



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL DEL
PEZ VELA *Istiophorus platypterus* (SHAW IN
SHAW & NODDER, 1792)**

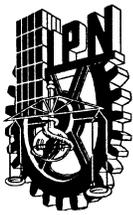
TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS**

PRESENTA

GRISELMA GUADALUPE RUBIO CASTRO

LA PAZ, B.C.S., JUNIO DE 2016



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 11 del mes de Mayo del 2016 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

"ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL DEL PEZ VELA *Istiophorus platypterus*
(SHAW IN SHAW & NODDER, 1792)"

Presentada por el alumno:

RUBIO Apellido paterno	CASTRO materno	GRISSELMA GUADALUPE nombre(s)
Con registro:		
A	1	2
0	4	0
5		

Aspirante de:

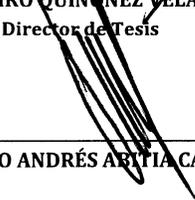
DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

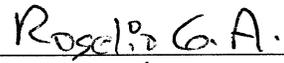
LA COMISION REVISORA

Directores de Tesis


 DR. CASIMIRO QUIÑONEZ VELÁZQUEZ
 Director de Tesis

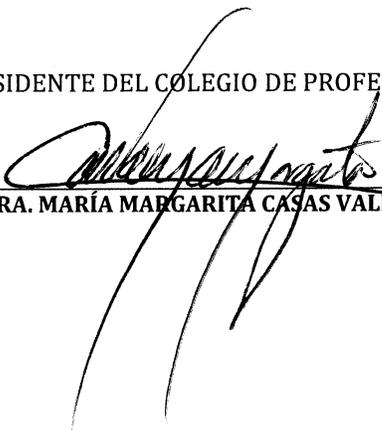

 DR. LEONARO ANDRÉS ARZÚA CÁRDENAS


 DR. FRANCISCO JAVIER GARCÍA RODRÍGUEZ
 2º. Director de Tesis


 DR. ROGELIO GONZÁLEZ ARMAS


 DR. ADRIÁN MUNGUÍA VEGA

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


 DRA. MARÍA MARGARITA CASAS VALDEZ



I.P.N.
CICIMAR
DIRECCIÓN



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 20 del mes de Mayo del año 2016

El (la) que suscribe MC. GRISELMA GUADALUPE RUBIO CASTRO Alumno (a) del Programa

DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS

con número de registro A120405 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:

DR. CASIMIRO QUIÑONEZ VELÁZQUEZ y DR. FRANCISCO JAVIER GARCÍA RODRÍGUEZ

y cede los derechos del trabajo titulado:

"ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL DEL PEZ VELA *Istiophorus platypterus*

(SHAW IN SHAW & NODDER, 1792)"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la

siguiente dirección: griselma_rubio@hotmail.com - cquinone@ipn.mx - fjgarciar@ipn.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

MC. GRISELMA GUADALUPE RUBIO CASTRO

Nombre y firma del alumno

Dedicatoria

A mi esposo Cristhian, que con su compañía y apoyo brindó un gran estímulo a esta difícil etapa de mi vida, de esposa, madre y estudiante, con quien he vivido los mejores años de mi vida. Gracias por estar siempre presente, por apoyar mi desarrollo profesional y por mostrarme que nada es imposible.

¡Te amo mi vida!

A mis hijos Cristhian, Abel, Sofía y Rafael, ¡Mi mayor enseñanza de vida!

A mis padres Rafael y Teresa, y hermanos Rafael, Fernando, Teresa, por todo su apoyo. ¡Los quiero!

AGRADECIMIENTOS

Al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del Instituto Politécnico Nacional (CICIMAR-IPN), por brindarme la oportunidad de desarrollar mis estudios de Doctorado en sus instalaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y la Beca de Estímulo Institucional de Formación de Investigadores (BEIFI) del Instituto Politécnico Nacional, por los apoyos económicos brindados.

A la comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas del Instituto Politécnico Nacional (COFFA-IPN) por el apoyo económico otorgado para asistir a congresos.

Al Dr. Casimiro Quiñonez Velázquez por su valioso apoyo durante el desarrollo de mi trabajo de tesis, el tiempo dedicado a cada revisión de trabajos y sus acertadas recomendaciones, pero sobre todo por su amistad y el gran apoyo personal que me brindó, es usted una gran persona.

Al Dr. Francisco J. García Rodríguez por introducirme al conocimiento de la Genética, sus enseñanzas en las técnicas de laboratorio y sus recomendaciones durante el desarrollo del trabajo de tesis.

A los miembros de la comisión revisora: Dr. L. Andrés Abitia Cárdenas, Dr. Rogelio González Armas, Dr. Adrian Munguía Vega, por el tiempo dedicado a la revisión de la tesis y sus acertadas recomendaciones.

A los doctores Adrian Munguía Vega y J. Francisco Domínguez Contreras por el apoyo brindado en el análisis de los microsatélites, fue un gran reto realizar el procesamiento de los datos en tan poco tiempo.

Por la colecta de muestras se agradece al proyecto: "Biología y dinámica poblacional del pez vela *Istiophorus platypterus* (Shaw & Nodder, 1792) en el Pacífico mexicano.

CONACYT-Fondo Sectorial-60376. Vigencia 2008-2010. A cargo de los Doctores L. Andrés Abitia Cárdenas y Casimiro Quiñonez Velázquez.

Al Laboratorio de Genética de CICIMAR-IPN, a cargo del Dr. Francisco J. García Rodríguez, donde se realizaron todos los análisis genéticos. Y a mis compañeros de laboratorio Iván, Adriana, José y Armando, gracias por trasmitirme sus conocimientos y apoyar en el laboratorio.

A los proyectos SIP-20131165, SIP-20140781, SIP-20150998, SIP-20161472, a cargo del Dr. Francisco J. García Rodríguez, por los apoyos económicos para el material de laboratorio.

Al C.P. Humberto Ceseña Amador, al Lic. Cesar Casas y a la Lic. María Magdalena Mendoza, por ser tan amables y estar siempre al pendiente de los trámites administrativos.

INDICE

Lista de figuras	IV
Lista de tablas	VI
Lista de anexos	VIII
GLOSARIO	IX
RESUMEN	XII
ABSTRACT.....	XIV
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	6
JUSTIFICACION	11
HIPOTESIS	12
OBJETIVOS.....	13
– Objetivo general	13
– Objetivos específicos	13
METODOLOGÍA	14
– Área de muestreo	14
– Muestreo	15
– Región control del ADNmt	16
– Diseño de primers	16
– Extracción de ADN	18
– Amplificación de ADN.....	18
– Secuenciación de ADN	19
– Edición y alineamiento de secuencias	19
– Diversidad genética	20
– Diferenciación y estructura genética	20
– Análisis filogeográfico	22
– Historia demográfica	22

– Microsatélites	24
– Aislamiento y Caracterización de marcadores microsatélites...	24
– Amplificación de microsatélites.....	28
– Análisis de fragmentos y asignación de genotipos.....	29
– Diversidad genética	30
– Diferenciación y estructura genética	30
– Tasas de migración direccional por generación	32
– Análisis de parentesco	32
– Cuellos de botella recientes	33
RESULTADOS	34
– Región control del ADNmt	34
– Análisis Pacífico Oriental-Atlántico	34
– Diversidad genética	34
– Diferenciación y estructura genética	35
– Análisis filogeográfico	36
– Historia demográfica	37
– Análisis Pacífico Oriental	38
– Diversidad genética	38
– Diferenciación y estructura genética	39
– Historia demográfica	44
– Análisis filogeográfico	46
– Microsatélites	47
– Diversidad genética	47
– Diferenciación y estructura genética	49
– Tasas de migración direccional por generación	52
– Análisis de parentesco	53
– Cuellos de botella recientes	54
DISCUSIÓN	56

