dos análisis, uno reconociendo un *stock* norte y un *stock* sur, y otro combinando los dos. Asumiendo estos dos escenarios y haciendo un monitoreo de la pesca en la región, la conclusión general es que no hubo cambio en las unidades de esfuerzo de captura en ninguno de los dos experimentos, por lo que no existen indicios de diferenciación, pero en donde se resalta la necesidad de que los países generen datos sobre los *stocks*. En 2010, la evaluación de los *stocks* a partir de datos provenientes del Caribe, Venezuela, Brasil, y la costa de los Estados Unidos soporta la hipótesis de movimientos de migración desde el Norte de Brasil hacia el Caribe Oriental (Collette *et al.*, 2011), apoyando la hipótesis de conectividad genética entre grupos migratorios del Atlántico, Golfo de México y Caribe.





En Brasil se sugiere la presencia de por lo menos dos *stocks*, uno en el Norte el cuál es compartido con el Caribe y otro en el Noroeste, el cual puede estar completamente explotado (Lessa *et al.*, 2009, Duarte-Neto *et al.*, 2008). Sin embargo, en el presente estudio no fueron incluidas muestras provenientes de ésta región por lo cual no se puede aportar al conocimiento de dicho patrón en el Atlántico Sur Oriental.

Dentro del Océano Índico se encontraron diferencias altas y significativas ( $\geq 0.10$ ) en las comparaciones realizadas entre Islas Seychelles y las demás localidades. Lo que resulta controversial es que las diferencias son altas incluso en la comparación con la localidad cercana de Islas Reunión. Desde que se observaron dichos resultados en el presente estudio, se realizó una revisión exhaustiva de la base de datos de los genotipos para descartar anomalías producto de una errónea genotipificación y revisar que la señal sea similar para todos los *loci*, la mayoría de *loci* se encontraron bajo equilibrio H-W y no fueron encontradas incongruencias en la base de datos. Dicha señal, como se menciona en la sección anterior, puede estar relacionada a procesos oceanográficos y ecológicos que han derivado en una población asociada al cono Sur Africano desde el Atlántico Este hacia el Indico Oeste, facilitada por la corriente de Agulhas.

### 9.3 Tamaño efectivo poblacional y flujo génico

La diversidad genética depende del tamaño efectivo de la población  $N_e$  (Wright, 1951), y éste se define como el tamaño de una población ideal con tasas de cambio genético aleatorio en el tiempo como las observadas en la población real (Crow & Kimura, 1970). Este estimado provee información tanto de cambios evolutivos como de diferencias ecológicas entre poblaciones ideales.

Se encontraron diferencias significativas entre los estimados históricos y recientes (método de Desequilibrio de ligamiento) de los tamaños efectivos poblacionales, lo cual es un indicador de inestabilidad demográfica de las poblaciones. Los valores calculados recientes resultan, en general, mucho más pequeños que los estimados históricos, lo cual podría sugerir procesos de disminución poblacional en todas las cuencas oceánicas en las últimas generaciones. Sin embargo, estos datos deben ser interpretados con cautela ya que no existen registros científicos que soporten esta hipótesis, así como el método de exceso de heterocigotos sugiere que los tamaños poblacionales son excesivamente altos (“infinitos”)

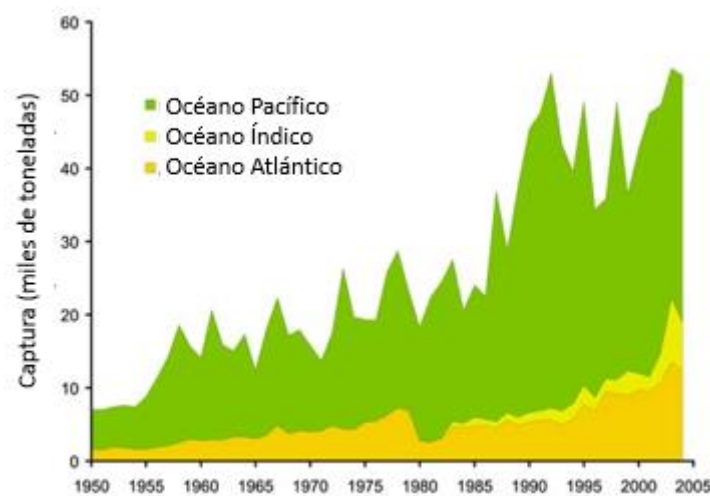


como es de esperarse en especies pelágicas de rápido crecimiento, desove constante y alta fecundidad, como el Dorado.



Los valores calculados por el método coalescente se encuentran por debajo de los estimados para la especie con cinco de los microsatélites, también utilizados en el presente estudio, en localidades del Golfo de México y aguas adyacentes, donde  $1.05 \leq \theta \leq 3.97$ , lo cual conlleva a  $N_e$  entre 2625 y 9925 (Tripp-Váldez *et al.*, 2010), pero superiores a los reportados en el estudio para las localidades ubicadas dentro de la cuenca del Pacífico (Bayona-Vásquez, 2011).

Para los estimados recientes, los mayores tamaños efectivos se encuentran en las cuencas del Pacífico e Índico, es concordante con lo reportado por los datos de captura de las pesquerías (Fig. 23). Con los datos obtenidos, se observa una marcada diferencia en las proporciones de tamaños efectivos poblacionales y los tamaños censuales ( $N_e/N$ ). Un estimado grueso de los tamaños censuales se puede obtener a partir de los datos por parte de la captura pesquera. Según la FAO, la captura anual oscila sobre las 100 mil t. Si tenemos en cuenta que el promedio de peso de cada individuo capturado es de 10kg, este estimado nos arroja tamaños censuales, provenientes sólo de la captura comercial anual de  $N = 10\,000\,000$  de individuos.



**Fig. 23.** Capturas mundiales de *C. hippurus* reportado por la FAO (Tomado de: <http://www.fao.org/docrep/009/a0653e/a0653e05.htm>).

Los valores pequeños de los tamaños efectivos poblacionales presentes para la cuenca del Mar Mediterráneo, asociado a la baja diversidad genética, los cuales también se observaron en el análisis del ADN mitocondrial, indican un aislamiento genético que resulta de eventos vicariantes, como se discute en la sección 10.2.2 pero también, y corroborado con los datos demográficos históricos, tiene que ver con procesos de cuello de botella, patrones también



encontrados en el pez espada y el atún aleta-azul (Díaz-Jaimes *et al.*, 2010; Alvarado-Bremer *et al.*, 2005).

Los sistemas biológicos reales no se adhieren a los valores ideales (Whitlock & McCauley, 1999), y por lo tanto los tamaños efectivos estimados son típicamente mucho más pequeños que los tamaños censales (Ovenden *et al.*, 2015). Éste patrón es común en peces marinos, especialmente aquellos caracterizados por altas tasas de fecundidad y altas tasas de mortalidad larvaria, pese a grandes tamaños poblacionales censales ( $N$ ) (Hauser *et al.*, 2002; Turner *et al.*, 2002; Hutchinson *et al.*, 2003; Hauser & Carvalho, 2008), presentando estimados de proporciones  $Ne/N$  en un rango entre  $10^{-3}$  y  $10^{-5}$  (por ejemplo las familias Sciaenidae, Sparidae, Serranidae, Gadidae, Pleuronectidae) (Hauser & Carvalho, 2008). Como se discutió anteriormente, el éxito reproductivo diferencial es uno de los principales factores responsables de estas bajas proporciones en peces marinos. Ya que bajo este escenario una proporción pequeña de individuos da origen a la siguiente generación lo cual incrementa la probabilidad de compartir el mismo ancestro y por lo tanto la probabilidad que dos alelos seleccionados al azar en la población sean el mismo (Hedgecock, 1994a).

La implicación ecológica de las pequeñas proporciones  $Ne/N$  es importante para el manejo de pesquerías. La idea de que tan solo unos pocos individuos desovantes son los principales contribuyentes del reclutamiento tiene un atractivo inmediato, debido a que la percepción inmediata de que otros individuos se pueden remover del hábitat sin un ocasionar un detrimento al reclutamiento. Esta noción es peligrosa, debido a que es imposible predecir que individuos serán desovantes exitosos. De hecho, parece que los desovantes exitosos tienden a ser peces grandes y viejos (Berkeley *et al.*, 2004), soportando las consideraciones en el manejo pesquero de mantener la estructura de edades de los recursos explotados.

Por otro lado, con respecto a las características reproductivas, en el dorado se ha reportado que la fecundidad está fuertemente influenciada por el tamaño del pez (Oxenford, 1999; Wu *et al.*, 2001); además, es factible que *C. hippurus* presente una variación en el éxito reproductivo, que de igual forma explica el exceso de heterocigotos observado para algunas poblaciones. Dicho comportamiento ha sido reportado para otras especies como el atún patudo *Thunnus obesus* (Gonzalez *et al.*, 2008) y *Pagrus auratus* (Hauser *et al.*, 2002).

Es importante resaltar, que el mayor  $Ne$  (método coalescente) lo presenta el Océano Índico, lo que sugiere, que al igual que para la varias especies de peces con distribución tropical, el posible origen de las poblaciones actuales de dorado se encuentre en esta cuenca. Parece que el archipiélago Indonesio es el epicentro de la evolución de la biodiversidad marina tropical



(Veron, 1995). La razón de los altos niveles de diversidad en la región Indo-Pacífica está relacionada con un largo período de estabilidad evolutiva, pero además gracias al hecho que la amplia diversidad de Islas de diferentes tamaños en el archipiélago y la historia geológica de las mismas.

En poblaciones grandes ( $N_e = 10^5$ ), 120 migrantes constituirían una tasa de migración de tan solo 0.12%. Tasas de migración entre 0.2% y 10% no serán suficientes para causar reacciones independientes de perturbación demográfica (Hastings, 1993), pero serán suficientes para oscurecer la identificación de tales poblaciones. La tasa de migración histórica reportada entre cuencas oceánicas oscila entre 0.05% ( $m_{MED \rightarrow PAC}$ ) y 0.45% ( $m_{PAC \rightarrow ATL}$ ) (Tabla 11, Fig. 20), las cuales reflejan la estructuración genética reportada en el presente trabajo.



#### 9.4 Implicaciones para el manejo y la conservación del recurso

La demanda global de pescado para el consumo humano ha crecido dramáticamente en las últimas cinco décadas, con una tasa promedio de crecimiento de 3.2% por año en el período de 1961-2009, superando el incremento del 1.7% por año de la población humana mundial (FAO, 2014). Por su parte, la comunidad científica hace un esfuerzo progresivo para hacer una evaluación *stock por stock*, guiada hacia un acercamiento integral que incluya varios componentes del ecosistema marino (Fromentin *et al.*, 2009).

El manejo de las pesquerías es hoy en día visto como necesario, tanto como para asegurar que la pesquería actual pueda continuar con la explotación como para asistir con la recuperación de los *stocks* afectados. La ciencia de la genética ha asistido al manejo de las poblaciones silvestres marinas por más de 50 años. El atractivo de las aproximaciones genéticas radica en la dificultad de observación directa de los movimientos de los organismos en el ambiente marino (Ovenden *et al.*, 2015).

La noción clásica de que los peces marinos que ocupan ambientes abiertos, poseen un alto flujo génico y tamaños poblacionales infinitos, ha cambiado recientemente. Aunque, este tipo de casos de homogeneidad genética a gran escala parecen existir (Ely *et al.*, 2005). En el presente trabajo, como en algunos otros en organismos marinos, se ha encontrado que existe subdivisión poblacional en un ambiente que se considera homogéneo. Y aunque estas diferencias genéticas son pequeñas, representan relevancia biológica. La cuál debe ser demostrada por factores ambientales y replicas espacio-temporales (Hauser *et al.*, 2008)

El pez dorado, especie catalogada por la *International Union for Conservation of Nature*-IUCN como especie de menor preocupación, es sujeto de la captura comercial y deportiva a lo largo del rango de distribución. De 2003 a 2012, las capturas globales reportadas de acuerdo a las FAO, han incrementado de 85 700 toneladas (t) a 115 010 t. Sin embargo, se debe señalar que las capturas reportadas para la especie por la FAO, por lo menos para el Atlántico Central Oriental, bajo representa la captura actual y real para la especie (Oxenford, 1999; Mahon, 1999). En el Pacífico Oriental, particularmente en Costa Rica y Ecuador, las capturas de dorado han disminuido. El Mecanismo Regional Pesquero del Caribe (CRFM, por sus siglas en inglés) reconoció la incertidumbre de la estructura de *stocks* así como el riesgo del recurso ante la carencia de un marco institucional o cuerpo regional para un manejo del recurso compartido o colaborativo (Collette *et al.*, 2011).



Este trabajo pretende ser punto de partida para que los países y entidades competentes, brinden un adecuado manejo pesquero del recurso a nivel global. El cuál a partir de la generación y escaneo de un considerable número de marcadores genéticos, se pudo develar el patrón de diferenciación de la especie en su rango de distribución. Y aunque es necesario, complementar la información genética, con información ecológica y biológica, además de hacer estudios de fina escala de los componentes adaptativos locales de las poblaciones los cuales pueden brindar herramientas más fuertes para la identificación de *stocks* en las diferentes cuencas oceánicas.



## X. Conclusiones

- La variabilidad genética presente en las poblaciones del dorado es alta, lo cual es un indicativo de la salud genética de la población.
- Se detectó una estructura genética que corresponde a la existencia de diferencias genéticas entre la cuenca del Atlántico, Pacífico y Mediterráneo, las cuales son atribuidas principalmente a la presencia de masas barreras que limitan el libre flujo genético entre las poblaciones. Similar al reportado para otras especies pelágicas ampliamente distribuidas y con características biológicas afines al dorado.
- La barrera genética más fuerte que ha moldeado las poblaciones del dorado resulta ser la que separa la cuenca del Mar Mediterráneo del Océano Atlántico.
- La población dentro del Mar Mediterráneo es aquella que presenta menor diversidad genética, traducido en un tamaño efectivo poblacional pequeño.
- Otras barreras al flujo génico para la especie coinciden con aquellas que separan las cuencas oceánicas. Por lo que procesos geológicos y climáticos, como la emergencia de Istmo de Panamá y las glaciaciones del Pleistoceno han repercutido de forma importante en la estructura genética de la especie.
- Se detectó una población asociada al cono Africano en donde existe comunicación entre gracias a procesos oceanográficos el Atlántico Oriental y el Índico Occidental por el sur de África, y la cual diverge de las demás poblaciones posiblemente por limitaciones de dispersión y flujo genético.
- El uso de un considerable set de marcadores moleculares definió la estructura genética global de la especie, coincidiendo en gran medida con los resultados obtenidos en el ADNmt.
- Los resultados expuestos en este documento brindan una plataforma para la delineación de estrategias de manejo sustentable del recurso.