CONCLUSIONES	66
RECOMENDACIONES.....	67
LITERATURA CITADA	68
ANEXOS	81

Lista de figuras

Figura 1.	Ejemplar de pez vela <i>Istiophorus platypterus</i>	2
Figura 2.	Sitios de muestreo de <i>I. platypterus</i> en el Pacífico Oriental.....	17
Figura 3.	Diseño POOLPLEX para los 15 loci microsatélites con los cuatro marcadores fluorescentes.....	29
Figura 4.	Red de mínima expansión (MJ Network) de todos los datos de pez vela en el Pacífico Oriental y Atlántico. Cada círculo representa un haplotipo observado, el tamaño del círculo es proporcional a la frecuencia del haplotipo y el color indica cada sitio de muestreo. Mazatlán (azul rey), Manzanillo (rojo), Acapulco (negro), Oaxaca (verde), Ecuador (azul cielo), Golfo de México (amarillo), Caribe (rosa) y Golfo de Guinea (morado).....	36
Figura 5.	Distribución de diferencias pareadas y valores de la prueba D de Tajima para el pez vela del Pacífico Oriental y el Atlántico...	37
Figura 6.	Distribución geográfica de los tres haplotipos más frecuentes para cada uno de los sitios de muestreo de <i>I. platypterus</i> en el Pacífico Oriental.....	40
Figura 7.	Relación entre la distancia genética ($\Phi_{ST}/(1-\Phi_{ST})$) y la distancia geográfica (km) de los cinco sitios de muestreo de <i>I. platypterus</i> en el Pacífico Oriental ($r = 0.971$, $P = 0.017$).....	42
Figura 8.	Análisis Bayesiano realizado en BAPS. Los individuos son representados en barras estrechas divididas en segmentos K y las líneas negras verticales delimitan los sitios de muestreo.....	43
Figura 9.	Análisis jerárquico de estructura genética poblacional realizado con hierBAPS. El eje "Y" representa a los organismos (del individuo 1 al 250) y el eje "X" muestra los sitios nucleotídicos polimórficos. Los colores muestran las bases nitrogenadas: Adenina (azul), Citosina (amarillo), Guanina (rojo) y Timina (verde).....	43
Figura 10.	Distribución de diferencias pareadas y valores de la prueba D de Tajima para cada una de las cinco áreas de muestreo de <i>I. platypterus</i> en el Pacífico Oriental.....	45

Figura 11.	Red de mínima expansión (MJ Network) de todos los datos de pez vela en el Pacífico Oriental. Cada círculo representa un haplotipo observado, el tamaño del círculo es proporcional a la frecuencia del haplotipo y el color indica cada sitio de muestreo. Mazatlán (azul rey), Manzanillo (rojo), Acapulco (negro), Oaxaca (verde) y Ecuador (azul cielo).....	46
Figura 12.	Media y desviación estándar del ln de la probabilidad de los datos obtenido del análisis bayesiano en Structure Harvester...	51
Figura 13.	Análisis Bayesiano realizado en STRUCTURE, donde se muestran los gráficos de asignación de probabilidad para K=1 y K=2. Los individuos son representados en barras estrechas divididas en segmentos K (colores) y las líneas negras verticales delimitan los sitios de muestreo.....	51
Figura 14.	Mapa de porcentaje de migración reciente calculada en el programa BAYESASS. El color de cada línea representa el lugar de origen y el grosor es proporcional al porcentaje de migración.....	53
Figura 15.	Análisis de parentesco, donde se observan los valores promedio de parentesco (r) pareado dentro de cada población y los intervalos de confianza al 95%.....	54

Lista de tablas

Tabla 1.	Muestreo de <i>I. platypterus</i> en el Pacífico Oriental y secuencias obtenidas de Genbank para el Atlántico.....	16
Tabla 2.	Primers diseñados para amplificar la Región Control del ADNmt de <i>I. platypterus</i>	18
Tabla 3.	Perfil térmico para la PCR de la Región Control del ADNmt.....	19
Tabla 4.	Perfil térmico Touchdown para la PCR de los microsatélites.....	26
Tabla 5.	Aislamiento y caracterización de 23 loci microsatélites en <i>I. platypterus</i> . (NA) número de alelos, (Ho) la heterocigosidad observada y (He) la esperada.....	27
Tabla 6.	Medidas de la diversidad genética de <i>I. platypterus</i> en los océanos Pacífico y Atlántico, incluyendo el número de individuos (n), el número de sitios segregantes (S) y número de haplotipos mitocondriales (M).....	35
Tabla 7.	Análisis de varianza molecular de <i>I. platypterus</i> entre muestras de los océanos Pacífico y Atlántico.....	35
Tabla 8.	Diversidad genética temporal de <i>I. platypterus</i> en las costas del Pacífico mexicano.....	38
Tabla 9.	Medidas de la diversidad genética de <i>I. platypterus</i> en el Pacífico Oriental, incluyendo el número de individuos (n), el número de sitios segregantes (S) y número de haplotipos mitocondriales (M).....	39
Tabla 10.	Análisis de varianza molecular de <i>I. platypterus</i> entre muestras del Pacífico Oriental.....	40
Tabla 11.	Matriz de valores pareados de Φ_{ST} de las secuencias de ADNmt de <i>I. platypterus</i> en el Pacífico Oriental.....	42
Tabla 12.	Valores de la distribución de diferencias pareadas entre secuencias de <i>I. platypterus</i> en el Pacífico Oriental.....	44
Tabla 13.	Diversidad genética de <i>I. platypterus</i> en el Pacífico Oriental con 10 loci microsatélites. (N) tamaño de muestra, (Na) número de alelos, (Ne) número de alelos efectivos, (RA) riqueza de alelos, (RAP) riqueza de alelos privados, (Ho) heterocigosidad	

	Observada y (He) esperada	48
Tabla 14.	Valores de probabilidad de la prueba de Equilibrio de Hardy-Weinberg. Significancia después de la corrección de Bonferroni $P \leq 0.005$	49
Tabla 15.	Análisis de varianza molecular para los cinco sitios de muestreo de <i>I. platypterus</i> en el Pacífico Oriental.....	50
Tabla 16.	Valores pareados de diferenciación genética en los cinco sitio de muestreo de <i>I. platypterus</i> en el Pacífico Oriental. Por debajo de la diagonal se muestran los valores de FST y por encima de la diagonal los valores de Jost' D.....	50
Tabla 17.	Tasas de migración direccional recientes entre los cinco sitios de muestreo de <i>I. platypterus</i> en el Pacífico Oriental. El error estándar se muestra entre paréntesis.....	52
Tabla 18.	Análisis de cuello de botella reciente en los cinco sitios de muestreo de <i>I. platypterus</i> en el Pacífico Oriental, incluyendo tamaño de muestra (N), número de alelos (Na), heterocigosidad (He) y las pruebas de Significancia, Desviación Estandarizada de Heterocigosidad y Rangos de Wilcoxon. Con el modelo de mutación TPM ($P \leq 0.08$).....	55
Tabla 19.	Medidas de diversidad genética para distintas especies de peces de pico.....	57

Lista de anexos

Anexo 1.	Protocolo de extracción de ADN con el Kit de Qiagen.....	78
Anexo 2.	Protocolo de electroforesis en geles de agarosa.....	79
Anexo 3.	Frecuencias haplotípicas de <i>I. platypterus</i> en los cinco sitios de muestreo del Pacífico Oriental.....	80
Anexo 4.	Frecuencias alélicas por locus por sitio de muestreo de <i>I. platypterus</i> en el Pacífico Oriental.....	84
Anexo 5.	Productos de investigación.....	86

GLOSARIO

ADN. Ácido desoxirribonucleico. Es la molécula que contienen la información genética y que es responsable de la transferencia de ésta de generación en generación.

ADNmt. ADN mitocondrial. Es el material genético circular cerrado de doble cadena que se localiza en el interior de las mitocondrias celulares, encargado de la codificación del RNA ribosómico, ARN transferencia y proteínas relacionadas con la respiración y generación de energía celular.

Alelo. Cada una de las posibles formas alternativas de un gen dado, que difiere en su secuencia de ADN.

Alelo nulo. Es un fragmento de ADN que no amplificó.

Amplificación. Proceso mediante el cual se incrementa de manera exponencial una secuencia concreta de ADN.

Análisis de Varianza Molecular (AMOVA). Método estadístico que se basa en el análisis de varianza de las frecuencias genotípicas para probar diferencias genéticas entre grupos o poblaciones.

Cuello de botella. Proceso a través del cual una población experimenta un drástico descenso en el número de miembros, ocasionando una disminución en su diversidad genética.

Deriva génica. Cambios al azar en las frecuencias genotípicas dentro de una población.

Desequilibrio por ligamiento. En una población, es la herencia simultánea y transmitida de un conjunto de marcadores de ADN específicos a lo largo de generaciones sucesivas sin que se produzca recombinación entre ellos.

Diploide. Dotación cromosómica consistente en la presencia del número total de cromosomas en una célula somática.

Diversidad Genética. Es la variación en el material genético de una población o especie, e incluye el genoma nuclear y el mitocondrial.

Diversidad haplotípica (*h*). Mide la probabilidad de que dos haplotipos seleccionados al azar en una muestra sean diferentes.

Diversidad nucleotídica (π). Mide la probabilidad de que dos nucleótidos homólogos seleccionados al azar sean diferentes.

Electroforesis. Es el movimiento y separación de molecular cargadas en solución dentro de un campo eléctrico.

Equilibrio de Hardy-Weinberg. Relación en estado estacionario entre las frecuencias relativas de dos o más alelos en una población ideal. En ausencia de fuerzas evolutivas, la frecuencia alélica y la frecuencia genotípica permanecerán constantes de generación en generación en una población cuyos miembros se crucen al azar.

Estructura genética poblacional. Se entiende por estructura genética de una población a la cantidad y distribución de la variación genética presente en la misma.

Fenotipo. Características físicas y/o bioquímicas observables de la expresión de uno o varios genes en un determinado ambiente.

Frecuencia alélica. Proporción de individuos de una población que han heredado una mutación o variante génica específica.

Gen. Unidad básica de la herencia que consiste en un segmento de ADN que codifica una proteína específica o un segmento de una proteína (o una molécula de ARN) con una característica o función determinada.

Genotipo. Composición genética de un organismo.

Haploide. La mitad del número diploide o normal de cromosomas en una célula somática.

Haplotipo. Conjunto de alelos contenidos en un locus de una misma dotación haploide. El haplotipo podemos referirlo a un solo locus o a un genoma completo pero siempre se refiere a uno de los dos alelos de cada gen.

Heterocigoto. Individuo que tiene dos alelos diferentes en un locus, uno en cada cromosoma.

Heterocigosidad. Número de individuos heterocigotos para un locus, dividido entre el número total de individuos de la muestra.

Homocigoto. Individuo que tiene dos alelos idénticos en un mismo locus determinado, uno en cada cromosoma.

Índice de fijación F_{ST} . Es la reducción en heterocigosidad de una subpoblación debido a los cruzamientos no al azar, con respecto a la población total. Mide el efecto de la subdivisión poblacional.

Locus. Lugar o localización física de un gen específico en un cromosoma.

Marcador. Segmento identificable de ADN (p. ej. RFLP, VNTR, microsatélite) que presenta una longitud polimórfica en la población.

Nucleótido. Molécula compuesta por una base nitrogenada (adenina, guanina, timina citosina o uracilo), un grupo fosfato y un azúcar (desoxirribosa en ADN; ribosa en ARN).

Población. Es un conjunto de organismos de la misma especie que coexisten en un mismo espacio y tiempo y que se pueden reproducir entre sí.

Población panmíctica. Es aquella en donde todos los individuos de la población tienen la misma probabilidad de aparearse.

Polimorfismo. Se refiere a la aparición de dos o más secuencias genómicas alternativas o alelos entre diferentes individuos de una población.

Primer. Es una secuencia corta de oligonucleótidos que se une en forma complementaria específica a una cadena única de ácido nucleico e inicia la síntesis de esa cadena en presencia de ADN polimerasa y nucleótidos en una reacción de PCR.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Procedimiento que genera millones de copias de un segmento corto de ADN mediante ciclos repetidos de: 1) desnaturalización del ADN, 2) acoplamiento de los *primers* y 3) extensión mediante la acción de la ADN polimerasa.

Secuenciación. Proceso mediante el cual se determina la secuencia de nucleótidos en un segmento de ADN.

Sitio segregante. Es el sitio en la secuencia de ADN en el que se produce una variación.

Unidad poblacional. Conjunto de organismos de la misma población que coexisten en tiempo y espacio, y que comparte un mismo pool genético.

RESUMEN

Los estudios sobre genética poblacional son de gran importancia para el manejo y conservación de las especies, debido a que aportan elementos que permiten soportar la delimitación de unidades poblacionales. *Istiophorus platypterus* es una de las especies más importantes para la pesca deportiva en los países donde se realiza esta actividad, a pesar de esto es poco lo que se conoce acerca de su estructura genética poblacional. La presente investigación tuvo como objetivo evaluar los niveles de variabilidad y diferenciación genética del pez vela, mediante el uso de secuencias de la región control del ADN mitocondrial (ADNmt) y microsatélites. Las muestras de tejido fueron obtenidas de los peces capturados por las flotas deportivas de cuatro localidades de México (Mazatlán, Manzanillo, Acapulco, y Oaxaca), y una en Ecuador (Manta). Se llevó a cabo un análisis global, empleando los datos obtenidos en el presente estudio y secuencias de individuos provenientes del Atlántico, depositadas en Genbank. Para el análisis global (Pacífico-Atlántico) se revisaron 493 secuencias, a partir de las cuales se identificaron 217 haplotipos. La diversidad nucleotídica en el Atlántico fue 0.0622 y en el Pacífico de 0.0085. El valor de Φ_{ST} fue significativamente diferente de cero ($\Phi_{ST} = 0.5645$, $P = 0.0000$), indicando estructuración poblacional. Esto soporta que el pez vela del Pacífico Oriental pertenece a una unidad poblacional diferente a otra que se encuentra en el Atlántico. Para el análisis regional (Pacífico Oriental) se analizaron 250 secuencias y se genotipificaron 109 individuos con 10 *loci* microsatélites. Se identificaron 134 haplotipos con una diversidad haplotípica promedio de 0.963 y una diversidad nucleotídica de 0.007. Todos los *loci* microsatélite fueron polimórficos y en total se obtuvieron 64 alelos distintos. El número de alelos por locus fluctuó entre 2 y 10, con un promedio de 5.4. La diversidad genética medida con base a la diversidad nucleotídica, fue relativamente baja en relación con otras regiones del mundo, y otras especies de peces de pico, sin embargo la diversidad genética medida con base a la heterocigosidad fue alta, con un valor promedio de 0.701. El análisis de varianza molecular (AMOVA) para datos mitocondriales indicó diferencias genéticas significativamente diferentes de cero ($P = 0.029$), aunque el Análisis Bayesino asignó los individuos a un grupo. El AMOVA con datos nucleares no mostró diferenciación

genética significativa ($F_{ST} = 0.004$, $P > 0.05$). Una prueba de aislamiento por distancia con datos mitocondriales mostró una correlación significativa entre la distancia genética y la distancia geográfica. El análisis filogeográfico reveló una distribución de los haplotipos con un patrón de tipo estrella, y la distribución de diferencias apareadas entre pares de secuencias de ADNmt mostró un patrón unimodal para las cinco áreas muestreadas, indicando una expansión demográfica reciente. Las tasas de migración recientes presentaron valores que variaron entre 1 y el 19% entre los cinco sitios de muestreo y no se identificaron cuellos de botella recientes en los organismos de pez vela del Pacífico Oriental. La presente investigación aporta datos que permitan en un futuro soportar medidas para la explotación racional del recurso.

ABSTRACT

Population genetics studies are of great importance for the management and conservation of the species, because they provide support elements that allow the delimitation of population units. *Istiophorus platypterus* is one of the most important species for recreational fishing in countries where this activity is carried out, although this is little is known about their population genetic structure. This study aimed to assess levels of genetic variability and differentiation of sailfish, by using the control region sequences of mitochondrial DNA (mtDNA) and microsatellite loci. Tissue samples were obtained from fish caught by recreational fleet of four locations in Mexico (Mazatlan, Manzanillo, Acapulco and Oaxaca), and one in Ecuador (Manta). A global analysis was performed using the data obtained in this study and sequences from individuals Atlantic, deposited in Genbank. For the overall analysis (Eastern Pacific-Atlantic) 493 sequences were reviewed, from which 217 haplotypes were identified. The nucleotide diversity in the Atlantic was 0.0622 and 0.0085 in the Eastern Pacific. Φ_{ST} value was significantly different from zero ($\Phi_{ST} = 0.5645$, $P = 0.0000$), indicating population structure. This supports the Eastern Pacific sailfish belongs to a different one that is in the Atlantic population unit. For the regional analysis (Eastern Pacific) 250 sequences were analyzed and 109 individuals were genotyped with 10 microsatellite loci. 134 haplotypes were identified with an average of 0.963 haplotype diversity and nucleotide diversity of 0.007. All microsatellite loci were polymorphic and a total of 64 different alleles were obtained. The number of alleles per locus ranged from 2 to 10, with an average of 5.4. Genetic diversity measure based on the nucleotide diversity was relatively low compared with other regions of the world, and other species of billfish, however genetic diversity measure based on heterozygosity was high, with an average value of 0.701. The analysis of molecular variance (AMOVA) for mitochondrial data indicated genetic differences significantly different from zero ($P = 0.029$), although the Bayesian Analysis individuals assigned to a group. The AMOVA nuclear data showed no significant genetic differentiation ($F_{ST} = 0.004$, $P > 0.05$). A test of isolation by distance with mitochondrial data showed a significant correlation between genetic distance and geographical distance. The phylogeographic analysis revealed a distribution of

haplotypes with a star pattern type, and distribution of paired differences between pairs of mtDNA sequences showed a unimodal pattern for the five sampled areas, indicating a recent demographic expansion. Recent migration rates presented values ranging from 1 to 19% among the five sampling sites and no recent bottle necks identified in organisms sailfish Eastern Pacific. This research provides data that will allow in the future support measures for the rational exploitation of the resource.

INTRODUCCIÓN

El pez vela *Istiophorus platypterus* (Shaw in Shaw & Nodder, 1792) es una especie pelágica migratoria que habita en aguas sobre la termoclina en regiones tropicales y subtropicales de todos los océanos, entre los 40–45° N y 40° S en el Pacífico, entre 25° N y 40° S en el Índico y entre los 40° N y 35–40° S en el Atlántico (Nakamura, 1985). En el Pacífico Oriental, los registros de captura muestran altas concentraciones de esta especie desde el Golfo de California hasta el norte de Perú (Kume & Joseph, 1969).