**XI. Literatura Citada**

- ABEL, G.J. & N. SANDER. 2014. Quantifying Global International Migration Flows. *Science*. 343(6178): 1520-1522.
- AGAPOW, P.M. & A. BURT. 2001. Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Notes*, 1(1-2): 101-102.
- AIJANABI, S.M. & I. MARTÍNEZ. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research.*, 25(22): 4692-4693.b
- ALEJO-PLATA C, DÍAZ-JAIMES P, SALGADO-UGARTE IH. 2011. Sex ratios, size at sexual maturity, and spawning seasonality of dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) captured in the Gulf of Tehuantepec, Mexico. *Fisheries Research*. 110: 207-216.
- ALMADA VC, R.F. OLIVEIRA, E.J. GONÇALVES *et al.* 2001. Patterns of diversity of the north-eastern Atlantic blennid fish fauna (Pisces: Blenniidae). *Global Ecology and Biogeography*, 10: 411–422.
- ALVARADO-BREMER, J.R., J.B. ALLAN, & J. MEJUTO. 1995. Mitochondrial DNA control region sequences indicate extensive mixing of swordfish (*Xiphias gladius*) populations in the Atlantic Ocean. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 52: 1720-1752.
- ALVARADO BREMER, J.R., B. STEQUERT, N.W. ROBERTSON & B. ELY. 1998. Genetic evidence for inter-oceanic subdivision of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) populations. *Mar. Biol.*, 132: 547-557.
- ALVARADO BREMER, J.R., J. MEJUTO, J. GÓMEZ-MÁRQUEZ, F. BOÁN, P. CARPINTERO, J.M. RODRÍGUEZ, J. VIÑAS, T.W. GREIG & B. ELY. 2005. Hierarchical analyses of genetic variation of samples from breeding and feeding grounds confirm the genetic partitioning of Northwest Atlantic and South Atlantic populations of swordfish (*Xiphias gladius* L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 327: 167-182.
- AVISE, J.C., J.F. SHAPIRA, S.W. DANIEL, C.F. AQUADRO & R.A. LANSMAN. 1983. Mitochondrial DNA differentiation during the speciation processing *Peromyscus*. *Mol. Biol. Evol.*, 1: 38-56.



- AVISE, J.C., J. ARNOLD, R.M. BALL, E. BERMINGHAM, T. LAMP, J.E. NEIGEL, C.A. REBB & N.C. SAUNDERS. 1987. Intraspecific Phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematic. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 489-522.
- AVISE, J.C. & J.L. HAMRICK. 1996. Population genetic structure of other pelagic fishes, Dolphin Fish. En: Conservation Genetics, Case Histories from Nature. 2<sup>da</sup> Edición. USA. pp 359.
- BACON, C.D., D. SILVESTRO, C. JARAMILLO, B.T. SMITH, P. CHAKRABARTY, A. ANTONELLI. 2015. Biological evidence supports an early and complex emergence of the Isthmus of Panama. *PNAS*. doi:10.1073/pnas.1423853112.
- BAKUN, A. & C.S. NELSON. 1991. The seasonal cycle of wind-stress curl in subtropical Eastern boundary current regions. *Journal of Physical Oceanography*. 21(12): 1815-1834.
- BARTLEY, D. M. BAGLEY, G. GALL & B. BENTLEY. 1992. Use of linkage disequilibrium data to estimate effective size of hatchery and natural fish populations. *Conservation Biology*. 6: 365-375.
- BAYONA VÁSQUEZ, NATALIA JULIANA. 2011. Caracterización genética del pez dorado *Coryphaena hippurus* en el Océano Pacífico mediante marcadores microsatelitales. Tesis de Maestría para optar por el título de Maestra en Ciencias- Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología- Universidad Nacional Autónoma de México –UNAM.
- BEARDSLEY, G. L. Jr., 1967. Age, growth and reproduction of the dolphinfish, *Coryphaena hippurus*, in the Straits of Florida. *Copeia*. 441-451.
- BECKER, RA. & WILKS AR. 1993. Maps in S. *AT&T Bell Laboratories Statistics Research Report*. 93.2
- BEERLI, P. 2006. Comparison of Bayesian and maximum likelihood inference of population genetic parameters. *Bioinformatics*, 22(3): 341-345.
- BELKHIR K, P. BORSA, L. CHIKHI, N. RAUFASTE & F. BONHOMME. 1996-2004 GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations.



Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France).

- BEMBO, GG, GR. CARVALHO, N. CINGOLANI, T.J. PITCHER. 1996. Electrophoretic analysis of stock structure in Northern Mediterranean anchovies (*Engraulis encrasicolus*). *International Council for the Exploration of the Seas Journal of Marine Science*, 53, 115–128.
- BERKELEY S.A., C. CHAPMAN, S.M. SOGARD. 2004. Maternal age as a determinant of larval growth and survival in a marine fish, *Sebastes melanops*. *Ecology* 85: 1258-1264.
- BIANCHI, C.N. & C. MORRI. 2000. Marine biodiversity of the Mediterranean Sea: situation, problems and prospects for future research. *Marine Pollution Bulletin*, 40, 367–376.
- BOHONAK, A.J. 2002. IBD (Isolation By Distance): a program for analyses of isolation by distance. *Journal of Heredity*. 93: 153-154.
- BORSA P, A. BLANQUER, P. BERREBI. 1997. Genetic structure of the flounders (*Platichthys flesus* and *P. stellatus*) at different geographic scales. *Marine Biology*, 129, 233–246.
- BOUTIN-GANACHE I., M. RAPOSO, M. RAYMOND, C.F. DESCHEPPER. 2001. M13-Tailed primers improve the readability and usability of microsatellite analyses performed with two different allele-sizing methods. *BioTechniques*, 31(1): 25-27.
- BOWEN B.W. & S.A. KARL. 2007. Population genetics and phylogeography of sea turtles. *Molecular Ecology*, 16, 4886-4907
- BOWEN B, AVISE JC, RICHARDSON JI, MEYLAN AB, MARGARITOU LIS D, HOPKINS-MURPHY S. 1993. Population structure of Loggerhead Turtle (*Caretta caretta*) in the Northwestern Atlantic Ocean and Mediterranean Sea. *Conservation Biology*. 7(4): 834-844.
- BROUGHTON, R. & J. GOLD. 1997. Microsatellite development and survey of variation in northern bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 6: 308–314.



- BROWN A.H.D, M.W. FELDMAN & E. NEVO. 1980. Multilocus structure of natural populations of *Hordeum spontaneum*. *Genetics*. 96(2): 523-536.
- BRUVO R, N. K. MICHIELS, T.G. D'SOUZA & H. SCHULENBURG. 2004. A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level. *Mol. Ecol.* 13: 2101-2106.
- BUONACCORSI V.P., K.S. REECE, L.W. MORGAN, J.E. GRAVES. 1999. Geographic distribution of molecular variance within the blue marlin (*Makaira nigricans*): a hierarchical analysis of allozyme, single copy nuclear DNA, and mitochondrial DNA markers. *Evolution*, 53, 568-579.
- BUONACCORSI, V., J.R. MCDOWELL, J GRAVES. 2001. Reconciling patterns of inter-ocean molecular variance from four classes of molecular markers in blue marlin (*Makaira nigricans*). *Molecular Ecology*, 10: 1179–1196.
- CAETANO-NUNES, B.R., V.H. GARCÍA-MERCHAN, J.J. SELVARAJ, D.F. MARMOLEJO, J.E. MUÑOZ & A.I. GUZMAN. 2012. Heterogeneidad genética de las poblaciones de dorado (*Coryphaena hippurus*) en el Pacífico Colombiano. IX Congreso de Ciencias del Mar MarCuba-2012, ISBN 978-959-300-27-7.
- CARLSSON, J., J.R. McDOWELL, P. DÍAZ-JAIMES, J.E.L CARLSSON, S.B. BOLES, J.R. GOLD & J.E. GRAVES. 2004. Microsatellite and mitochondria DNA analyses of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus thynnus*) population structure in the Mediterranean Sea. *Mol. Ecol.*, 13: 3345-3356.
- CARLSSON, J., J.R. McDOWELL, J.R. CARLSSON, J.E. GRAVES. 2007. Genetic identity of YOY Bluefin Tuna from the Eastern and Western Atlantic spawning areas. *J. Hered.* 98: 23-28.
- CASTRO A.L.F, B.S STEWART, S.G. WILSON. R.E. HUETER, M.G. MEEKAN, P.J. MOTTA, B.W. BOWEN, S.A. KARL. 2007. Population genetic structure of Earth's largest fish, the whale shark (*Rhincodon typus*). *Mol. Ecol.* 16(24): 5183-5192.
- CHANG S.K., G. DiNARDO, J. FARLEY, J. BRODZIAK & Z.L. YUAN. 2013. Possible stock structure of dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) in Taiwan coastal waters and globally based on reviews of growth parameters. *Fish. Res.* 147: 127-136.



- CHAPUIS M.P. & A. ESTOUP. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol. Biol. Evol.* 24(3): 621-631.
- CHOW S & H. TAKEYAMA. 2000. Nuclear and mitochondrial DNA analyses reveal four genetically separated breeding units of the swordfish (*Xiphias gladius*). *J. Fish Biol.* 56: 1087-1098.
- CHOW S, H. OKAMOTO, Y. UOZUMI, Y. TAKEUCHI, H. TAKEYAMA. 1997. Genetic stock structure of the swordfish (*Xhipias gladius*) inferred by PCR-RFLP of the mitochondrial DNA control region. *Marine Biology*, 127, 359-367
- CHOW, S. & H. USHIYAMA. 1995. Global population structure of albacores (*Thunnus alalunga*) inferred by RFLP analysis of the mitochondrial ATPase gene. *Mar. Biol.*, 123: 39-45.
- CIMMARUTA, R., M. IACONELLI, G. NASCETTI & L. BULLINI. 1998. Genetic diversity in Mediterranean large pelagic fish populations. *Biol. Mar. Mediterr.*, 5(3): 300-310.
- COLLETTE, B., ACERO, A., AMORIM, A.F., BOUSTANY, A., CANALES RAMIREZ, C., CARDENAS, G., CARPENTER, K.E., DE OLIVEIRA LEITE JR., N., DI NATALE, A., FOX, W., FREDOU, F.L., GRAVES, J., VIERA HAZIN, F.H., JUAN JORDA, M., MINTE VERA, C., MIYABE, N., MONTANO CRUZ, R., NELSON, R., OXENFORD, H., SCHAEFER, K., SERRA, R., SUN, C., TEIXEIRA LESSA, R.P., PIRES FERREIRA TRAVASSOS, P.E., UOZUMI, Y. & YANEZ, E. 2011. *Coryphaena hippurus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>.
- CRONIN, T.M., & H. J. DOWSETT. 1996. Biotic and oceanographic responses to the Pliocene closing of the Central America Isthmus. En J.B.C. Jackson, A.F. Budd & A.G. Coates, eds., *Evolution and environment in tropical America*, 76-104. University of Chicago Press, Chicago, IL.
- CROW, J.F. M. KIMURA. 1970. *An Introduction to Population Genetics Theory*. Harper & Row, New York, London.
- CRUZ BASTIDA, JORGE ALBERTO. 2009. Estructura genética y filogeografía de las poblaciones de dorado *Coryphaena hippurus* en el Atlántico. Tesis de Maestría



para optar por el título de Maestro en Ciencias Biológicas- Universidad Nacional Autónoma de México –UNAM.

- DAVEY JW, HOHENLOHE PA, ETTER PD, BOONE JQ, CATCHEN JM, BLAXTER ML (2011) Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics*, 12: 499-510.
- DEMPSTER, A.P, N.M. LAIRD & D.B. RUBIN. 1977. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *J. Roy. Stat. Soc. B39*: 1-38.
- DÍAZ-JAIMES, P., M. URIBE-ALCOCER, A. ROCHA-OLIVARES, F.J. GARCÍA-DE-LEÓN, P. NORTMOON & J.D. DURAND. 2010 Global phylogeography of the dolphinfish (*Coryphaena hippurus*): The influence of large effective population size and recent dispersal on the divergence of a marine pelagic cosmopolitan species. *Mol. Phylo. Evol.*, 57: 1209-1218.
- DÍAZ-JAIMES, P., M.U. ALCOCER, S. ORTEGA-GARCÍA, J.D. DURAND. 2006. Spatial and temporal mitochondrial DNA genetic homogeneity of dolphinfish populations (*Coryphaena hippurus*) in the eastern central Pacific. *Fish. Res*, 80: 333-338.
- DO, C. RS. WAPLES, D. PEEL, GM. MACBETH, BJ. TILLET & JR. OVENDEN. 2014. *N<sub>E</sub>ESTIMATOR v2*: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (*N<sub>e</sub>*) from genetic data. *Molecular Ecology Resources*. 14(1): 209-214.
- DOMINGUES, V.S., G. BUCCIARELLI, V.C. ALMADA, G. BERNARDI. 2005. Historical colonization and demography of the Mediterranean damselfish, *Chromis chromis*. *Molecular Ecology*, 14: 4051–4063.
- DUARTE-NETO, P., R. LESSA, B. STOSIC, E. MORIZE. 2008. The use of sagittal otoliths in discriminating stocks of common dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) off northeastern Brazil using multishape descriptors. *Journal of Marine Sciences ICES*. 65: 1144-1152.
- DUNCAN K.M., A.P. MARTIN, B.W. BOWEN & D.H. DE COUET. 2006. Global phylogeography of the scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*). *Molecular Ecology*, 15, 2239-2251



- DURAND, J.D., A. COLLET, S. CHOW, B. GUINAND & P. BORSA. 2005. Nuclear and mitochondrial DNA markers indicate unidirectional gene flow of Indo-Pacific to Atlantic bigeye tuna *Thunnus obesus* populations, and their admixture off southern Africa. *Mar. Biol.*, 147: 313-322.
- EDMONDS, C. A., A. S. LILLIE, L. L. CAVALLI-SFORZA. 2004 Mutations arising in the wave front of an expanding population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 975–979. Edmonds, C. A., A. S. Lillie, and L. L. Cavalli-Sforza, 2004 Mutations arising in the wave front of an expanding population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 975–979.
- ELBY, B.M., CHAPMAN, R.W., SEDCERRY, G.R. & Mc GOVERN, J.C. 2002. Stock structure of dolphin, *Coryphaena hippurus*, in the western central Atlantic as determined by molecular genetics techniques. Unpublished.
- ELY, B., J. VIÑAS, J. ALVARADO-BREMER, D. BLACK, L. LUCAS, K. COVELLO, A.V. LABRIE, E. THELEN. 2005. Consequences of the historical demography on the global population structure of two highly migratory cosmopolitan marine fishes: the yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) and the skipjack tuna (*Katsuwonis pelamis*). *BMC Evol. Biol.*, 5-19.
- EXCOFFIER, L., G., LAVAL & S. SCHNEIDER. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*. 1: 47-50.
- FAIRCLOTH, BC. 2008. MSATCOMMANDER: detection of microsatellite repeat arrays and automated, locus-specific primer design. *Mol. Ecol. Res.* 8: 92-94.
- FAO. The State of Worls Fisheries and Aquaculture 2014. Rome. 223pp.
- FAO ORGANIZACION DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACION, FAO. El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura 2006. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma, 2007.
- FARRELL, E.R., A.M. BOUSTANY, P.N. HALPIN, D.L. HAMMOND. 2013. Dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) distribution in relation to biophysical ocean conditions in the northwest Atlantic. *Fish. Res.*, ), <http://dx.doi.org/10.1016/j.fishres.2013.11.014>