Basado en la longitud de la aleta pectoral, forma de la escama, y el crecimiento, Nakamura (1985) reconoció al pez vela del Atlántico (*Istiophorus albicans*) como una especie distinta al pez vela del Indo-Pacífico (*I. platypterus*). Sin embargo, los datos genéticos soportaron la existencia de una única especie con una distribución global (Collette *et al.*, 2006).

Morfológicamente, esta especie se caracteriza por presentar la mandíbula superior alargada en forma de pico y por la gran altura de su primera aleta dorsal (Fig. 1). Puede alcanzar una talla de 348 cm de longitud furcal y un peso de 100.2 kg (Fischer *et al.*, 1995). Es una especie generalista, su dieta incluye principalmente peces pelágicos que forman cardúmenes (sardinias, anchovetas y macarelas) y cefalópodos (Arizmendi-Rodríguez *et al.*, 2006). Son organismos dioicos, y la única diferencia observable entre sexos es el tamaño, siendo la hembra de mayor tamaño que el macho (Hanner *et al.*, 2011). Las hembras más grandes son altamente fecundas, capaces de producir de 2.3 a 4.7 millones de huevos (Voss, 1953). En el Pacífico Oriental el desove del pez vela ocurre todo el año (Hernández-Herrera & Ramírez-Rodríguez, 1998; Ramírez-Pérez *et al.*, 2011), en Costa Rica durante los meses de diciembre a marzo; en Guatemala de enero a abril y en México de mayo a noviembre (Hinton & Maunder, 2013). Los desoves se presentan en zonas costeras (Pimenta *et al.*, 2005), donde la fertilización es externa.

El pez vela forma parte de la familia Istiophoridae, la cual incluye también a marlines y agujas, que por su característica de nado rápido son aprovechados por la pesca deportiva de distintos países. Además por su amplia distribución geográfica representan un importante porcentaje de la captura incidental en la pesca comercial con palangre dirigida al atún, tiburón y pez espada (Galeana-Villaseñor *et al.*, 2008), lo que ha ocasionado una disminución en existencias poblacionales de estos grandes depredadores generando síntomas de sobreexplotación (Myers & Worm, 2003).

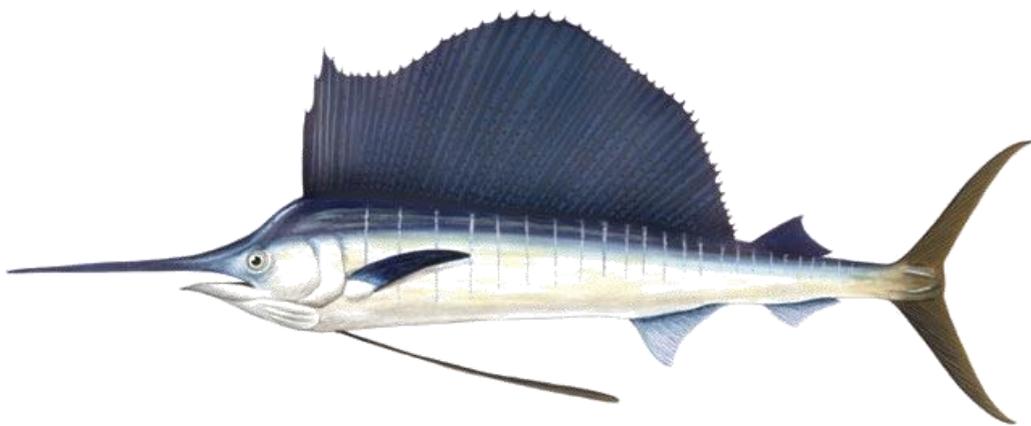


Figura 1. Ejemplar de pez vela *Istiophorus platypterus*.

En el Pacífico mexicano, las especies de “picudos” (especies de las familias Istiophoridae y Xiphiidae) más importantes por su volumen de captura en la pesca deportiva y comercial son el pez vela y el marlín rayado (*Kajikia audax*, Philippi, 1887). En las costas centro y sur, el pez vela representa más del 50% y ocasionalmente hasta el 90% en los torneos de pesca deportiva en los principales puertos de esta zona; y en la pesca comercial palangrera ha representado casi el 40% de la captura total en número de organismos (Arias-Olaiz, 2007). Las capturas más altas de ésta especie a nivel mundial ocurren frente a las costas de América Central en el Pacífico Oriental, donde la pesca deportiva es de captura-liberación con rendimientos económicos considerables. Además, es registrada como captura incidental en las pesquerías costeras de palangre artesanal, las cuales están dirigidas principalmente a la captura de dorado, tiburón y atún (Ehrhardt & Fitchett,

2006).

El pez vela, como otras especies con una amplia distribución geográfica, realiza migraciones estacionales (Macías-Zamora *et al.*, 2011), lo que aunado a la aparente carencia de barreras físicas en el ambiente marino, se esperaría que presentara un elevado flujo genético y en consecuencia una población panmíctica. Entre las bases que soportan este paradigma sobresalen: (1) la formación de grandes grupos para la reproducción; (2) la amplia distribución en ambientes aparentemente carentes de barreras físicas que impidan el intercambio de individuos entre regiones y grupos desovantes; y (3) la alta capacidad intrínseca de dispersión que presenta, lo cual permite potencialmente altos niveles de flujo genético, tanto por transporte pasivo de huevos y larvas por corrientes, como por migración activa de adultos (Jorgensen *et al.*, 2005). Sin embargo, existen evidencias que sugieren que este paradigma, no debe ser considerado como condición universal. Graves (1996) plantea que factores específicos o regionales pueden limitar la conectividad y el flujo genético en especies pelágicas con una amplia distribución.

En un principio, la medición de la variabilidad genética estaba restringida a aquellos organismos que se podían mantener en condiciones controladas de laboratorio. Un carácter variable era elegido, se analizaba su patrón de herencia, y se deducía la base genética de dicho carácter. Sin embargo, esta metodología solo permitía analizar aquellos caracteres fenotípicos y en determinadas especies. La genética molecular como herramienta para estimar el grado de aislamiento reproductivo entre poblaciones ha permitido tener un acceso más directo a la diferenciación intraespecífica (Grant *et al.*, 1999). El desarrollo de marcadores moleculares combinados con las técnicas de electroforesis, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los nuevos métodos de secuenciación y el desarrollo de la bioinformática, ha revolucionado el poder de análisis disponible para explorar la estructuración genética.

Los marcadores moleculares presentan diferentes tipos de herencia. Comúnmente, son basados en el ADN nuclear (ADNn), los cuales son de origen biparental; otros son fundamentados en el ADN mitocondrial (ADNmt), y son heredados vía monoparental. La elección de los mismos dependerá de la información que se quiere obtener. En la actualidad existen un gran número de marcadores moleculares, entre los cuales los más utilizados para análisis poblacionales son: las secuencias de ADNmt y los microsatélites.

Los análisis más detallados de diferenciación de ADN pueden obtenerse secuenciando la región de interés para diferentes individuos (Rentarúa-Alcántara, 2007); y debido a su alta tasa de sustitución nucleotídica, herencia clonal matrilineal y ausencia de recombinación, el ADN mitocondrial ha adquirido un papel preponderante en estudios de genética intraespecífica (Rocha-Olivares & Sandoval-Castillo, 2003). De los marcadores mitocondriales la región control es la única no codificante y la que presenta mayor tasa de evolución molecular (Brown *et al.*, 1986).

Por su parte, los microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR_s), son secuencias de ADN que se repiten en tándem formadas de 1 a 6 pares de bases (Chambers & MacAvoy, 2000), por ejemplo mononucleótidos (TT)_n, dinucleótidos (AT)_n, o tetranucleótidos (AAGG)_n. Se encuentran en todos los genomas principalmente en regiones no codificantes, y se caracterizan por su alto grado de polimorfismo, debido a su alta tasa de mutación (Li *et al.* 2002). Muestran un modo de herencia co-dominante, pueden ser fácilmente amplificados por reacción en cadena de la polimerasa y son altamente reproducibles (Arias *et al.*, 2010). Por lo anterior, han sido ampliamente utilizados en estudios genéticos, con aplicación en genética de conservación, genética de poblaciones, el mejoramiento molecular y pruebas de paternidad (Oliveira *et al.*, 2006).

La diferencia en el tipo de información obtenida de uno u otro tipo de marcador está relacionada con las diferentes tasas de mutación. Se estima que el ADN mitocondrial, presenta una tasa de mutación (μ) aproximadamente de 6×10^{-8}

(Haag-Liautard *et al.*, 2008), ideal para detectar señales moleculares de procesos históricos. En cambio, la tasa media de mutación de los loci microsatélites es de alrededor de 5×10^{-4} (Whittaker *et al.*, 2003), lo que permite una excelente resolución de procesos recientes. La combinación de ambos tipos de marcadores permite investigar la distribución de la variación genética a diferentes escalas temporales.