- FELDHEIM, K.A., S.H. GRUBER & M.V. ASHLEY. 2001. Population genetic structure of the lemon shark (*Negaprion brevirostris*) in the western Atlantic: DNA microsatellite variation. *Mol. Ecol.*, 10: 295-303.
- FROMENTIN, J.M., B. ERNANDE, R. FABLET & H. De PONTUAL. 2009. Importance and future of individual markers for the ecosystem approach to fisheries. *Aquat. Living Resour.* 22: 395-408.
- FURUKAWA, S. R, KAWABE, S. OHSHIMO, K. FUJIOKA, G. N. NISHIHARA, Y. TSUDA, T. AOSHIMA, H. KANEHARA, H. NAKATA. 2011. Vertical movement of dolphinfish *Coryphaena hippurus* as recorded by acceleration data-loggers in the northern East China Sea. *Environ. Biol. Fish.* 92: 89-99.
- GARBER, A.F., T.D. TRINGALI, J.S. FRANKS. 2005. Population genetic and phylogenetic structure of wahoo, *Acanthocybium solandri*, from the western central Atlantic and central Pacific oceans. *Marine Biology*, 147: 205–214.
- GARCÍA-MARTÍNEZ J, MOYA A, RAGA JA, LATORRE A. 1999. Genetic differentiation in the striped dolphin *Stenella coeruleoalba* from European waters according to mitochondrial DNA (mtDNA) restriction analysis. *Molecular Ecology.* 8(6): 1069-1073.
- GIBBS, R. H. Jr. & B. B. COLLETTE. 1959. On the identification, distribution and biology of the dolphins *Coryphaena hippurus* and *C. equiselis*. *Bull. Mar. Sci. Gulf. Caribb.* 9: 117-152.
- GLENN, T.C. & N.A. SCHABLE. 2005. Isolating DNA loci. Pp. 202-222 En: *Methods in Enzymology 395, Molecular Evolution: Producing the Biochemical Data, Part B.* (eds Zimmer EA, Roalson EH). Academic Press, San Diego, CA.
- GOLDSTEIN, D. & C. SCHLÖTTERER. 1999. Microsatellites: Evolution and applications. Oxford University Press, Oxford, UK.
- GONZALEZ, E., P. BEERLI & R. ZARDOYA. 2008. Genetic structuring and migration patterns of Atlantic bigeye tuna, *Thunnus obesus* (Lowe, 1839). *Evol. Biol.*, 8: 252-266.
- GRANT, W.S. & B.W. BOWEN. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *The Journal of Heredity.* 89(5): 415-426.





- GRAVES J.E., S.D. FERRIS, A.E. DIZON. 1984. Close genetic similarity of Atlantic and Pacific skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) demonstrated with restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA. *Marine Biology*, 79, 315-319
- GRAVES J.E. & A.E. DIZON. 1989. Mitochondrial DNA sequence similarity of Atlantic and Pacific albacore tuna (*Thunnus alalunga*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 46, 870-873.
- GRAVES, J.E. & J.R. McDOWELL. 1994. Genetic analysis of striped marlin (*Tetrapturus audax*) population structure in the Pacific Ocean. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 51: 1762–1768.
- GRAVES, J.E. & J.R. McDOWELL. 1995. Inter-ocean divergence of istiophorid billfishes. *Marine Biology*, 122: 193–202.
- GRAVES, J.E., 1998. Molecular insights into the population structures of cosmopolitan marine fishes. *The Journal of Heredity*. 89(5): 427-437.
- GRAVES, J.E. & J.R. McDOWELL. 2003. Stock structure of the world's istiophorid fishes: a genetic perspective. *Mar. Fresh. Res.*, 54: 287-298.
- GRAVES, J.E. & J.R. McDOWELL. 2006. Genetic analysis of white marlin (*Tetrapturus albidus*) stock structure. *Bulletin of Marine Science*, 79: 469–482.
- GU, Z, L. GU, R. ELIS, M. SCHLESNER & B. BRORS. 2014. Circlize implements and enhances circular visualization in R. *Bioinformatics*. 30(19): 2811-2.
- GYORY, J., A.J. MARIANO, E.H. RYAN. 2013. "The Benguela Current." Ocean Surface Currents. <http://oceancurrents.rsmas.miami.edu/atlantic/benguela.html>
- HALLATSCHEK, O. & D. R. NELSON. 2008 Gene surfing in expanding populations. *Theor. Popul. Biol.* 73: 158–170.
- HARDIE, D.C. & P.D.N. HEBERT. 2004. Genome size evolution in fishes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 61: 1636-1646.
- HASTINGS, A. 1993. Complex interactions between dispersal and dynamics: lessons from coupled logistic equations. *Ecology* 74: 1362–1372.
- HAUSER, L., G.J. ADCOCK, P.J. SMITH, J.H.B. RAMIREZ, G.R. CARVALHO. 2002. Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an



overexploited population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 11742–11747.

- HAUSER, L. & G.R. CARVALHO. 2008. Paradigm shifts in marine fisheries genetics: ugly hypotheses slain by beautiful facts. *Fish and Fisheries*. 9: 333–362.
- HEDGECOCK, D. 1994a. Does variance in reproductive success limit effective population sizes of marine organisms? En: *Genetics and evolution of aquatic organism*. Ed. A. Bemount. Londres. Pp 122-134.
- HEDGECOCK, D. 1994b. Temporal and spatial genetic structure of marine animal populations in the California Current. *CalCOFI Rep.*, 35: 73-81.
- HEDRICK, P. 2005. A standardized genetic differentiation measure. *Evolution*. 59(8): 1633-1638.
- HEIST, E.J., J.A. MUSICK, J.E. GRAVES. 1996. Genetic population structure of the shortfin mako (*Isurus oxyrinchus*) inferred from restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53: 583–588.
- HEWITT, G.M. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*. 359: 183-195.
- HOELZEL A.R., A. NATOLI, M.E. DAHLHEIM, C. OLAVARRIA, R.W. BAIRD, N.A. BLACK. 2002. Low worldwide genetic diversity in the killer whale (*Orcinus orca*): implications for demographic history. *Proceedings of the Royal Society of London*, 269, 1467-1473.
- HOELZEL A, M. SHIVJI, J. MAGNUSSEN, M. FRANCIS. 2006. Low worldwide genetic diversity in the basking shark (*Cetohinus maximus*). *Biology Letters*, 2, 639–642.
- HSÜ, K., W. RYAN, M. CITA. 1973. Late Miocene desiccation of the Mediterranean. *Nature*, 242, 240–244. *J. Northw. Atl. Fish. Sci.* 35: 239-247.
- HUETER, R.E., M. R. HEUPEL, E.J. HEIST, D.B. KEENEY. 2004. Evidence of philopatry in sharks and implications for the management of shark fisheries.
- HUTCHINSON, W.F., C. VAN OOSTERHOUT, S.I. ROGERS, G.R. CARVALHO. 2003. Temporal analysis of archived samples indicates marked genetic changes in



declining North Sea cod (*Gadus morhua*). *Proceedings of the Royal Society of London Series B – Biological Sciences*. 270: 2125–2132.

- IGFA. 2014. *International Game Fish Association World Record Game Fishes*. Three Kings, New Zealand.
- JOMBART, T. 2008. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*. 24: 1403-1405.
- JOST, L. 2008.  $G_{ST}$  and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology*. 17: 4015-4026.
- KALINOWSKI ST. 2005. HP-RARE 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Mol. Ecol. Notes*. 5: 187-189.
- KAMVAR ZN, JF TABIMA & NJ GRÜNWARD. 2014. Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ* 2:e281 <https://dx.doi.org/10.7717/peerj.281>.
- KEENAN K, P MCGINNITY, TF CROSS, WW CROZIER & PA PRODÖHL. 2013. diveRcity: An R package for the estimation of population genetics parameters and their associated errors. *Methods in Ecology and Evolution*. doi:10.1111/2041-210X.12067.
- KEENEY D.B. & E. J. HEIST. 2006. Worldwide phylogeography of the blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) inferred from mitochondrial DNA reveals isolation of West Atlantic populations coupled with recent Pacific dispersal. *Molecular Ecology*, 15, 3669-3679.
- KEENEY, D.B., M.R. HEUPEL, R.E. HUETER, E.J. HEIST. 2005. Microsatellite and mitochondrial DNA analyses of the genetic structure of blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) nurseries in the northwestern Atlantic, Gulf of Mexico, and Caribbean Sea. *Molecular Ecology*, 14, 1911–1923.
- KENDALL, M. G. & B. BABINGTON SMITH. 1939. The problem of m rankings. *Annals of Mathematical Statistics*. 10: 275-287.
- KINGSFORD, M.J. & A. DEFRIES. 1999. The ecology of and fishery for *Coryphaena spp.* in the waters around Australia and New Zealand. *Sci. Mar.*, 63(3-4): 267-275.



- KOTOULAS G, MAGOULAS A, TSIMENIDES N, ZOUROS E. 1995. Marked mitochondrial DNA differences between Mediterranean and Atlantic populations of the swordfish, *Xiphias gladius*. *Molecular Ecology*. 4: 473-481.
- KRAUL, S. 1999. Seasonal abundance of the dolphinfish, *Coryphaena hippurus*, in Hawaii and the tropical Pacific Ocean. *Sci. Mar.*, 63(3-4): 261-266.
- KRIJGSMAN, W., F.J. HILGEN, I. RAFFI *et al.* 1999. Chronology, causes and progression of the Messinian salinity crisis. *Nature*, 400: 652–655.
- LAIRD, P.W., ZIJDERVEL, A., LINDERS, K., RUDNICKI, M.A., JAENISCH, R., BERNIS, A., 1991. Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucl. Ac. Res.* 19: 4293.
- LASSO, J. & L. ZAPATA. 1999. Fisheries and biology of *Coryphaena hippurus* (Pisces: Coryphaenidae) in the Pacific coast of Colombia and Panama. *Sci. Mar.*, 63 (3-4): 387-399.
- LEMON, J. 2006. Plotrix: a package in the red light district of R. *R-News*. 6(4): 8-12.
- LESSA, R. P., F.M. SANTANA, G.D. NOGUEIRA. 2009. *Coryphaena hippurus*. En: Lessa, R.P, J.L. Bezerra, M.P. Nobrega. (ed.), *Dinâmica de populações e avaliação dos estoques dos recursos pesqueiros da Região Nordeste.*, pp 27-38. UFRPE. Relatório REVIZEE/SCORE-NE.
- LONGHURST A. 1998. *Ecological Geography of the Sea*, 1st edn. Academic Press, Cajarc, France.
- LU, C., C.A. CHEN, C. HUI, T. TZENG, S. YEH. 2006. Population genetic structure of the swordfish, *Xiphias gladius*, in the Indian Ocean and West Pacific inferred from the complete DNA sequence of the mitochondrial control region. *Zoological Studies*, 45: 269–279.
- MAHON R. 1999. Dolphinfish fisheries in the Caribbean region. *Scientia Marina*. 63 (3-4): 411-420.
- MALDONADO A. 1985. Evolution of the Mediterranean basins and a detailed reconstruction of the Cenozoic Paleooceanography. En: (ed. Margalef R) *Western Mediterranean*, pp. 17–56. Pergamon Press, London.



- MANNI F, GUÉRARD E & E HEYER. 2004. Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: How barriers can be detected by using Monmonier's algorithm. *Hum Biol.* 76: 173-190.
- MARTINEZ, P., E.G. GONZÁLEZ, R. CASTILHO, R. ZARDOYA. 2006. Genetic diversity and historical demography of Atlantic bigeye tuna (*Thunnus obesus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 39: 404-416.
- MEIRMANS, P.G. 2006. Using the AMOVA framework to estimate a standardized genetic differentiation measure. *Evolution*. 60(11): 2399-2402.
- MERTEN W, R APPELDOORN, D. HAMMOND. 2014a. Movements of dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) along the U.S. east coast as determined through mark and recapture data. *Fisheries Research*. 151: 114-121.
- MERTEN W, R APPELDOORN, D. HAMMOND. 2014b. Spatial differentiation of dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) movements relative to the Bahamian archipelago. *Bull. Mar. Sci.* 90(3): 849-864.
- MONTES, C., A. CARDONA, C. JARAMILLO, A. PARDO, J.C. SILVA, V. VALENCIA, C. AYALA, L.C. PÉREZ-ANGEL, L.A. RODRÍGUES-PARRA, V. RAMIREZ, H. NIÑO. 2015. Middle Miocene closure of the Central American Seaway. *Science*. 348(6231): 226-228.
- NEFF, B.D. & M.R. GROSS. 2001. Microsatellite evolution in vertebrates: inference from AC dinucleotide repeats. *Evolution*. 55(9): 1717-1733.
- OVENDEN, J.R., O. BERRY, D.J. WELCH, R.C. BUCKWORTH, C.M. DICHMONT. 2015. Ocean's eleven: a critical evaluation of the role of population, evolutionary and molecular genetics in the management of wild fisheries. *Fish and Fisheries*. 16: 125-159
- OXFENFORD, H., 1999. Biology of the dolphinfish (*Coryphaena Hippurus*) in the Western Central Atlantic: A Review. *Sci. Mar.*, 63 (3-4): 277-301.
- OXFENFORD, H & W. HUNTE. 1986. A preliminary investigation of the stock structure of the dolphin, *Coryphaena hippurus*, in the Western Central Atlantic. *Fishery Bulletin.*, 84: 451-460.



- PALKO, B.J., G.L. BEARDSLEY, W.J. RICHARDS. 1982. Synopsis of the biological data on dolphin-fishes, *Coryphaena hippurus* L. and *Coryphaena equiselis* L. NOAA Tech. Rep. NMFS Circular 443, 28.
- PARADIS, E. J. CLAUDE & K. STRIMMER. 2004. APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*. 20: 289-290.
- PATARNELLO, T. F., A.M. FILIP, M.J. VOLCKAERT, R. CASTILHO. 2007. Pillars of Hercules: is the Atlantic-Mediterranean transition a phylogeographical break?. *Mol. Ecol.*, 16: 4426-4444.
- PARDINI, A.T., C.S. JONES, L.R. NOBLE, B. KREISER, H. MALCOLM, B.D. BRUCE, J.D. STEVENS, G. CLIFF, M.C. SCHOLL, M. FRANCIS, C.A.J. DUFFY, A.P. MARTIN. 2001. Sex-biased dispersal of great white sharks. *Nature*, 412, 139–140.
- PEAKALL, R. & P.E. SMOUSE. 2006. Genalex 6: Genetic analysis in Excel. Population software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes.*, 6(1): 288-295.
- PERALTA, M. 2006. Aspectos biológicos y pesqueros del recurso dorado (*Coryphaena hippurus*) en aguas ecuatorianas. Instituto Nacional de Pesca. Investigación De Los Recursos Bioacuáticos y su Ambiente. Pg.: 1-26.
- PERES JM. 1985. History of the Mediterranean biota and the colonisation of the depths. En: (ed. Margalef R) *Western Mediterranean*, pp. 198–232. Pergamon Press, London.
- PEREZ, R.N. & Y. SADOVY. 1991. Preliminary data on landings records and reproductive biology of *Coryphaena hippurus* L., in Puerto Rico. *Proc. Gulf Caribb. Fish. Inst.*, 44: 636-650.
- PEREZ, R.N., A.M. ROMAN, G.A. RIVERA. 1992. Investigation of the reproductive dynamics and preliminary evaluation of landings data of the dolphinfish *Coryphaena hippurus*, L. Final Report for Dingell-Johnson Project F26-1. Puerto Rico Department of Natural Resources. Fishery Research Laboratory, Mayaguez, PR. 95pp,
- PLA, C & J.M. PUJOLAR. 1999. Genetic homogeneity of dolphinfish (*Coryphaena Hippurus*) in the Western Mediterranean and the Eastern Atlantic. *Sci. Mar.*, 63 (3-4): 337-341.



- PRITCHARD, J.K., M. STEPHENS & P. DONNELLY. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155: 945-959.
- PUDOVKIN, A., V. ZAYKIN & D. HEDGECOCK. 1996. On the potential for estimating the effective number of breeders from heterozygote excess in progeny. *Genetics*, 144: 383-387.
- QUESADA H, C. ZAPATA, G. ALVEREZ. 1995. A multilocus allozyme discontinuity in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: the interaction of ecological and life-history factors. *Marine and Ecological Progress Series*, 116, 99–115.
- R Development Core Team. 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>
- RAMBAUT, A. 2006-2014. FigTree: Tree Figure Drawing Tool Version 1.4.2. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. <http://tree.bio.ed.ac.uk/>
- RAYMOND, M., & F. ROUSSET. 1995. *GENEPOP* (version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *Journal of Heredity*. 86: 248-249.
- REEB, C., L. ARCANGELI, B.A. BLOCK. 2000. Structure and migration corridors in Pacific populations of the swordfish, *Xiphias gladius*, as inferred through analysis of mitochondrial DNA. *Marine Biology*, 136: 1123–1131.
- RORIVERA BETANCOURT, G.A. 1994. *Age and growth of dolphinfish, Coryphaena hippurus L., in Puerto Rico as determined by otolith analysis*. M.Sc. thesis, University of Puerto Rico, Mayaguez, Puerto Rico. 56 pp.
- ROBINSON AR. 2001. Mediterranean Sea circulation: En: Encyclopedia of Ocean Sciences (eds Steele JH, Turekian KK, Thorpe SA). Academic Press, London.
- ROCHA-OLIVARES, A., M. BOBADILLA-JIMENEZ, S. ORTEGA-GARCIA, N. SAAVEDRA-SOTELO, J.R. SANDOVAL-CASTILLO. 2006. Variabilidad mitocondrial del dorado *Coryphaena hippurus* en poblaciones del Pacífico. *Ciencias Marinas*, 32(3): 569-578.
- ROSEL, P.E. & B.A. BLOCK. 1996. Mitochondrial control region variability and global population structure in the swordfish, *Xiphias gladius*. *Mar. Biol.*, 125: 11-22.



- ROSENBLATT, R.H. & R.S. WAPLES. 1986. A genetic comparison of allopatric populations of shore fish species from the eastern and central Pacific Ocean: dispersal or vicariance? *Copeia*. 1986(2): 275-284.
- SÁNCHEZ IZQUIERDO, ETNA. 2009. Filogeografía del pez dorado (*Coryphaena hippurus*) en el Pacífico oriental por medio de secuencias del citocromo *b* del ADN mitocondrial. Tesis de Licenciatura para optar por el título de Bióloga- Universidad Nacional Autónoma de México-UNAM
- SARKAR, D. 2008. Lattice: Multivariate Data Visualization with R, Springer. ISBN: 978-0-387-75968-5 <http://lmdvr.r-forge.r-project.org/>
- SCHREY A.W. & E.J. HEIST. 2003. Microsatellite analysis of population structure in the shortfin mako (*Isurus oxyrinchus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 60: 670–675.
- SCOLES, D.R. & J.E. GRAVES. 1993. Genetic analysis of the population structure of yellowfin tuna, *Thunnus albacares*, from the Pacific Ocean. *Fishery Bulletin* 91, 690-698.
- SOARES, R.X., L.A.C. BERTOLLO, M.B. CIOFFI, G.W.W.F. COSTA, W.F. MOLINA. 2014. Chromosomal distribution of two multigene families and the unusual occurrence of an  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$  sex chromosome system in the dolphinfish (Coryphaenidae): An evolutionary perspective. *Genetics and Molecular Research*. 13(2): 2470-2479.
- THEISEN, T.C., B.W. BOWEN, W. LANIER, J.D. BALDWIN. 2008. High connectivity on a global scale in the pelagic wahoo, *Acanthocybium solandri* (tuna family Scombridae). *Molecular Ecology*. 17: 4233-4247.
- TOMCZAK M & GODFREY JS. 1994. Regional Oceanography: an Introduction. Pergamon Press, Oxford.
- TORTONESE. 1985. *Distribution and Ecology of Endemic Elements in the Mediterranean Fauna (Fishes and Echinoderms)*. Plenum Press, New York.
- TRIPP-VALDEZ, M., F.J. GARCÍA DE LEÓN, S. ORTEGA-GARCÍA, D. LLUCHCOTA, J. LÓPEZ-MARTÍNEZ & P. CRUZ. 2010. Population genetic structure of dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) in the Gulf of California, using microsatellite loci. *Fish. Res.*, 105(3): 172-177.





- TURNER, T.F., J.P. WARES, J.R. GOLD. 2002. Genetic effective size is three orders of magnitude smaller than adult census size in an abundant, estuarine-dependent marine fish (*Sciaenops ocellatus*). *Genetics*. 162: 1329–1339.
- VERON, J.E.N. 1995. Corals in space and time: the biogeography and evolution of the Scleractinia. Comstock/Cornell, Ithaca, NY
- VIÑAS, J., J.R. ALVARADO BREMER, C.PLA. 2004. Inter-oceanic genetic differentiation among albacore (*Thunnus alalunga*) populations. *Mar. Biol.* 145: 225-232.
- VIÑAS, J., J.R. ALVARADO-BREMER, C. PLA. 2010. Phylogeography and phylogeny of the epimeric Cosmopolitan bonitos of the genus *Sarda* (Cuvier): inferred patterns of intra- and inter-oceanic connectivity derived from nuclear and mitochondrial DNA data. *Journal of Biogeography*. 37(3): 557-570
- WAHLUND S. 1928. Zusammensetzung von population und korrelationserscheinung vom standpunkt der vererbungslehre aus betrachtet. *Hereditas*, 11:65–106.
- WANG, X.W., R.N. TRIGIANO, M.T. WINDHAM, R.E. DEVRIES, B.E. SCHEFFLER, T.A. RINEHART & J.M. SPIERS. 2007. A simple PCR procedure for discovering microsatellites from small insert libraries. *Mol. Ecol. Notes.*, 7: 558-561.
- WAPLES R.S. 2005. Genetic estimates of contemporary effective population size: to what time periods do the estimates apply? *Mol. Ecol.* 14: 3335-3352.
- WAPLES, R.S. 2002. Evaluating the effect of stage-specific survivorship on the  $N_e/N$  ratio. *Mol. Ecol.*, 11: 1029-1037.
- WAPLES R.S. 1998. Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *J. of Heredity*, 89, 438-450
- WARD, R.D., 1994. A comparison of genetic diversity levels in marine, fresh-water, and anadromus fishes. *Journal of Fish Biology*. 44: 213-232.
- WARNES, G.R. 2003. The genetics package. *R News*. 3(1).
- WEIR, BRUCE, S. 1996. Genetic Data Analysis II. Sinauer Associates, Sunderland.
- WEIR, B.S., & C.C. COCKERHAM. 1984. Estimating  $F$ -statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. 38:1358-1370.



- WICKHAM, H. 2011. The Split-Apply-Combine Strategy for Data Analysis. *Journal of Statistical Software*. 40(1): 1-29.
- WRIGHT, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*. 15: 323–354.
- WU, CH., SU, W. & T. KAWASAKI. 2001. Reproductive biology of the dolphin fish *Coryphaena hippurus* on the east coast of Taiwan. *Fish. Sci.*, 67: 784-793.
- ZAITSEV, O., A. TRASVIÑA-CASTRO, J. LINERO-CUETO, G. GAXIOLA-CASTRO, J. CEPEDA-MORALES. 2014. Oceanographic conditions over the continental shelf off Magdalena Bay (Mexico) in 2011-2012. *Ciencias Marinas.*, 40(2): 89-112.
- ZALAPA, J.E., H. CUEVAS, H. ZHU, S. STEFFAN, D. SENALIK, E. ZELDIN, B. -McCOWN, R. HARBURT, P. SIMON. 2012. Using Next-Generation Sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) loci in the plant sciences. *American Journal of Botany*. 99(2): 193-208.



**XII. ANEXO I**

Estudios genéticos en especies pelágicas de amplia distribución. NS: No significativo. N/R: No reportado

Nombre común y científico	Método	Fst/ $\phi$ st	Escala geográfica de la estructura	Cita
<b>Tiburón ballena <i>Rhincodon typus</i></b>	DNAmt	0.107	Atlántico vs. Indo-Pacífico	Castro <i>et al.</i> 2007
<b>Tiburón peregrino <i>Cetorhinus maximus</i></b>	DNAmt	NS	No estructura Atlántico vs. Pacífico; Océano Índico no muestreado	Hoelzel <i>et al.</i> 2006
<b>Tiburón puntas negras <i>Carcharhinus limbatus</i></b>	DNAmt	0.35	Atlántico oeste	Keeney <i>et al.</i> 2005
	microsats	0.007	Atlántico este vs. Indo-Pacífico	Keeney & Heist 2006
	DNAmt	0.612		
<b>Tiburón mako <i>Isurus oxyrinchus</i></b>	DNAmt	0.347	Atlántico Norte vs. Atlántico Sur	Heist <i>et al.</i> 1996
		0.105–0.173	Atlántico vs. Pacífico	
	microsats	NS	Atlántico vs. Pacífico	Schrey & Heist 2003
<b>Tiburón martillo común <i>Sphyrna lewini</i></b>	DNAmt	0.749	Atlántico vs. Indo-Pacífico	Duncan <i>et al.</i> 2006
<b>Tiburón blanco <i>Carcharodon carcharias</i></b>	DNAmt	0.810–0.890	Este vs. Oeste Océano Índico	Pardini <i>et al.</i> 2001
	microsats	NS	Este vs. Oeste Océano Índico	
<b>Marlin blanco <i>Tetrapturus albidus</i></b>	microsats	0.004	Atlántico Norte vs. Suroeste	Graves & McDowell 2006
	ADNmt	0.04	Atlántico Noroeste vs. Caribe	
<b>Marlin azul <i>Makaira nigricans</i></b>	Aloenzimas	0.077	Atlántico vs. Pacífico	Buonaccorsi <i>et al.</i> 1999
	scnDNA	0.086		
	ADNmt	0.25		
	microsats	0.146	Atlántico vs. Pacífico	Buonaccorsi <i>et al.</i> 2001
	ADNmt	0.217		
<b>Marlin rayado <i>Tetrapturus audax</i></b>	ADNmt	N/R	Pacífico Oriental vs. Occidental	Graves & McDowell 1994
<b>Pez vela <i>Istiophorus platypterus</i></b>	ADNmt	N/R	Atlántico vs. Indo-Pacífico	Graves & McDowell 1995
	ADNmt	N/R	Intra-Pacífico, intra-Índico	Graves & McDowell 2003
	microsats	N/R	Atlántico vs. Indo-Pacífico, Índico vs. Pacífico	Graves & McDowell 2003

Nombre común y científico	Método	Fst/ $\phi$ st	Escala geográfica de la estructura	Cita
<b>Pez espada <i>Xiphias gladius</i></b>	ADNmt	0.087	Atlántico vs. Mediterráneo vs. Indo-Pacífico. Atlántico Noroeste vs. Atlántico Sur	Alvarado-Bremer <i>et al.</i> 2005
	ADNmt	N/R	Mediterráneo vs. Atlántico vs. Pacífico	Rosel & Block 1996
	ADNmt	0.014–0.032	Intra-Pacífico, intra-Índico	Reeb <i>et al.</i> 2000
	ADNmt	0.038	Índico vs. Pacífico occidental	Lu <i>et al.</i> 2006
	CAM intron	0.34	Atlántico Norte vs. Atlántico Sur	Chow <i>et al.</i> 2007
<b>Atún aleta amarilla <i>Thunnus albacares</i></b>	ADNmt	NS	No estructura	Ely <i>et al.</i> 2005
<b>Bonito <i>Katsuwonus pelamis</i></b>	ADNmt	NS	No estructura	Ely <i>et al.</i> 2005
<b>Atún patudo <i>Thunnus obesus</i></b>	ADNmt	0.22	Atlántico vs. Indo-Pacífico	Martinez <i>et al.</i> 2006
	microsats	NS	No estructura	Gonzalez <i>et al.</i> 2008
<b>Albacora <i>Thunnus alalunga</i></b>	ADNmt	N/R	Atlántico vs. Pacífico	Chow & Ushiyama 1995
	ADNmt	0.041	Mediterráneo vs. Atlántico vs. Pacífico	Viñas <i>et al.</i> 2004
<b>Atún aleta azul <i>Thunnus thynnus</i></b>	microsats	0.006	Atlántico Este vs. Atlántico Oeste/Mediterráneo	Broughton & Gold 1997
	ADNmt	0.013	Mediterráneo Este vs Mediterráneo Oeste	Carlsson <i>et al.</i> 2007
<b>Bonito del Atlántico <i>Sarda sarda</i></b>	ADNmt	0.291	Atlántico noroeste vs Mediterráneo	Viñas <i>et al.</i> 2010
<b>Wahoo <i>Acanthocybium solandri</i></b>	ADNmt	NS	Atlántico vs. Pacífico central	Garber <i>et al.</i> 2005
	ADNmt, LDHA6 intron	NS	No estructura	Theisen <i>et al.</i> 2008
<b>Dorado <i>Coryphaena hippurus</i></b>	ADNmt	0.208	Mediterráneo vs Atlántico Oriental vs Indo-Pacífico	Díaz-Jaimes <i>et al.</i> 2010
	ADNmt	0.029	Pacífico Noreste	Rocha-Olivares <i>et al.</i> 2006
	microsats	NS	No estructura Pacífico Oriental	Tripp-Váldez <i>et al.</i> 2010



**ANEXO II.**

Tamaño de la muestra (N). Número de alelos (Na). Número efectivo de alelos. Riqueza alélica bajo el análisis de rarefacción (R). Número efectivo de alelos (Ne). Heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He). Probabilidad de que la localidad genotipificada se encuentre bajo equilibrio H-W ( $p$ ).