A pesar de la gran importancia ecológica y pesquera del pez vela, es poco lo que se conoce acerca de su estructura genética poblacional. Los estudios sobre estructura y diversidad genética poblacional son de gran importancia para el manejo y conservación de las especies (Hoolihan *et al.*, 2004), principalmente porque aportan elementos que permiten soportar la delimitación de unidades poblacionales. De esta manera los estudios genéticos resultan relevantes; en principio, para conocer el grado de conectividad biológica entre regiones y en consecuencia, para entender los procesos contemporáneos e históricos que han promovido la estructuración poblacional.

En el presente estudio se evaluaron los niveles de variabilidad y diferenciación genética del pez vela, usando marcadores moleculares basados en secuencias de la región control del ADN mitocondrial y en microsatélites, con la finalidad de realizar una comparación interoceánica incrementando el número de muestras en el Pacífico Oriental para compararlas con las secuencias de Bangma (2006). Y efectuar una descripción detallada de la estructura genética del pez vela en el Pacífico Oriental.

ANTECEDENTES

Los peces de pico pertenecen al orden Perciforme, y durante algún tiempo fueron considerados miembros del suborden Scombroidei, el cual incluía seis familias: Scombridae, Trichiuridae, Gempylidae, Scombridae, Istiophoridae y Xiphiidae (Collette *et al.*, 1984). Estudios recientes han demostrado que los peces de pico son genéticamente y morfológicamente diferentes a los escómbridos (Orrell *et al.*, 2006; Collette *et al.*, 2006), por lo que han sido reclasificados en el suborden Xiphoidei. Actualmente, la clasificación taxonómica de los peces de pico es la siguiente:

Orden: Perciformes

Suborden: Xiphoidei

Familia Istiophoridae

Género *Istiophorus*

I. platypterus (Shaw in Shaw & Nodder, 1792)

Género *Makaira*

M. nigricans (Lacepède, 1802)

Género *Istiompax*

I. indica (Cuvier in Cuvier & Valenciennes, 1832)

Género *Kajikia*

K. audax (Philippi, 1887)

K. albida (Poey, 1860)

Género *Tetrapturus*

T. angustirostris (Tanaka, 1915)

T. pfluegeri (Robins & de Sylva, 1963)

T. belone (Rafinesque, 1810)

T. georgii (Lowe, 1841)

Familia Xiphiidae

Género *Xiphias*

X. gladius (Linnaeus, 1758)

(Collette *et al.*, 2006; Integrated Taxonomic Information System, 2016).

La genética de poblaciones ha permitido de manera indirecta estudiar la conectividad marina, tomando en cuenta los mecanismos físicos y biológicos de dispersión y los eventos históricos relacionados con la estructuración de las poblaciones. Teniendo los peces de pico una amplia distribución, han sido objeto de estudios poblacionales a gran escala geográfica y en varios de ellos se ha soportado un flujo genético relativamente alto.

Falterman (1999), empleando secuencias de ADN mitocondrial y marcadores tipo microsatélites, no encontró evidencia de estructura poblacional en el marlin negro *Istiompax indica* entre las poblaciones del océano Pacífico y del océano Índico. Graves & McDowell (2006) identificaron una tendencia positiva de la diferencia genética en relación con la distancia geográfica del marlin blanco *Kajikia albidus* en el océano Atlántico. Sin embargo, el análisis general de la información no sustentó una estructura genética.

Aun cuando el área de distribución y los desplazamientos de los peces picudos son relativamente amplios, se han encontrado diferencias poblacionales en algunas especies. McDowell & Graves (2008) reportaron una significativa diferenciación genética en el marlin rayado *Kajikia audax* con base en análisis de secuencias de ADNmt y microsatélites de muestras provenientes del Pacífico mexicano, Ecuador, Hawái y el noreste de Australia. Ellos encontraron suficiente heterogeneidad genética, proponiendo cuatro unidades administrativas discretas. Posteriormente, Purcell & Edmands (2011) empleando un esquema de muestreo simultáneo de varios años, e incrementando el número de marcadores moleculares, mostraron que en el Pacífico existen tres unidades poblacionales de marlin rayado: 1) Japón-Hawái-Sur de California, (2) México-Centroamérica-Ecuador, y (3) Australia-Nueva Zelanda.

Estudios realizados en el pez espada empleando ADNmt y ADN nuclear, mostraron también significativa diferenciación interoceánica entre poblaciones del Atlántico, Indo Pacífico y Mediterráneo (Chow *et al.*, 1997; Chow y Takeyama, 2000; Alvarado Bremer *et al.*, 2005; Muths *et al.*, 2009). Otro estudio que aportó evidencias sobre una estructuración poblacional en peces picudos fue el de Graves & McDowell (1995) sobre el marlin azul *Makaira nigricans* entre las poblaciones del Atlántico e Indo-Pacífico.

Particularmente, para el pez vela la información disponible sobre estudios genéticos no es abundante, y en algunos casos los resultados provienen de un reducido número de muestras. McDowell & Graves (2002) basados en el Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLPs, por sus siglas en inglés) de la región control del ADNmt y en microsatélites no encontraron diferencias genéticas entre individuos provenientes de diferentes localidades del Atlántico. No obstante, comparaciones entre organismos del Atlántico y del Pacífico, y entre organismos del Pacífico y el Índico revelaron diferencias significativas (Graves & McDowell, 2003). En el Océano Índico Hoolihan *et al.* (2004) utilizando RFLPs de la región control del ADNmt encontraron diferencias poblacionales entre individuos recolectados dentro y fuera del Golfo de Arabia y en consecuencia, aportan el primer reporte de aislamiento filogeográfico ocurrido dentro de un mar marginal en una especie altamente migratoria.

Bangma (2006), revisó secuencias de la región control y cinco loci microsatélites (desarrollados para marlín azul) con el fin de conocer la estructura poblacional del pez vela en el océano Atlántico. No encontró diferenciación genética entre muestras tomadas del Atlántico Oriental (Golfo de Guinea) y Atlántico Occidental (Golfo de México y Caribe). Sin embargo, al realizar comparaciones interoceánicas, con muestras recolectadas en el Pacífico Oriental (Acapulco, México, y Los Sueños, Costa Rica), detectó diferenciación genética entre las poblaciones del Atlántico y Pacífico. Debido al reducido número de muestras provenientes del Pacífico ($n=22$) en relación con las del Atlántico ($n=222$), Bangma (2006) sugirió

ampliar los estudios genéticos para describir con mayor detalle la estructura poblacional de esta especie en el Pacífico Oriental, complementando de esta manera el conocimiento obtenido a partir de los trabajos previos realizados por McDowell (2002) y Graves & McDowell (2003).

Recientemente, Lu *et al.* (2015) compararon muestras de sitios procedente del Pacífico Oriental, incrementando la información en esta región y aportando datos sobre los niveles de diferenciación genética entre sitios geográficamente cercanos. Particularmente, Lu *et al.*, (2015) comparó muestras de México, Costa Rica y de un sitio geográficamente distante (Taiwán) empleando la región control del ADNmt y cinco loci microsatélites (los mismos empleados por Bangma, 2006). Sus resultados indican que los individuos capturados en México y Costa Rica no representaron poblaciones distintas, pero los procedentes de Taiwán sí. De esta manera los autores sugieren que Taiwán es una población distinta a la del Pacífico Oriental. Lu *et al.* (2015), consideraron un número limitado de muestras representativas del Pacífico Oriental (una localidad de México y una localidad de Costa Rica), y las localidades comparadas no representaron los límites de distribución latitudinal de la especie. Por tal motivo un análisis considerando un área más extensa debería aportar una perspectiva más clara de la estructura poblacional del pez vela en el Pacífico Oriental.

Una posible hipótesis de una estructura poblacional del pez vela en el Pacífico Oriental se podría sustentar en el trabajo de Prince *et al.* (2006). Estos autores utilizaron marcas satelitales tipo PSATs (Pop-up Satellite Archival Tag, “Marca Satelital Archivadora Desprendible”) para seguir la migración de individuos del pez vela en el Pacífico Oriental (México, Guatemala, Costa Rica y Panamá). Sus resultados mostraron que los organismos marcados en Guatemala, Costa Rica y Panamá realizaron movimientos transfronterizos entre cada uno de estos países, mientras que los individuos marcados en México solo se movieron en aguas mexicanas. Aunado a esto, los resultados obtenidos por Mourato *et al.* (2010) soportan también una dispersión aparentemente limitada. A partir de marcas

satelitales colocadas en individuos procedentes de las costas de Brasil, ellos encontraron que los individuos no se desplazaron significativamente del sitio de donde fueron marcados. Estos resultados sugieren que los movimientos que realiza esta especie no son aparentemente grandes, y en consecuencia que la especie podría estar conformada por distintas unidades poblaciones.