Pop\Loc	008	023	002	008A	037	004	024	062	113	166	284	357	368	389	430	453	601	634	652	688	797	853	878	967	
<b>PAC</b>	<b>N</b>	433	434	434	433	433	325	311	281	209	177	300	263	213	323	314	311	193	183	311	272	278	336	227	323
	<b>Na</b>	25	25	12	15	13	10	16	17	11	10	12	14	19	14	17	11	16	56	15	30	50	10	20	11
	<b>R</b>	12.3	13.3	6.7	10.3	7.5	6.4	11.7	11.1	7.1	6.8	8.5	9.1	13.1	7.3	9.8	6.3	8.0	21.4	10.4	17.7	20.0	6.2	8.0	7.3
	<b>Ne</b>	8.10	10.98	4.45	7.17	4.77	4.42	10.20	8.44	3.48	3.14	6.04	5.85	11.28	2.89	2.87	3.45	2.15	18.22	8.85	18.30	21.37	2.52	1.87	2.38
	<b>Ho</b>	0.850	0.919	0.749	0.864	0.811	0.732	0.608	0.719	0.349	0.684	0.720	0.700	0.770	0.443	0.462	0.627	0.492	0.842	0.643	0.879	0.824	0.506	0.216	0.483
	<b>He</b>	0.877	0.909	0.775	0.861	0.790	0.774	0.902	0.882	0.713	0.682	0.835	0.829	0.911	0.654	0.651	0.710	0.535	0.945	0.887	0.945	0.953	0.603	0.464	0.579
	<b>p</b>	<b>0.000</b>	<b>0.006</b>	0.337	<b>0.091</b>	<b>0.000</b>	0.689	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.566	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
<b>BM</b>	<b>N</b>	20	20	20	20	20	18	8	10	0	0	17	16	2	16	13	14	0	15	19	10	18	15	13	16
	<b>Na</b>	14	14	6	11	8	8	3	10	0	0	6	4	2	9	8	5	0	18	8	12	15	6	7	6
	<b>Ne</b>	8.08	9.20	4.02	6.78	4.15	4.53	1.47	7.41	0.00	0.00	3.32	3.18	1.60	5.95	7.35	3.88	0.00	13.64	3.68	7.41	10.62	3.36	4.23	3.71
	<b>Ho</b>	0.900	0.900	0.650	0.900	0.800	0.833	0.125	0.300	0.000	0.000	0.647	0.813	0.500	0.688	0.692	0.500	0.000	0.933	0.632	0.900	0.778	0.333	0.308	1.000
	<b>He</b>	0.876	0.891	0.751	0.853	0.759	0.779	0.320	0.865	0.000	0.000	0.699	0.686	0.375	0.832	0.864	0.742	0.000	0.927	0.729	0.865	0.906	0.702	0.763	0.730
	<b>R</b>	9.0	9.3	4.7	7.7	6.0	6.0	3.0	9.1	0	0	4.8	3.7	2.0	7.3	7.6	4.8	0	11.9	5.8	10.2	10.1	4.9	5.7	4.7
	<b>p</b>	<b>0.024</b>	0.112	0.640	0.992	<b>0.043</b>	0.770	<b>0.045</b>	<b>0.001</b>	NA	NA	0.796	0.052	1.000	0.603	0.383	0.246	NA	<b>0.045</b>	<b>0.001</b>	0.599	0.274	<b>0.034</b>	<b>0.000</b>	0.382
<b>PL</b>	<b>N</b>	32	32	32	31	31	27	30	27	18	27	26	21	15	25	26	20	30	23	21	19	29	27	0	28
	<b>Na</b>	15	16	8	12	8	7	12	11	7	7	9	9	14	7	6	6	7	24	7	17	22	9	0	3
	<b>Ne</b>	6.15	11.19	4.41	6.03	3.81	4.35	8.53	8.19	3.52	2.75	6.26	6.00	9.78	2.74	3.44	3.70	1.43	12.75	4.74	13.88	15.29	3.74	0.00	1.62
	<b>Ho</b>	0.844	0.938	0.750	0.742	0.710	0.815	0.733	0.926	0.556	0.630	0.615	0.619	0.867	0.440	0.615	0.600	0.300	0.826	0.476	1.000	0.828	0.593	0.000	0.321
	<b>He</b>	0.837	0.911	0.773	0.834	0.738	0.770	0.883	0.878	0.716	0.636	0.840	0.833	0.898	0.635	0.709	0.730	0.299	0.922	0.789	0.928	0.935	0.733	0.000	0.383
	<b>R</b>	7.7	9.7	5.3	7.4	5.4	5.3	8.2	8.2	5.0	5.3	6.7	6.8	10.0	4.7	4.3	4.8	3.2	11.6	5.5	11.3	11.4	5.5	0	2.8
	<b>p</b>	0.927	0.745	0.995	0.739	<b>0.001</b>	0.213	0.147	0.689	0.081	0.237	0.307	<b>0.021</b>	0.561	<b>0.014</b>	<b>0.018</b>	0.079	0.998	<b>0.013</b>	<b>0.026</b>	0.369	0.071	0.066	NA	<b>0.008</b>



Pop\Loc		008	023	002	008A	037	004	024	062	113	166	284	357	368	389	430	453	601	634	652	688	797	853	878	967
CSL	N	42	42	42	42	42	19	36	38	23	0	39	30	7	25	37	37	0	0	38	37	28	37	36	30
	Na	14	18	8	12	8	5	12	10	6	0	9	4	9	7	6	5	0	0	9	22	22	7	5	6
	Ne	7.16	10.59	4.65	6.40	4.61	3.44	8.02	5.09	3.41	0.00	5.34	2.84	8.17	1.95	1.65	2.66	0.00	0.00	5.65	14.96	15.84	2.44	1.26	3.02
	Ho	0.881	0.929	0.905	0.881	0.738	0.842	0.556	0.737	0.304	0.000	0.718	0.633	1.000	0.480	0.324	0.649	0.000	0.000	0.737	0.973	0.679	0.568	0.194	0.567
	He	0.860	0.906	0.785	0.844	0.783	0.709	0.875	0.804	0.707	0.000	0.813	0.648	0.878	0.487	0.393	0.623	0.000	0.000	0.823	0.933	0.937	0.589	0.207	0.669
	R	7.7	9.4	5.7	7.4	5.3	4.6	7.9	6.6	4.9	0	6.0	3.8	9.0	4.3	3.6	3.7	0	0	6.3	11.1	11.6	4.2	2.6	4.8
	p	0.354	0.978	0.359	0.365	<b>0.001</b>	0.625	<b>0.001</b>	0.898	<b>0.000</b>	NA	0.720	0.072	0.682	1.000	0.152	0.724	NA	NA	0.727	0.536	<b>0.001</b>	0.459	0.070	<b>0.000</b>
GY	N	35	35	35	35	35	27	25	30	23	25	25	27	28	33	27	23	24	25	23	32	23	31	35	30
	Na	16	16	7	12	8	6	12	10	7	6	9	6	15	6	4	7	7	28	9	19	18	9	3	7
	Ne	7.00	10.79	3.88	6.52	4.10	3.76	8.99	6.10	3.38	2.87	5.43	4.30	9.99	2.24	1.26	2.89	2.34	21.19	4.04	13.47	11.63	3.94	1.06	2.96
	Ho	0.914	0.971	0.857	0.857	0.829	0.704	0.520	0.633	0.391	0.680	0.560	0.704	0.714	0.273	0.111	0.435	0.583	1.000	0.609	0.906	0.826	0.548	0.057	0.300
	He	0.857	0.907	0.742	0.847	0.756	0.734	0.889	0.836	0.704	0.651	0.816	0.767	0.900	0.554	0.206	0.654	0.572	0.953	0.752	0.926	0.914	0.746	0.056	0.662
	R	8.2	9.4	4.8	7.3	5.4	4.6	8.7	7.1	4.9	4.6	6.5	4.8	9.3	4.1	2.5	4.6	4.5	13.1	5.5	10.7	10.5	5.4	1.4	5.0
	p	<b>0.004</b>	0.159	0.354	0.376	0.705	0.906	<b>0.001</b>	0.111	<b>0.000</b>	0.959	<b>0.003</b>	<b>0.002</b>	0.422	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.504	0.783	0.207	0.512	0.816	<b>0.000</b>	0.999	<b>0.000</b>
OC	N	49	49	49	49	49	40	46	46	30	0	45	40	36	43	46	40	0	29	37	46	32	45	46	39
	Na	17	15	7	12	8	7	14	13	7	0	9	5	14	8	5	5	0	19	10	24	26	5	5	5
	Ne	6.30	10.42	4.13	6.15	4.18	4.54	9.38	6.19	2.33	0.00	4.05	4.18	9.49	1.91	1.48	2.50	0.00	7.22	4.06	15.56	14.95	3.05	1.09	1.62
	Ho	0.816	0.918	0.694	0.878	0.816	0.825	0.696	0.761	0.300	0.000	0.867	0.675	0.861	0.395	0.283	0.775	0.000	0.724	0.811	0.870	0.844	0.711	0.087	0.359
	He	0.841	0.904	0.758	0.837	0.761	0.780	0.893	0.838	0.571	0.000	0.753	0.761	0.895	0.475	0.323	0.601	0.000	0.861	0.754	0.936	0.933	0.672	0.085	0.384
	R	8.0	9.1	5.0	7.1	4.9	5.2	8.7	7.4	4.3	0	5.2	4.5	8.8	4.1	3.0	3.6	0	8.8	5.8	11.1	11.4	4.3	1.7	3.0
	p	0.232	0.995	0.914	0.948	0.993	0.389	<b>0.001</b>	0.128	<b>0.000</b>	NA	<b>0.024</b>	0.082	<b>0.003</b>	0.115	<b>0.032</b>	0.421	NA	<b>0.001</b>	<b>0.000</b>	<b>0.040</b>	0.213	0.620	1.000	<b>0.000</b>
MZ	N	32	32	32	32	32	18	11	2	10	28	27	9	22	25	27	28	22	1	28	11	22	29	0	26
	Na	15	11	7	9	6	6	10	4	5	8	8	6	13	7	7	5	8	2	5	12	19	3	0	6
	Ne	6.54	8.87	3.98	5.55	3.64	3.39	6.54	4.00	2.70	3.40	4.08	3.52	9.31	2.55	1.94	2.57	2.33	2.00	3.64	9.31	13.44	1.60	0.00	1.39
	Ho	0.844	0.875	0.688	0.875	0.781	0.556	0.818	1.000	0.400	0.679	0.704	0.889	0.773	0.440	0.481	0.536	0.545	1.000	0.679	0.636	0.955	0.483	0.000	0.231
	He	0.847	0.887	0.749	0.820	0.725	0.705	0.847	0.750	0.630	0.706	0.755	0.716	0.893	0.608	0.485	0.610	0.571	0.500	0.725	0.893	0.926	0.374	0.000	0.278
	R	7.6	8.2	4.8	6.4	4.7	4.6	8.5	4.0	4.6	5.4	5.1	5.7	9.0	5.1	4.4	3.8	5.2	2.0	4.5	10.1	11.1	2.3	0	3.1
	p	0.225	0.871	0.936	<b>0.002</b>	0.944	0.649	0.827	0.423	0.251	<b>0.003</b>	<b>0.000</b>	0.948	0.541	<b>0.003</b>	0.054	<b>0.000</b>	0.294	NA	<b>0.000</b>	0.487	0.277	0.402	NA	0.734



Pop\Loc		008	023	002	008A	037	004	024	062	113	166	284	357	368	389	430	453	601	634	652	688	797	853	878	967
PM	N	8	8	8	8	8	8	5	8	8	3	5	8	5	8	6	5	3	7	7	7	3	6	0	7
	Na	9	7	4	6	5	6	5	6	3	5	6	8	7	2	4	3	4	14	5	10	6	4	0	4
	Ne	6.40	5.12	3.28	4.27	3.56	4.13	3.13	4.57	2.17	4.50	5.00	5.82	6.25	2.00	2.77	1.52	3.00	14.00	3.38	8.17	6.00	2.06	0.00	3.27
	Ho	0.875	0.875	0.750	1.000	0.875	0.875	0.600	0.625	0.375	1.000	1.000	0.625	1.000	1.000	0.833	0.400	0.667	1.000	0.571	1.000	1.000	0.667	0.000	0.571
	He	0.844	0.805	0.695	0.766	0.719	0.758	0.680	0.781	0.539	0.778	0.800	0.828	0.840	0.500	0.639	0.340	0.667	0.929	0.704	0.878	0.833	0.514	0.000	0.694
	R	9.0	7.0	4.0	6.0	5.0	6.0	5.0	6.0	3.0	5.0	6.0	8.0	7.0	2.0	4.0	3.0	4.0	14.0	5.0	10.0	6.0	4.0	0	4.0
	p	0.890	0.525	0.306	0.833	0.811	0.691	0.744	0.450	0.557	0.532	0.704	0.173	0.680	NA	0.666	0.958	0.387	0.480	0.483	0.358	0.451	0.959	NA	0.146
PE	N	42	42	42	42	42	39	36	41	38	0	38	33	31	39	39	38	0	10	32	32	35	41	37	38
	Na	15	18	10	12	7	8	13	11	6	0	6	6	12	7	5	3	0	9	6	18	21	4	4	4
	Ne	8.93	9.83	4.53	7.72	4.42	3.89	8.53	4.52	2.61	0.00	3.45	4.30	8.18	1.60	1.58	2.21	0.00	6.45	3.65	9.44	14.41	1.10	1.12	2.16
	Ho	0.786	0.952	0.690	0.833	0.952	0.641	0.667	0.659	0.237	0.000	0.658	0.848	0.774	0.333	0.359	0.553	0.000	0.600	0.750	0.813	0.857	0.073	0.054	1.000
	He	0.888	0.898	0.779	0.870	0.774	0.743	0.883	0.779	0.617	0.000	0.710	0.768	0.878	0.375	0.369	0.547	0.000	0.845	0.726	0.894	0.931	0.094	0.104	0.538
	R	8.7	9.2	5.3	7.9	5.4	5.3	8.3	6.3	4.4	0	4.1	4.8	8.4	3.5	3.1	2.6	0	8.1	4.4	9.2	11.0	1.7	1.8	2.6
	p	<b>0.005</b>	<b>0.000</b>	0.957	0.337	0.090	0.194	<b>0.049</b>	<b>0.006</b>	<b>0.000</b>	NA	0.581	0.702	0.058	0.430	<b>0.000</b>	0.683	NA	<b>0.040</b>	0.551	<b>0.000</b>	<b>0.001</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
EC	N	49	49	49	49	49	48	25	22	8	22	15	27	14	27	42	32	28	41	44	44	26	25	38	31
	Na	18	16	9	12	8	8	12	13	7	9	6	14	10	6	16	9	7	34	11	21	24	5	13	6
	Ne	10.07	9.09	4.15	7.73	4.67	3.59	7.14	8.64	4.92	4.44	3.95	6.54	7.40	2.44	11.88	2.94	1.97	16.98	2.25	15.55	18.03	1.94	6.35	1.58
	Ho	0.898	0.837	0.694	0.837	0.857	0.625	0.560	0.818	0.250	0.864	0.467	0.667	0.714	0.593	0.762	0.531	0.464	0.878	0.500	0.864	0.769	0.600	0.684	0.290
	He	0.901	0.890	0.759	0.871	0.786	0.721	0.860	0.884	0.797	0.775	0.747	0.847	0.865	0.590	0.916	0.660	0.492	0.941	0.555	0.936	0.945	0.485	0.842	0.365
	R	9.1	8.7	5.2	7.6	5.3	4.8	8.0	8.8	7.0	6.3	5.1	8.1	8.2	4.3	9.8	5.1	4.3	11.9	4.2	11.0	12.2	3.3	8.0	3.6
	P	<b>0.012</b>	<b>0.009</b>	0.589	0.987	0.496	0.161	<b>0.001</b>	0.963	<b>0.007</b>	0.312	<b>0.001</b>	0.366	0.554	0.197	<b>0.009</b>	<b>0.011</b>	<b>0.004</b>	0.971	<b>0.000</b>	0.136	<b>0.001</b>	<b>0.000</b>	<b>0.002</b>	<b>0.003</b>
TI	N	28	28	28	28	28	22	20	14	2	21	20	11	3	23	4	23	27	6	14	13	11	24	0	23
	Na	12	17	6	10	6	7	12	10	3	7	10	8	5	6	5	5	8	7	6	17	14	6	0	4
	Ne	5.64	10.45	3.81	5.70	3.61	4.10	9.09	6.43	2.67	3.51	6.96	6.54	4.50	2.91	4.00	4.10	1.87	5.14	3.44	14.08	11.00	2.95	0.00	2.43
	Ho	0.679	0.964	0.714	0.821	0.750	0.818	0.600	0.643	0.500	0.810	0.800	0.636	0.667	0.522	0.750	0.652	0.407	0.500	0.429	0.846	0.818	0.375	0.000	0.565
	He	0.823	0.904	0.737	0.825	0.723	0.756	0.890	0.844	0.625	0.715	0.856	0.847	0.778	0.656	0.750	0.756	0.466	0.806	0.709	0.929	0.909	0.661	0.000	0.589
	R	7.4	9.7	4.8	6.6	4.4	5.2	8.9	7.8	3.0	5.3	7.6	7.3	5.0	5.0	5.0	4.6	4.6	7.0	5.1	12.4	11.4	4.5	0	3.4
	p	<b>0.000</b>	0.794	0.630	<b>0.001</b>	<b>0.048</b>	0.839	<b>0.019</b>	<b>0.004</b>	0.261	0.996	0.058	0.250	0.285	0.087	0.349	<b>0.003</b>	<b>0.001</b>	0.226	0.190	0.355	0.425	<b>0.001</b>	NA	0.286



Pop\Loc		008	023	002	008A	037	004	024	062	113	166	284	357	368	389	430	453	601	634	652	688	797	853	878	967
HW	N	32	32	32	32	32	30	22	19	19	31	30	21	29	30	30	31	28	15	28	10	27	30	0	30
	Na	11	18	9	12	11	7	14	10	5	7	9	8	12	5	6	4	12	14	8	15	19	3	0	5
	Ne	7.29	10.78	4.72	6.11	5.48	4.42	8.88	5.08	3.39	2.17	5.31	4.48	7.38	2.49	1.87	3.31	3.28	6.52	4.75	11.76	14.16	2.00	0.00	1.42
	Ho	0.906	0.906	0.750	0.844	0.844	0.667	0.636	0.737	0.263	0.452	0.833	0.810	0.655	0.533	0.433	0.839	0.607	0.800	0.679	0.800	0.852	0.600	0.000	0.233
	He	0.863	0.907	0.788	0.836	0.817	0.774	0.887	0.803	0.705	0.539	0.812	0.777	0.864	0.598	0.464	0.698	0.695	0.847	0.790	0.915	0.929	0.499	0.000	0.296
	R	7.7	9.7	5.8	7.3	6.3	5.1	8.8	7.3	4.3	4.6	6.4	6.0	8.0	3.5	4.0	3.9	6.3	9.5	5.6	12.6	11.0	2.9	0	3.0
	p	0.654	0.547	0.982	<b>0.005</b>	<b>0.002</b>	<b>0.001</b>	0.641	0.202	<b>0.000</b>	0.662	0.691	0.090	<b>0.017</b>	<b>0.003</b>	0.884	0.155	<b>0.004</b>	0.503	<b>0.030</b>	0.150	0.056	0.202	Na	0.514
JP	N	32	33	33	33	33	0	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	21	0
	Na	14	16	7	10	8	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	4	0
	Ne	6.94	9.19	4.27	5.69	5.21	0.00	8.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.00	0.00	1.42	0.00
	Ho	0.906	0.939	0.818	0.879	0.727	0.000	0.789	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.143	0.000
	He	0.856	0.891	0.766	0.824	0.808	0.000	0.875	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.750	0.000	0.294	0.000
	R	7.9	8.8	5.0	6.8	6.0	0	8.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4.0	0	2.9	0
	p	0.902	0.995	0.944	0.642	<b>0.001</b>	NA	0.838	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.423	NA	<b>0.002</b>
NC	N	32	32	32	32	32	29	28	24	30	20	13	20	21	29	17	20	31	11	20	11	22	26	1	25
	Na	12	11	6	12	9	7	10	12	9	8	7	8	16	6	6	5	11	14	6	16	19	8	2	7
	Ne	7.50	7.67	4.32	6.42	3.75	4.93	7.13	5.82	4.22	3.23	5.54	5.37	10.89	2.24	3.75	2.48	2.03	12.10	2.95	12.74	12.41	3.48	2.00	2.13
	Ho	0.813	0.938	0.750	1.000	0.844	0.793	0.357	0.708	0.467	0.750	0.846	0.500	0.714	0.241	0.706	0.750	0.548	0.909	0.600	0.818	0.818	0.615	1.000	0.560
	He	0.867	0.870	0.769	0.844	0.733	0.797	0.860	0.828	0.763	0.690	0.820	0.814	0.908	0.554	0.734	0.598	0.508	0.917	0.661	0.921	0.919	0.712	0.500	0.530
	R	7.8	7.5	5.0	7.8	5.5	5.9	7.4	7.5	5.8	5.5	6.4	6.3	10.0	4.2	4.7	3.8	5.2	11.7	4.8	12.6	10.8	5.3	2.0	3.8
	p	0.639	0.695	0.473	0.054	0.992	0.866	<b>0.000</b>	0.493	<b>0.000</b>	0.994	<b>0.032</b>	0.076	<b>0.021</b>	<b>0.000</b>	0.965	0.711	0.979	0.325	0.249	0.236	0.135	0.361	NA	0.144
IND	N	64	64	64	64	64	54	37	55	37	32	33	51	54	55	45	50	32	49	53	52	54	44	19	61
	Na	18	20	9	12	8	8	13	14	6	8	10	8	17	13	17	8	9	44	8	24	34	10	10	9
	Ne	7.91	10.15	4.77	6.45	4.07	4.37	8.30	8.61	3.54	4.09	7.19	5.33	8.92	3.72	4.16	3.47	2.95	18.98	4.89	16.90	24.61	4.02	2.77	3.18
	Ho	0.844	0.891	0.797	0.875	0.813	0.741	0.432	0.655	0.351	0.875	0.697	0.686	0.778	0.564	0.644	0.540	0.813	0.816	0.604	0.865	0.870	0.523	0.421	0.541
	He	0.874	0.901	0.791	0.845	0.754	0.771	0.879	0.884	0.718	0.755	0.861	0.812	0.888	0.731	0.760	0.712	0.661	0.947	0.795	0.941	0.959	0.752	0.639	0.686
	R	12.5	13.8	7.4	9.5	6.5	6.6	10.9	11.9	5.2	7.1	9.1	7.2	13.6	9.0	12.9	6.7	7.4	24.5	6.8	18.0	22.7	8.3	10	7.7
	p	0.336	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.001</b>	0.969	0.634	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.269	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.002</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.018</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.546	<b>0.016</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>





Pop\Loc		008	023	002	008A	037	004	024	062	113	166	284	357	368	389	430	453	601	634	652	688	797	853	878	967
TA	N	32	32	32	32	32	25	22	29	28	26	24	24	27	31	20	26	25	18	27	27	25	24	0	30
	Na	15	14	8	11	7	7	10	10	6	8	9	7	13	3	6	3	8	21	6	20	17	6	0	6
	Ne	7.01	7.45	4.81	5.66	4.10	4.42	6.68	5.41	3.72	4.39	6.94	4.78	8.89	1.79	1.74	2.02	3.03	12.71	3.24	13.25	13.02	2.43	0.00	1.91
	Ho	0.813	0.906	0.813	0.813	0.813	0.760	0.455	0.724	0.393	0.962	0.667	0.667	0.963	0.548	0.350	0.538	0.840	0.722	0.556	0.815	0.880	0.625	0.000	0.400
	He	0.857	0.866	0.792	0.823	0.756	0.774	0.850	0.815	0.732	0.772	0.856	0.791	0.888	0.443	0.424	0.506	0.670	0.921	0.691	0.925	0.923	0.588	0.000	0.477
	R	8.0	8.1	5.6	6.8	5.2	5.4	7.1	6.7	4.5	5.7	7.2	6.1	8.6	2.4	4.1	2.9	4.9	11.8	4.1	10.8	10.7	4.0	0	3.8
	p	<b>0.001</b>	0.054	0.169	<b>0.001</b>	0.905	0.405	<b>0.009</b>	0.594	<b>0.001</b>	0.275	<b>0.000</b>	<b>0.008</b>	0.187	<b>0.000</b>	0.292	0.359	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	0.534	<b>0.029</b>	<b>0.015</b>	0.881	Na	0.831
RE	N	9	9	9	9	9	7	6	8	9	6	9	8	9	9	7	9	7	9	8	8	7	8	9	9
	Na	10	13	6	7	4	4	7	8	3	4	7	7	10	4	3	4	4	13	6	11	8	3	2	5
	Ne	7.04	10.80	4.26	5.79	3.52	3.38	5.54	6.40	2.42	1.71	6.00	5.12	8.10	2.28	1.78	3.24	2.18	9.53	5.12	8.53	5.76	2.46	1.12	2.79
	Ho	0.778	1.000	0.556	1.000	0.889	0.714	0.667	0.750	0.222	0.500	0.778	0.750	0.778	0.333	0.571	0.556	0.714	1.000	0.875	1.000	0.857	0.250	0.111	0.222
	He	0.858	0.907	0.765	0.827	0.716	0.704	0.819	0.844	0.586	0.417	0.833	0.805	0.877	0.562	0.439	0.691	0.541	0.895	0.805	0.883	0.827	0.594	0.105	0.642
	R	9.4	12.0	5.8	6.8	4.0	4.0	7.0	8.0	3.0	4.0	6.9	7.0	9.4	3.9	3.0	3.9	4.0	11.9	6.0	11.0	8.0	3.0	1.9	5.0
	p	0.412	0.431	0.353	0.695	0.423	0.365	0.293	0.201	0.058	0.995	0.657	0.181	0.703	0.113	0.772	0.716	0.904	0.891	<b>0.006</b>	0.766	0.791	<b>0.024</b>	1.000	<b>0.002</b>
SE	N	23	23	23	23	23	22	9	18	0	0	0	19	18	15	18	15	0	22	18	17	22	12	10	22
	Ne	6.96	10.08	4.56	6.83	3.78	4.40	1.42	10.45	0.00	0.00	0.00	3.21	1.82	6.92	12.00	6.72	0.00	16.13	1.83	15.62	12.41	3.84	7.14	4.38
	Ho	0.913	0.826	0.870	0.913	0.783	0.727	0.222	0.500	0.000	0.000	0.000	0.684	0.500	0.733	1.000	0.533	0.000	0.818	0.556	0.882	0.864	0.500	0.700	0.864
	He	0.856	0.901	0.781	0.853	0.735	0.773	0.296	0.904	0.000	0.000	0.000	0.688	0.449	0.856	0.917	0.851	0.000	0.938	0.452	0.936	0.919	0.740	0.860	0.772
	R	7.9	9.5	6.1	7.8	4.5	5.4	3.7	9.8	0	0	0	3.7	3.5	8.4	10.5	7.2	0	12.8	2.7	12.3	10.6	5.4	8.9	5.1
	p	0.971	0.816	<b>0.002</b>	0.887	0.762	0.686	<b>0.006</b>	<b>0.003</b>	NA	NA	NA	0.655	0.913	0.089	0.599	<b>0.050</b>	NA	<b>0.049</b>	0.506	0.167	0.562	<b>0.022</b>	<b>0.014</b>	0.238
	ATL	N	158	162	152	147	143	101	70	128	73	63	67	71	120	129	127	117	65	65	103	104	83	107	47
Na		24	22	10	14	10	10	14	16	9	11	9	10	19	14	16	8	10	35	11	25	40	8	7	10
Ne		8.15	11.23	3.52	6.41	4.75	4.53	9.80	9.37	3.77	4.13	5.79	4.84	11.54	4.20	5.05	2.96	2.16	17.90	5.81	18.78	22.51	2.39	1.85	3.70
Ho		0.854	0.889	0.691	0.857	0.769	0.762	0.586	0.695	0.342	0.794	0.746	0.648	0.692	0.643	0.535	0.547	0.462	0.846	0.680	0.894	0.892	0.505	0.383	0.472
He		0.877	0.911	0.716	0.844	0.789	0.779	0.898	0.893	0.734	0.758	0.827	0.793	0.913	0.762	0.802	0.662	0.538	0.944	0.828	0.947	0.956	0.582	0.459	0.729
R		12.6	13.2	6.4	9.9	7.0	7.0	11.7	12.6	7.4	8.1	8.1	7.8	14.1	9.6	11.5	5.0	5.5	21.2	7.9	18.0	21.5	5.5	5.6	8.2
p		0.786	0.935	0.177	0.409	<b>0.000</b>	0.989	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.003</b>	<b>0.049</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>