JUSTIFICACIÓN

Los organismos marinos son una importante fuente directa de proteínas para la dieta en los seres humanos e indirectamente a través de la alimentación del ganado. Además, las pesquerías sustentan una importante actividad económica que genera empleos e ingresos, en particular en los países en desarrollo, donde se calcula que no menos de 100 millones de personas viven de las actividades de la pesca o relacionadas con ella (Bifani, 2007).

Toda pesquería debe estar planificada sobre un esquema de administración que le permita mantener el rendimiento óptimo sin el deterioro de los recursos explotados. Para ello se requiere información científica generada por estudios biológicos demográficos y genéticos (Kenchington, 2001). Lo anterior permitirá evaluar las existencias y distribución de las poblaciones de peces (Utter, 1991).

Conocer la diversidad genética de un recurso y si éste se encuentra estructurado en unidades poblacionales es una característica básica para la generación de un plan de manejo eficiente. Con ello, cada unidad poblacional será administrada de acuerdo a sus características específicas, como tasa de crecimiento, fecundidad y desarrollo, entre otras. Si estos elementos no son considerados, la explotación generará la disminución progresiva de la variación genética, modificando la capacidad de las poblaciones a recuperarse de la presión de la pesca y del ambiente. Las consecuencias no solo serían económicas con la desaparición de las pesquerías, sino también ecológicas afectando la relación depredador-presa.

El pez vela es una de las especies más importantes para la pesca deportiva en los países donde se realiza esta actividad. Por tal motivo, los análisis enfocados a abordar la estructura genética poblacional de la especie con la intención de aportar datos que permitan en un futuro soportar medidas para su explotación racional, resultan relevantes.

HIPÓTESIS

Considerando la extensa área de distribución del pez vela, la existencia de estudios con distintos marcadores moleculares (RFLPs, ADNmt y microsatélites) que soportan diferencias genéticas en algunas áreas de distribución de la especie y teniendo en cuenta que individuos marcados con etiquetas satelitales sugieren una dispersión limitada, se espera que esta especie se encuentre integrada por distintas unidades poblacionales.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la estructura genética poblacional del pez vela *Istiophorus platypterus* por medio del análisis de secuencias de la región control del ADN mitocondrial y microsatélites.

Objetivos específicos

- Estimar el grado de diferenciación genética del pez vela entre individuos provenientes de los océanos Pacífico Oriental y Atlántico.
- Determinar los niveles de diversidad y diferenciación genética del pez vela en cinco sitios de colecta en la costa del Pacífico Oriental, a partir de secuencias de ADN mitocondrial.
- Inferir procesos de demografía histórica y su relación con la estructura y variabilidad genética.
- Determinar los niveles de diversidad y diferenciación genética del pez vela en cinco sitios de colecta en la costa del Pacífico Oriental, mediante el uso de microsatélites.

METODOLOGÍA

Área de muestreo

El Pacífico Oriental es una extensa región que abarca unos 20 millones de km² de aguas territoriales, zonas económicas exclusivas y territorios insulares de 13 países. En esta extensa área existen una variedad de ecosistemas tropicales, subtropicales y templados, con complejos sistemas de corrientes marinas y otros procesos oceanográficos (Félix, 2012). En el área de distribución del pez vela correspondiente al Pacífico Oriental (Sur del Golfo de California hasta la parte norte de Perú) se presentan cuatro corrientes de gran importancia: 1) la Corriente de California, 2) la Corriente Surecuatorial, 3) la Contracorriente Ecuatorial y 4) la Corriente Costera de Costa Rica. De manera general, la circulación estacional de esta región puede ser observada dentro de tres regímenes:

- De agosto a diciembre, tanto la Corriente Surecuatorial, como la Contracorriente Ecuatorial se intensifican. La contracorriente fluye hacia la costa, se une a la Corriente Costera de Costa Rica (CCCR) en su flujo hacia el norte y posteriormente entra en la región de la Corriente Norecuatorial aproximadamente entre los 10° y 20°N. En el norte, la Corriente de California se separa de la costa de Baja California (25°N), alimentando a la Corriente Norecuatorial.
- De febrero a abril, la corriente de California se intensifica y penetra hacia el sur hasta los 20°N. La Contracorriente Ecuatorial está ausente durante este período y es reemplazada por un flujo variable hacia el oeste o noroeste. La Corriente Surecuatorial es débil y muestra movimientos ocasionales hacia el este, cerca del ecuador. La Corriente Costera de Costa Rica también está ausente. En el Golfo de Tehuantepec y Golfo de Panamá existen flujos hacia afuera de la costa por el efecto local de vientos, como los ocurridos en periodos de Norte.
- De mayo a julio la Contracorriente Ecuatorial se forma de nuevo y la mayor parte de sus aguas fluyen hacia el norte, cerca de la costa, para alimentar la Corriente Costera de Costa Rica (Trasviña *et al.*, 2004).

La parte central del Pacífico Oriental se caracteriza por una elevación de la termoclina hacia la costa. En las regiones costeras del Domo de Costa Rica, al igual que en el Golfo de Tehuantepec, la profundidad de la termoclina presenta valores mínimos, principalmente durante el invierno. De julio a septiembre toda la zona costera presenta valores homogéneos de 30 m a lo largo de la costa (Trasviña *et al.*, 2004).

Muestreo

El muestreo en México se llevó a cabo por técnicos en los desembarques de la pesca deportiva, a través del proyecto “Biología y dinámica poblacional del pez vela *Istiophorus platypterus* (Shaw in Shaw & Nodder, 1792) en el Pacífico mexicano. CONACYT-Fondo Sectorial-60376, vigencia 2008-2010”. La colecta de muestras en Ecuador se realizó con apoyo del Instituto Nacional de Pesca de ese País. El tejido se recolectó del musculo dorsal y se preservó en etanol al 95% para su procesamiento en el laboratorio.

Un total de 281 muestras de tejido muscular fueron obtenidas de cuatro localidades de México (Mazatlán, Manzanillo, Acapulco, y Oaxaca) y una en Ecuador (Manta) (Tabla 1, Fig. 2). En Oaxaca, los sitios de muestreo fueron: Puerto Escondido, Puerto Ángel, Huatulco y Salina Cruz, pero para efecto de los análisis fueron agrupados como “Oaxaca”. Estas muestras integran la base fundamental del presente estudio, enfocado principalmente a conocer la estructura poblacional de esta especie en el Pacífico Oriental. Sin embargo, con intención de hacer una revisión sobre sus diferencias genéticas a nivel global, se obtuvieron todas las secuencias de la región control del ADNmt de *I. platypterus* procedentes del Atlántico depositadas en Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (EF415042.1-EF415285.1).

Tabla 1. Muestreo de *I. platypterus* en el Pacífico Oriental y secuencias obtenidas de Genbank para el Atlántico.

Océano	Localidad	Año	Tejido muscular	Secuencias GenBank
	México			
	• Mazatlán	2008-2009	83	
	• Manzanillo	2008-2009	32	
	• Acapulco	2008-2009	77	
Pacífico	• Oaxaca	2008-2009	81	
	• Acapulco	1989		6
	Costa Rica	2006		16
	Ecuador			
	• Manta	2012	8	
	Golfo de México	2005		180
Atlántico	Caribe	1989		11
	Golfo de Guinea	1998		30
	Total		281	243

Región control del ADNmt

Diseño de primers

Uno de los aspectos más importantes para la amplificación de un fragmento seleccionado, es el diseño cuidadoso de *primers* o *iniciadores*. *Primers* mal diseñados podrían amplificar fragmentos de ADN distintos a los buscados.

Para amplificar un fragmento de la Región Control del ADNmt del pez vela mediante la técnica PCR, se diseñaron los *primers* *Ipla-F* e *Ipla-R* (Tabla 2), a partir de una secuencia completa del ADNmt depositada en Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, No. Acceso AB470306.1) correspondiente a

un individuo de *I. platypterus*, y empleando el programa Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000). Las consideraciones que se tomaron en cuenta para el diseño fueron:

1. Los *primers* debían tener una longitud de entre 18 y 28 pares de bases (bp).
2. El contenido de G: C (Guanina: Citosina) debía estar alrededor del 50-60%.
3. Que la temperatura de alineamiento (T_m) estuviera entre 55-60 °C.
5. Que las terminaciones 3' no fueran complementarias, debido a que podrían originar la formación de dímeros.
6. Evitar que los *primers* formen secuencias auto-complementarias.

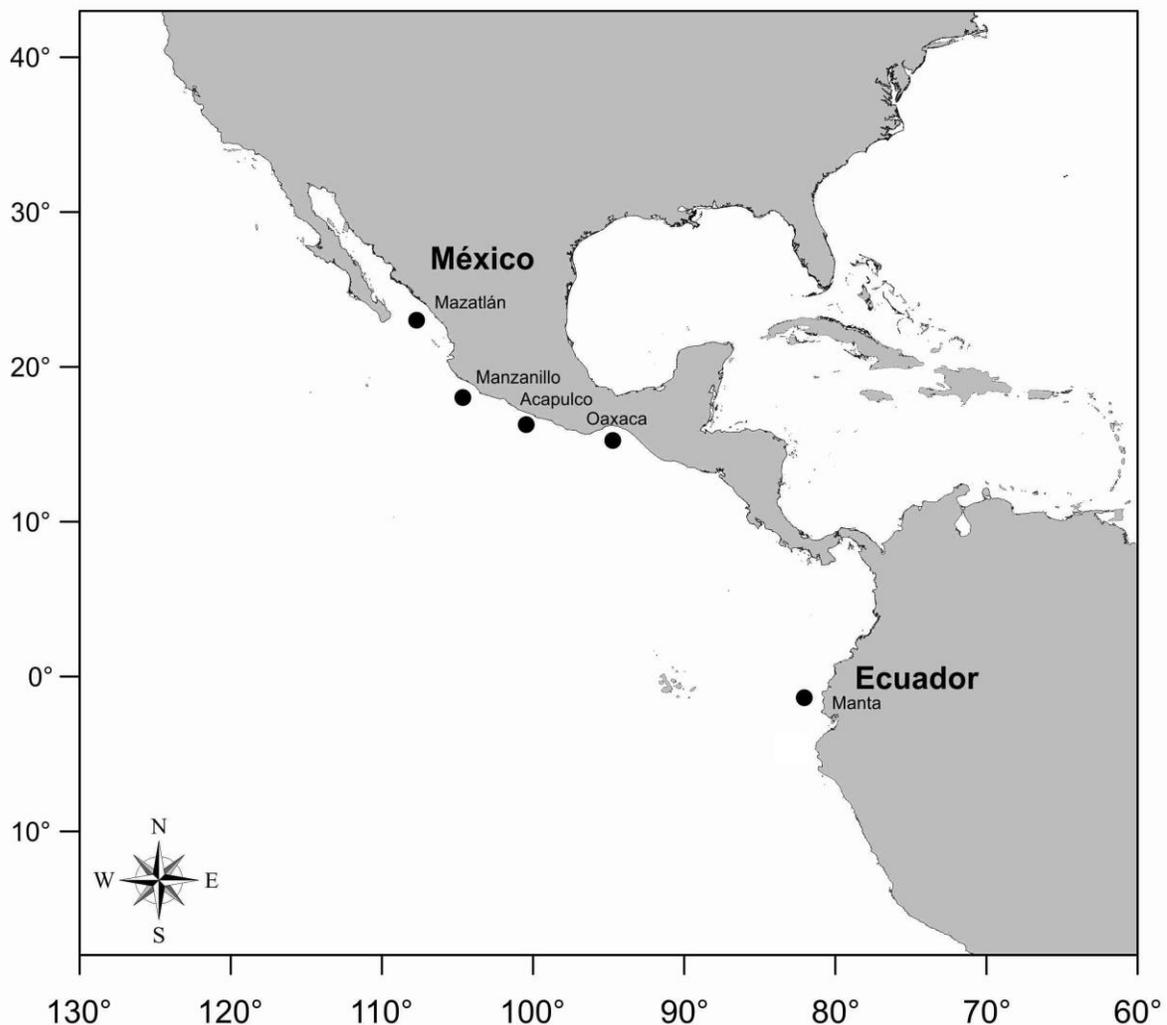


Figura 2. Sitios de muestreo de *I. platypterus* en el Pacífico Oriental.

Tabla 2. *Primers* diseñados para amplificar la Región Control del ADNmt de *I. platypterus*.

Primer	Secuencia 5' → 3'	Tamaño del producto (bp)	T_m °C
<i>lpla-F</i>	CCCTAACTCCCAAAGCTAGGA	600	58
<i>lpla-R</i>	CCTGATATCCTGATTATGGTGGA		

Extracción de ADN

La extracción del ADN genómico se realizó empleando tejido muscular de cada individuo y un kit de extracción comercial (DNeasy Blood and Tissue Kit, Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 1). La calidad del ADN extraído se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñido con Gelgreen (Biotium Inc.) y visualizado en un fotodocumentador de luz ultravioleta (Anexo 2). Posteriormente, las muestras extraídas fueron almacenadas a -20 °C.

Amplificación de ADN

El ADN extraído se utilizó para amplificar un fragmento de la región control del ADN mitocondrial mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los *primers lpla-F* e *lpla-R*, descritos en el apartado anterior. Las reacciones se realizaron en volúmenes de 35 µl conteniendo una concentración final de 1X Buffer Taq, 0.2 mM de dNTP mix, 0.48 µM de cada *primer*, 4.0 mM de MgCl₂ y 0.05 U/µl de Taq DNA polimerasa. El volumen de la reacción final fue completado con Agua miliQ. La PCR se realizó con el perfil de termociclado que se muestra en la Tabla 3. Las amplificaciones fueron confirmadas mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, teñidos con Gelgreen y visualizadas en un fotodocumentador con luz ultravioleta.

Tabla 3. Perfil térmico para la PCR de la Región Control del ADNmt.

Paso	Proceso	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
1	Desnaturalización inicial	94	2min	1
	Desnaturalización	94	30s	
2	Apareamiento	58	45s	35
	Extensión	72	1min	
3	Extensión final	72	3min	1

Secuenciación de ADN

Los productos amplificados de manera exitosa fueron secuenciados en ambos sentidos (Macrogen, Inc.) utilizando los mismos *primers* empleados en la amplificación. Macrogen utiliza la secuenciación a gran escala desarrollada por “Applied Biosystems”, usando el modelo 3730XL.

Edición y alineamiento de secuencias

Las secuencias obtenidas para cada individuo fueron alineadas y editadas empleando los programas Sequencher 5.2.4 (Genes Codes Corp., Ann Arbor, Michigan, USA) y Chromas Pro v1.7.7 (Technelysium Pty, Ltd), con el fin de determinar los sitios nucleotídicos homólogos y las variaciones derivadas de eventos mutacionales más que de errores en la técnica. Posteriormente, se realizó un alineamiento múltiple empleando el algoritmo Clustal W (Thompson *et al.*, 1997) incluido en el programa Mega v6 (Tamura *et al.*, 2013) usando los ajustes por defecto.

Diversidad genética

Con el programa DNAsp (Librado & Rozas, 2009) se estimó el número de haplotipos mitocondriales (M) y número de sitios segregantes (S). La variación genética en cada una de las zonas y combinando el total de muestras se estimó a partir de la diversidad haplotípica (h) y la diversidad nucleotídica (π). La primera mide la probabilidad de que dos haplotipos seleccionados al azar de una muestra sean diferentes. Es el equivalente a la heterocigosidad esperada para datos diploides y estima la variabilidad genética en términos del número de haplotipos presentes en la muestra y sus respectivas frecuencias (Nei, 1987). La diversidad nucleotídica, evalúa la probabilidad de que dos nucleótidos homólogos seleccionados al azar sean diferentes (Nei, 1987). Se obtiene valorando el número promedio de nucleótidos diferentes por sitio entre dos secuencias.

Diferenciación y estructura genética

La diferenciación genética entre poblaciones se determinó mediante un análisis de varianza molecular (AMOVA). Este análisis es similar a otros que emplean la varianza de las frecuencias génicas, pero considera también el número de mutaciones que ocurren entre haplotipos empleando un análisis jerárquico para evaluar las diferencias dentro y entre individuos de una población y entre poblaciones, para definir los índices de fijación definidos por Wright (1978) en función de coeficientes de endogamia.

También se obtuvo el estadístico Φ_{ST} (análogo a F_{ST}) para cada par de localidades y se realizaron comparaciones pareadas con la intención de detectar aquellas que pudieran ser distintas. Debido a que para calcular las distancias entre pares de secuencias es necesario especificar un modelo de evolución para los datos, se utilizó el programa jModeltest 0.1.1. (Posada, 2008). Los modelos evolutivos describen el modo y la probabilidad de que una secuencia de nucleótidos cambie a

otra secuencia de nucleótidos homóloga a lo largo del tiempo. El modelo que se ajustó a nuestros datos fue el de Kimura 2-parámetros ($\gamma = 0.261$) (Kimura, 1981). Todas las estimaciones de diversidad y los análisis estadísticos se calcularon en el programa Arlequin 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005).