Pop\Loc		008	023	002	008A	037	004	024	062	113	166	284	357	368	389	430	453	601	634	652	688	797	853	878	967
SA	N	0	0	0	0	0	9	11	8	8	8	10	9	8	11	10	10	8	8	10	7	7	5	0	9
	Na	0	0	0	0	0	5	8	6	5	6	5	6	9	4	5	4	3	11	3	7	5	5	0	6
	Ne	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.79	4.57	4.92	3.46	3.76	4.44	5.23	7.11	2.37	3.08	2.04	1.91	8.00	2.82	5.16	3.50	4.17	0.00	4.26
	Ho	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.364	0.875	0.500	0.750	0.800	0.778	0.625	0.727	0.500	0.500	0.625	0.625	0.700	1.000	0.714	0.800	0.000	0.556
	He	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.642	0.781	0.797	0.711	0.734	0.775	0.809	0.859	0.579	0.675	0.510	0.477	0.875	0.645	0.806	0.714	0.760	0.000	0.765
	R	0	0	0	0	0	4.7	6.8	6.0	5.0	6.0	5.0	6.0	9.0	3.4	4.8	3.6	3.0	11.0	3.0	7.0	5.0	5.0	0	5.9
	p	NA	NA	NA	NA	NA	0.472	<b>0.006</b>	0.287	<b>0.032</b>	<b>0.021</b>	0.220	0.159	0.087	0.752	<b>0.008</b>	0.975	0.647	0.062	0.372	0.140	0.301	<b>0.029</b>	NA	0.052
DK	N	39	39	39	39	39	33	14	38	0	0	0	22	24	30	32	26	0	26	35	29	23	24	24	33
	Na	13	17	7	11	9	7	11	14	0	0	0	6	4	12	15	6	0	23	8	19	20	6	4	6
	Ne	6.29	10.31	3.28	5.18	5.71	4.43	8.52	9.82	0.00	0.00	0.00	3.18	2.25	7.63	11.13	3.94	0.00	12.40	2.98	13.35	14.69	2.65	1.19	4.21
	Ho	0.846	0.974	0.615	0.872	0.744	0.848	0.786	0.605	0.000	0.000	0.000	0.818	0.417	0.900	0.688	0.615	0.000	0.923	0.714	0.828	0.913	0.458	0.167	0.879
	He	0.841	0.903	0.695	0.807	0.825	0.774	0.883	0.898	0.000	0.000	0.000	0.686	0.556	0.869	0.910	0.746	0.000	0.919	0.665	0.925	0.932	0.623	0.157	0.763
	R	7.2	9.3	4.9	6.5	6.2	5.3	9.0	9.1	0	0	0	4.6	3.6	8.0	9.8	4.8	0	11.1	4.8	10.7	11.5	4.3	2.2	5.0
	p	0.733	0.499	0.314	<b>0.000</b>	0.014	0.349	0.343	<b>0.000</b>	NA	NA	NA	0.619	<b>0.022</b>	<b>0.003</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	NA	0.281	<b>0.000</b>	<b>0.026</b>	0.105	<b>0.001</b>	1.000	<b>0.000</b>
GM	N	24	24	24	24	24	0	0	23	0	0	0	0	17	14	18	19	0	0	0	18	0	14	17	16
	Na	14	14	6	11	7	0	0	10	0	0	0	0	11	4	5	3	0	0	0	19	0	5	5	6
	Ne	6.51	9.29	3.68	6.16	4.27	0.00	0.00	6.49	0.00	0.00	0.00	0.00	7.41	1.84	1.95	2.33	0.00	0.00	0.00	14.09	0.00	3.92	1.89	3.26
	Ho	0.750	0.917	0.833	0.917	0.917	0.000	0.000	0.696	0.000	0.000	0.000	0.000	0.765	0.286	0.222	0.579	0.000	0.000	0.000	0.833	0.000	0.500	0.529	0.375
	He	0.846	0.892	0.728	0.838	0.766	0.000	0.000	0.846	0.000	0.000	0.000	0.000	0.865	0.457	0.488	0.571	0.000	0.000	0.000	0.929	0.000	0.745	0.471	0.693
	R	7.9	9.0	4.7	7.5	5.4	0	0	7.5	0	0	0	0	8.3	3.5	3.9	3.0	0	0	0	11.7	0	4.6	3.8	4.9
	p	0.993	0.293	0.520	0.826	0.369	NA	NA	0.389	NA	NA	NA	NA	0.235	0.242	<b>0.000</b>	0.606	NA	NA	NA	0.361	NA	0.127	0.267	<b>0.008</b>
CA	N	32	32	32	31	32	26	24	25	27	27	27	24	21	25	21	26	23	11	22	25	26	24	0	29
	Na	17	15	7	12	8	8	11	13	7	8	9	7	13	8	7	4	5	15	7	20	20	3	0	6
	Ne	7.97	11.25	3.72	5.51	4.47	4.39	8.66	8.99	3.19	3.81	6.75	4.30	8.65	3.02	4.12	2.26	2.30	12.74	3.53	15.63	13.66	1.62	0.00	2.29
	Ho	0.844	0.813	0.719	0.774	0.750	0.654	0.542	0.760	0.296	0.778	0.704	0.458	0.857	0.720	0.619	0.577	0.652	1.000	0.591	0.960	0.962	0.500	0.000	0.276
	He	0.875	0.911	0.731	0.818	0.776	0.772	0.885	0.889	0.687	0.737	0.852	0.767	0.884	0.669	0.757	0.558	0.565	0.921	0.717	0.936	0.927	0.385	0.000	0.564
	R	8.8	9.7	4.7	7.5	5.3	5.4	8.3	8.8	5.1	5.3	7.0	5.6	9.1	4.7	5.8	3.2	3.3	12.2	5.2	11.6	11.1	2.3	0	4.1
	p	0.823	0.232	0.973	0.512	<b>0.002</b>	0.748	0.089	0.473	<b>0.000</b>	<b>0.024</b>	<b>0.015</b>	<b>0.024</b>	0.166	<b>0.002</b>	<b>0.000</b>	0.693	0.947	0.694	<b>0.021</b>	0.690	0.919	0.446	NA	<b>0.000</b>



Pop\Loc		008	023	002	008A	037	004	024	062	113	166	284	357	368	389	430	453	601	634	652	688	797	853	878	967	
COL	N	19	15	20	17	16	0	0	3	8	0	0	0	15	13	7	4	0	10	0	0	0	0	0	6	14
	Na	13	10	6	9	6	0	0	3	4	0	0	0	9	4	4	3	0	11	0	0	0	0	0	2	6
	Ne	6.50	6.82	3.46	6.49	4.49	0.00	0.00	2.57	3.88	0.00	0.00	0.00	5.17	1.87	2.97	2.13	0.00	10.53	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.95	2.72
	Ho	0.842	1.000	0.700	0.882	0.625	0.000	0.000	0.333	0.125	0.000	0.000	0.000	0.867	0.462	0.429	0.250	0.000	0.800	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.833	0.214
	He	0.846	0.853	0.711	0.846	0.777	0.000	0.000	0.611	0.742	0.000	0.000	0.000	0.807	0.464	0.663	0.531	0.000	0.905	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.486	0.633
	R	8.3	7.8	4.8	7.2	5.2	0	0	3.0	4.0	0	0	0	7.0	3.2	4.0	3.0	0	10.3	0	0	0	0	0	2.0	5.2
	p	0.839	0.202	0.830	0.332	0.270	NA	NA	0.343	<b>0.007</b>	NA	NA	NA	0.965	0.987	0.051	0.245	NA	0.084	NA	NA	NA	NA	NA	0.363	<b>0.003</b>
EU	N	31	38	23	23	18	22	15	27	22	24	20	10	27	23	28	22	29	6	25	14	22	30	0	32	
	Na	17	15	6	11	7	7	11	12	6	7	7	9	12	8	8	5	7	8	9	13	13	4	0	5	
	Ne	8.32	9.86	3.38	6.53	4.00	4.36	9.00	4.64	2.32	3.56	3.56	6.90	9.11	3.79	3.07	3.37	1.39	6.55	3.40	10.05	10.76	1.98	0.00	1.57	
	Ho	0.935	0.895	0.652	0.957	0.778	0.636	0.600	0.704	0.409	0.875	0.700	0.700	0.704	0.478	0.643	0.591	0.276	0.500	0.760	0.929	0.909	0.433	0.000	0.375	
	He	0.880	0.899	0.704	0.847	0.750	0.771	0.889	0.785	0.568	0.719	0.719	0.855	0.890	0.736	0.674	0.704	0.282	0.847	0.706	0.901	0.907	0.496	0.000	0.364	
	R	8.9	8.8	5.1	7.5	5.4	5.2	8.9	6.6	3.4	5.7	5.2	8.3	8.6	5.5	4.9	4.2	3.3	8.0	5.5	9.9	9.5	3.2	0	2.9	
	p	<b>0.002</b>	0.922	<b>0.001</b>	0.524	0.108	0.906	0.003	0.834	0.943	0.799	<b>0.045</b>	0.589	0.234	<b>0.000</b>	0.179	<b>0.035</b>	0.114	0.126	<b>0.027</b>	0.729	0.314	0.629	Na	1.000	
FL	N	13	14	14	13	14	11	6	4	8	4	10	6	8	13	11	10	5	4	11	11	5	10	0	9	
	Na	10	14	7	9	4	8	5	5	5	4	7	4	8	4	5	3	2	6	6	12	7	3	0	6	
	Ne	7.04	10.32	2.50	4.97	3.41	3.61	4.24	4.00	4.00	2.29	3.70	2.67	7.11	1.99	2.26	1.36	1.92	5.33	3.41	8.34	6.25	2.06	0.00	2.79	
	Ho	0.923	0.643	0.643	0.692	0.786	0.818	0.667	1.000	0.375	0.500	0.900	0.500	0.625	0.692	0.273	0.300	0.400	1.000	0.545	0.909	0.600	0.700	0.000	0.444	
	He	0.858	0.903	0.599	0.799	0.707	0.723	0.764	0.750	0.750	0.563	0.730	0.625	0.859	0.497	0.558	0.265	0.480	0.813	0.707	0.880	0.840	0.515	0.000	0.642	
	R	8.4	10.4	5.4	7.0	3.8	6.6	5.0	5.0	5.0	4.0	6.2	4.0	8.0	3.2	4.6	2.8	2.0	6.0	5.2	9.9	7.0	3.0	0	6.7	
	p	0.779	<b>0.034</b>	0.896	<b>0.038</b>	0.205	0.965	0.612	0.285	0.063	0.227	0.175	0.722	0.132	0.725	<b>0.040</b>	0.958	1.000	0.525	0.826	0.062	0.247	0.407	NA	0.166	
MED	N	46	46	46	46	46	0	0	46	0	0	0	0	43	39	42	29	0	0	0	40	0	37	42	35	
	Na	15	12	7	8	7	0	0	12	0	0	0	0	12	5	1	4	0	0	0	23	0	6	3	6	
	Ne	5.41	7.15	3.11	4.68	4.05	0.00	0.00	6.11	0.00	0.00	0.00	0.00	6.53	3.55	1.00	2.22	0.00	0.00	0.00	13.06	0.00	3.59	1.10	2.62	
	Ho	0.804	0.913	0.783	0.783	0.848	0.000	0.000	0.739	0.000	0.000	0.000	0.000	0.814	0.436	0.000	0.414	0.000	0.000	0.000	0.950	0.000	0.595	0.071	0.400	
	He	0.815	0.860	0.678	0.786	0.753	0.000	0.000	0.836	0.000	0.000	0.000	0.000	0.847	0.718	0.000	0.549	0.000	0.000	0.000	0.923	0.000	0.722	0.092	0.618	
	R	10.9	10.1	5.7	6.5	5.8	0	0	9.4	0	0	0	0	9.7	4.9	1.0	3.8	0	0	0	16.9	0	5.8	2.4	5.1	
	p	0.549	<b>0.014</b>	0.920	0.182	0.243	NA	NA	0.097	NA	NA	NA	NA	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	NA	<b>0.000</b>	NA	NA	NA	0.522	NA	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	



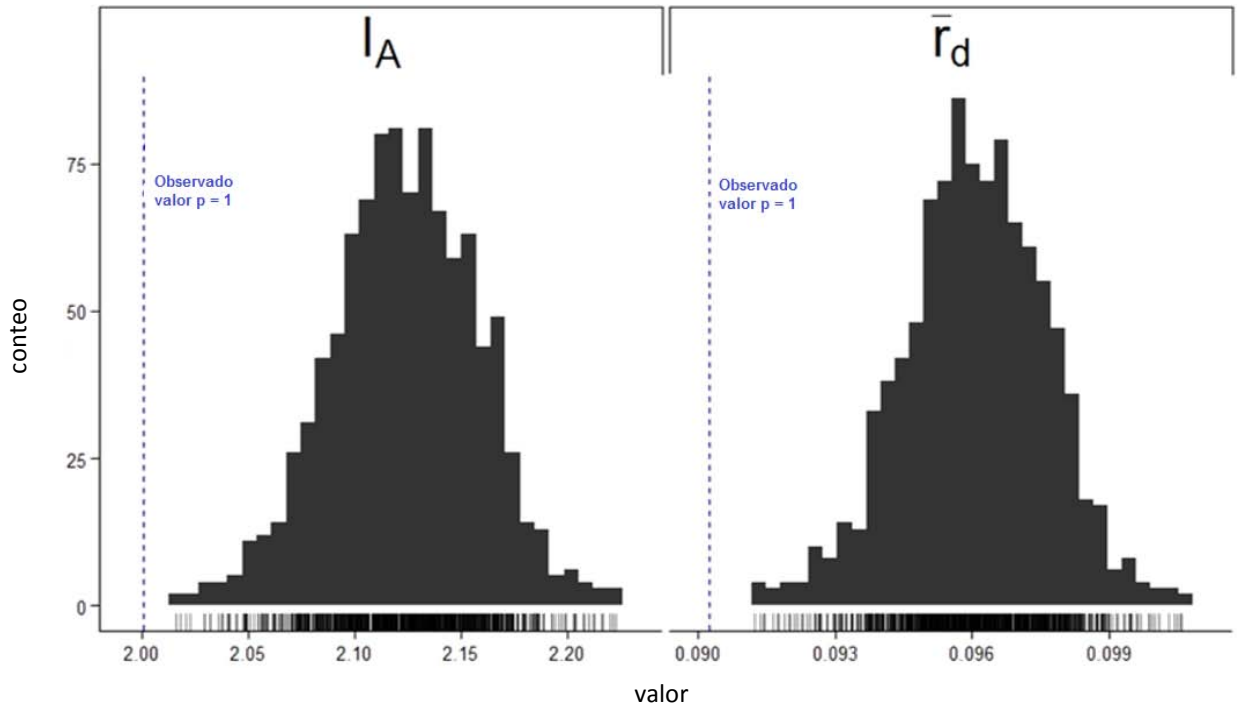
**ANEXO III.** Valores de los estadísticos de diversidad promediado para todas las localidades por cada *locus*. Ht: Heterocigocidad Total. He: Heterocigosis esperada promedio. Ho: Heterocigosis observada promedio. F, índices de fijación a diferente niveles. DE: Desviación estándar.

	<b>008</b>	<b>023</b>	<b>002</b>	<b>008A</b>	<b>037</b>	<b>004</b>	<b>024</b>	<b>062</b>	<b>113</b>	<b>166</b>	<b>284</b>	<b>357</b>	<b>368</b>	<b>389</b>	<b>430</b>	<b>453</b>	<b>601</b>	<b>634</b>	<b>652</b>	<b>688</b>	<b>797</b>	<b>853</b>	<b>878</b>	<b>967</b>
<b>Ht</b>	0.90	0.92	0.78	0.87	0.80	0.84	0.92	0.90	0.86	0.91	0.92	0.88	0.93	0.74	0.74	0.74	0.87	0.97	0.90	0.96	0.97	0.72	0.87	0.71
<b>He</b>	0.82	0.85	0.71	0.80	0.73	0.62	0.70	0.79	0.51	0.39	0.59	0.64	0.78	0.57	0.56	0.59	0.30	0.73	0.59	0.83	0.78	0.54	0.21	0.54
<b>Ho</b>	0.81	0.87	0.70	0.83	0.77	0.63	0.50	0.68	0.27	0.43	0.55	0.57	0.71	0.51	0.49	0.53	0.32	0.69	0.53	0.81	0.74	0.48	0.21	0.46
<b>Fis</b>	0.01	-0.02	0.01	-0.04	-0.06	-0.01	0.29	0.14	0.48	-0.08	0.07	0.10	0.09	0.11	0.13	0.10	-0.05	0.05	0.09	0.02	0.06	0.11	0.02	0.16
<b>Fit</b>	0.09	0.06	0.10	0.04	0.04	0.25	0.46	0.25	0.69	0.53	0.40	0.35	0.23	0.31	0.35	0.28	0.64	0.29	0.41	0.15	0.24	0.33	0.76	0.35
<b>Fst</b>	0.020	0.007	0.011	0.011	0.014	0.007	0.033	0.047	0.026	0.023	0.044	0.056	0.060	0.133	0.192	0.095	0.094	0.011	0.180	0.010	0.016	0.083	0.358	0.165
<b>D</b>	0.257	0.250	0.128	0.184	0.140	0.262	0.587	0.465	0.454	0.525	0.489	0.411	0.613	0.330	0.380	0.308	0.570	0.713	0.622	0.532	0.658	0.270	0.683	0.305

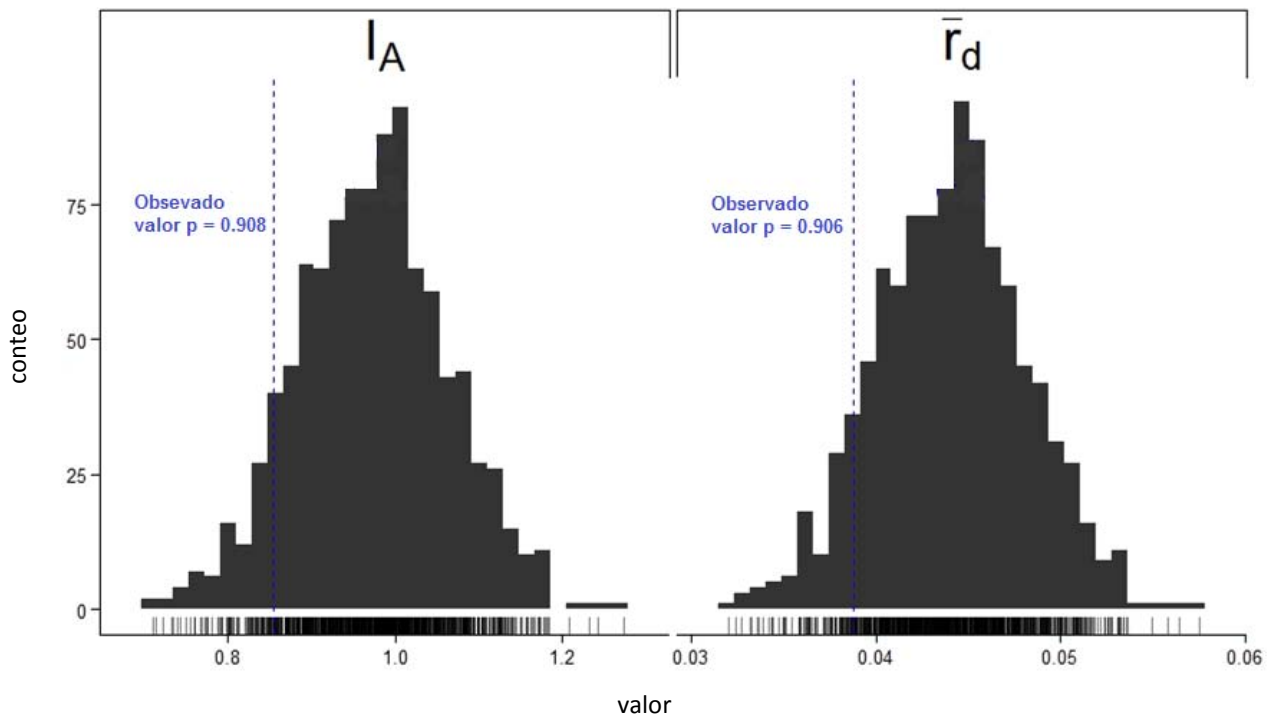


**ANEXO IV.** Prueba de desequilibrio de ligamiento por en cada Océano y Mar Mediterráneo.  
 $I_A$  índice de asociación.  $\bar{r}_d$

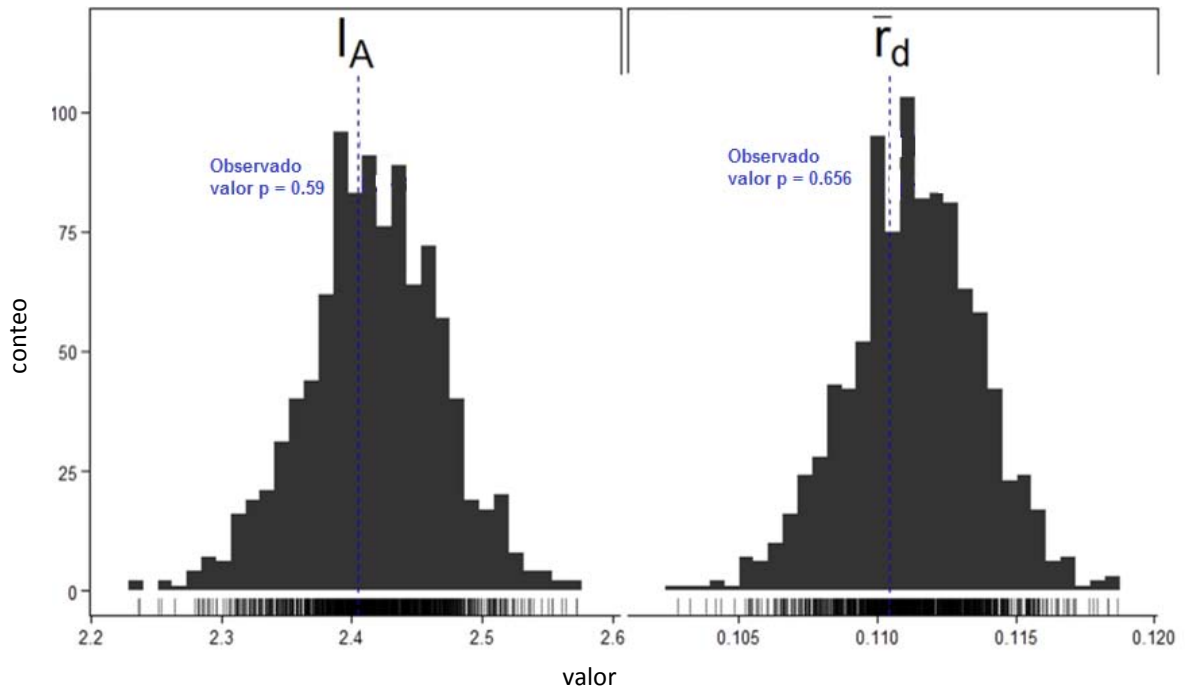
PACÍFICO



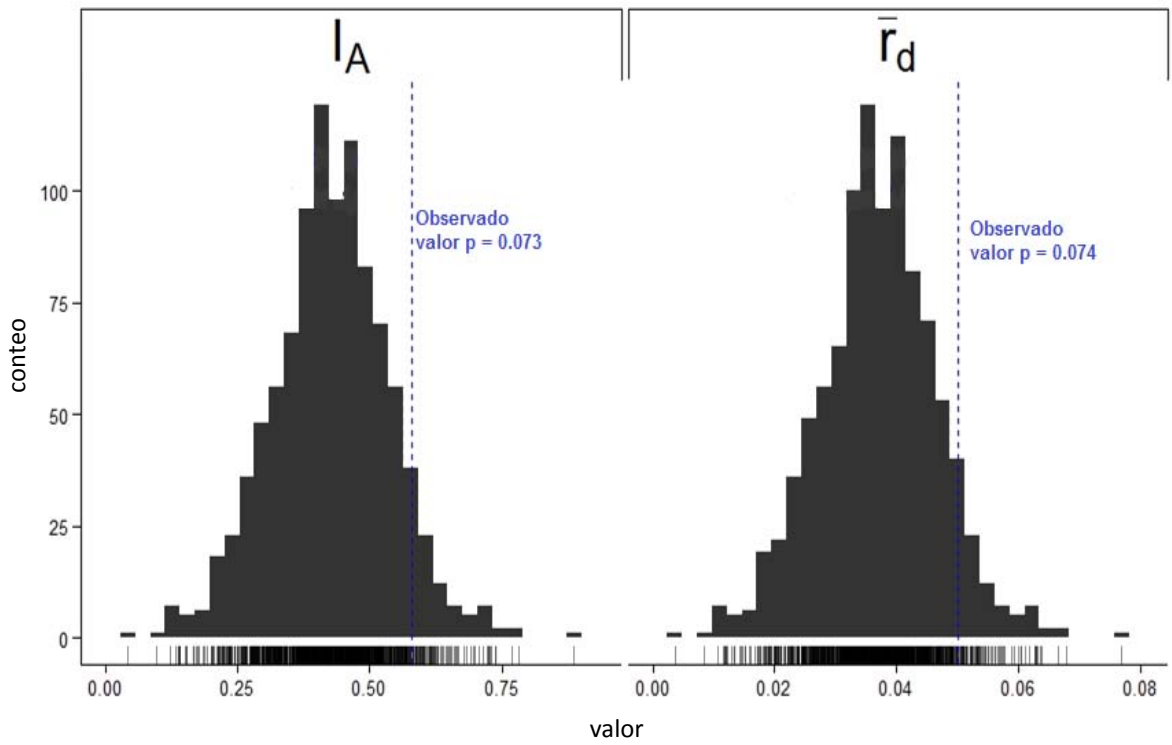
ÍNDICO



### ATLÁNTICO



### MEDITERRÁNEO



## ACTIVIDADES COMPLEMENTARIAS

### I. Semestre

- Curso de redacción de artículos en inglés impartido por la Dra. Ann Grant.
- Profesor asistente en el curso optativo de Introducción a la Ecología Molecular y Genética de la Conservación ofrecido por el Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

### II. Semestre

- NSF-funded workshop on next generation sequencing ofrecido por la American Genetic Association AGA del 19-22 de Julio en Irapuato-Guanajuato. México.

### III. Semestre

- Asistente al 2012 Workshop on Genomics and Advanced Topic Session About Biopython. Realizado en Český Krumlov, Republica Checa del 8 al 25 de enero de 2012
- Apoyo en el curso “Análisis de Fragmentos” organizado por el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología de la UNAM con la conferencia: “Análisis de fragmentos en el estudio de la distribución de la variación genética en peces pelágicos”

### IV. Semestre

- Asistente al curso: “RADseq methodologies for ecological and evolutionary genetic studies”. Organizado por el Graduate Research School in Genomic Ecology GENECO en la Universidad de Lund, Suecia. Del 15 al 19 de octubre de 2012.
- Presentación y aprobación de examen de candidatura sobre “Los peces pelágicos: Aspectos ambientales, evolutivos y herramientas moleculares aplicadas a su estudio. Con énfasis en el dorado *Coryphaena hippurus*”. Cuya defensa oral fue sustentada el día 20 de noviembre de 2012.

### V. Semestre

- Preparación de manuscrito

### VI. Semestre

- Manuscrito:



DIAZ-JAIMES P, **BAYONA-VÁSQUEZ N**, HINOJOSA-ALVAREZ S, URIBE-ALCOCER M & MARCET-HOUBEN M. 2014. The complete mitogenome of the common dolphinfish *Coryphaena hippurus*. Mitochondrial DNA. Early Online 1-2.

## VII. Semestre

- Examen de posesión del idioma Inglés aprobado
- Estancia académica de investigación en University of Georgia en el laboratorio del Dr. Travis Glenn

## VIII. Semestre

- Manuscrito:  
**BAYONA-VÁSQUEZ N**, DIAZ-JAIMES P & URIBE-ALCOCER M. 2014. Isolation and characterization of microsatellite loci in the common dolphinfish *Coryphaena hippurus* (Perciformes: Coryphaenidae) from net generation sequencing and cross amplification in pompano dolphinfish. Conservation Genet Resour. DOI 10.1007/s12686-014-0372-8
- Tesis