The Isolation By Distance Web Service (IBDWS) versión 3.15 (Jensen *et al.*, 2005) fue utilizado para llevar a cabo un análisis de aislamiento por distancia (IBD). Éste, fue basado en una prueba de Mantel empleando 30,000 permutaciones sobre matrices de distancias genéticas y distancias geográficas para su relación. La pendiente y el intercepto de esta relación se estimó a partir de una regresión del eje mayor reducido (RMA). Los valores de Φ_{ST} fueron ajustados con la siguiente transformación: Rousset's genetic distance $\Phi_{ST}/(1 - \Phi_{ST})$ (Rousset, 1997) y las distancias geográficas entre los sitios de muestreo fueron obtenidos de Google EarthTM (<http://earth.google.com>).

Para determinar la estructuración geográfica del pez vela en el Pacífico Oriental se utilizó el programa BAPS 6.0 (Bayesian Analysis of Population Structure; Corander *et al.*, 2008), que permite subdividir las secuencias en unidades poblacionales genéticamente homogéneas mediante un método de inferencia bayesiana, donde el número de grupos está dado bajo el modelo de admixia. Las estimaciones se hicieron incluyendo las coordenadas geográficas por sitio de muestreo obtenidas de Google EarthTM. El análisis se realizó asumiendo grupos (K) de 1, 3, 5 y 10, con cinco réplicas para cada valor de K. Obteniéndose un valor de K correspondiente al número teórico de poblaciones en las que están divididas nuestras muestras. Se estima la probabilidad posterior ($\ln Pr(i/K)$) de que el individuo (i) provenga de una población (K). Por último, la estructura genética poblacional se dedujo de manera jerárquica utilizando hierBAPS (Cheng *et al.*, 2013).

Análisis filogeográfico

La filogeografía es el campo de estudio relacionado con los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de linajes de genes, sobre todo aquellos entre y dentro de especies cercanamente relacionadas (Avice, 2000). Como resultado, es un enfoque útil para la investigación de una amplia gama de temas, incluyendo el flujo de genes, cuellos de botella y expansión poblacional (Arbogast & Kenagy, 2001). El patrón filogeográfico del pez vela en el Pacífico Oriental se exploró a través de una red de mínima expansión usando el método Media Joining (Bandelt et al. 1999), implementado en NETWORK 4.6.1.2 (www.fluxusengineering.com/sharenet.htm). Este método conforma un arreglo de haplotipos basados en sus distancias genéticas y tomando en cuenta sus frecuencias y procedencia geográfica.

Historia demográfica

Finalmente, la historia demográfica fue revisada en referencia al análisis de la distribución de las diferencias nucleotídicas pareadas (mismatch distribution) (Rogers & Harpending, 1992), a partir de las cual se estimaron los parámetros demográficos τ , θ_0 y θ_1 , se realizó una prueba de bondad de ajuste con el Índice de Desigualdad de Harpending (Hri) (Harpending, 1994) y con la Desviación de la Suma de Cuadrados (SSD) (Schneider & Excoffier, 1999). La distribución de las frecuencias de las diferencias pareadas es un histograma que compara dicha distribución con una distribución esperada bajo un modelo neutral (tamaño poblacional constante o expansión poblacional). Una distribución de tipo unimodal indicaría un evento de expansión poblacional luego de un cuello de botella o un efecto fundador ancestral, mientras que una distribución mismatch multimodal reflejaría un escenario de tamaño poblacional constante o subdivisión poblacional (Rogers, 2002).

La prueba de Tajima (1989) fue utilizada para observar posibles desviaciones de neutralidad. Estos cálculos se realizaron en ARLEQUIN 3.0 y los tiempos de expansión se calcularon a partir de la formula $\tau = 2\upsilon t$ (Rogers & Harpending, 1992), en donde tau (τ) es el valor máximo de la distribución, υ representa la tasa de mutación y t es el tiempo desde la expansión.

Microsatélites

Aislamiento y Caracterización de marcadores microsatélites

El ADN genómico total se aisló utilizando un kit de extracción comercial (QIAGEN) y ~25 g de tejido muscular a partir de una muestra de *I. platypterus* obtenida de Oaxaca, México. La calidad del ADN extraído se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Posteriormente se construyó una biblioteca genómica (Shotgun Genomic Library) usando ~5 µg de ADN, el cual fue secuenciado al azar mediante tecnología de pirosecuenciación 454 GS-FLX Titanium (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) en la Universidad de Arizona.

Después de realizar un filtro de calidad utilizando el métrico “Phred quality score” de $Q > 20$ o bien un 99% de calidad (Ewing & Green, 1998), se obtuvo un total de 118,327 lecturas únicas con una longitud promedio de 670 pares de bases (bp). Se realizó la búsqueda de microsatélites dinucleótidos que contenían por lo menos 10 repeticiones perfectas y microsatélites tetranucleótidos con al menos 8 repeticiones perfectas utilizando el software QDD (Megléczy *et al.*, 2010), el cual implementa CLUSTALw2 (Larkin *et al.*, 2007), BLAST (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/executables/>) y PRIMER3 (Rozen & Skaletsky, 2000) usando Perl (<http://www.activestate.com/ActivePerl/>) para diseñar *primers* basados en secuencias únicas, concatenadas y consenso. Las secuencias de *loci* duplicadas y los elementos móviles fueron identificados como grupos de secuencias similares, es decir que presentaban un 95% de similitud en las regiones flanqueantes ≥ 30 bp, por lo que fueron eliminadas.

Para el diseño de *primers* se utilizaron secuencias únicas mayores a 120 bp y secuencias consensos a partir de contigs que fueran $\geq 95\%$ en regiones > 30 bp de flaqueo. Se obtuvieron 124 microsatélites dinucleótidos y 30 tetranucleótidos que cumplieron con estos criterios. Se probaron 30 tetranucleótidos y 30 dinucleótido con

el mayor número de repeticiones (>8) en 8 organismos de *I. platypterus* capturados en Oaxaca, México.

Con el objetivo de marcar con fluorescencia las amplificaciones de los microsatélites, una secuencia M13 (CACGACGTTGTAAAAC) fue añadida al extremo terminal 5' de cada uno de los *primers* forwards (Schuelke, 2000). Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron en volúmenes de 15µL con 20-40 ng de ADN genómico, 1X Colorless GoTaq Flexi buffer, 0.2 mM de cada dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 U GoTaq DNA polymerase (Promega, Madison, USA), 0.02 µM del *primer* forward, 0.2 µM del *primer* forward M13 etiquetado con 6-FAM, y 0.2 µM del *primer* reverse. Se utilizó el perfil térmico de PCR Touchdown que se muestra en la Tabla 4.

Los productos de PCR fueron enviados al Centro de Genómica de la Universidad de Arizona (UAGC, <http://uagc.arl.arizona.edu/>), donde se llevó a cabo el análisis de fragmentos en un secuenciador Applied Biosystem 3730XL. Una vez obtenidos, la identificación de los tamaños de los alelos se realizó con el programa GeneMarker 2.4 (SoftGenetics, State College, PA) y la agrupación de alelos con tamaños similares se realizó con el programa FLEXIBIN (Amos *et al.*, 2007). La heterocigosidad observada y esperada, así como el número de alelos se calcularon usando el programa GENALEX 6.5 (Peakall & Smouse, 2012). El programa MICROCHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004) fue usado para probar la presencia de errores ocurridos durante la asignación de genotipos y para identificar la presencia de alelos nulos. Las desviaciones de Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) y el desequilibrio por ligamiento (DL) se estimaron con el programa en línea GENEPOP 4.2 (Raymond & Rousset, 1995) y el programa FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 1995), respectivamente. El valor de P ($\alpha = 0.05$) fue ajustado utilizando la prueba para comparaciones múltiples de Bonferroni (Rice, 1989)

Tabla 4. Perfil térmico Touchdown para la PCR de los microsatélites.

Paso	Proceso	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
1	Desnaturalización inicial	94	5min	1
	Desnaturalización	94	30s	
2	Apareamiento	65-50*	30s	15
	Extensión	72	30s	
	Desnaturalización	94	30s	
3	Apareamiento	55	30s	40
	Extensión	72	30s	
4	Extensión final	72	5min	1
5	Final	12	∞	1

*Disminuye 1 °C cada ciclo

Se amplificaron exitosamente 12 microsatélites dinucleótidos y 11 tetranucleótidos en 32 individuos (Tabla 5). El número promedio de alelos por *locus* varió de 1 a 20 con un promedio de 9.6 para dinucleótidos y de 1 a 16 con promedio de 5.9 para tetranucleótidos. La heterocigosidad observada varió de 0.00 a 0.935, con un promedio de 0.599; mientras que la heterocigosidad esperada presentó un rango de 0.00 a 0.917, con promedio de 0.624. Dos *loci* fueron monomórficos (*lpla23* e *lpla42*), y en ningún par de *loci* se presentó DL ($P < 0.00002$). Cinco *locus* mostraron significativas desviaciones de EHW ($P < 0.0021$) (*lpla2*, *lpla36*, *lpla40*, *lpla47* e *lpla57*). Se observó la presencia de alelos nulos para los *loci*: *lpla2* (Frecuencia de alelo nulo = 0.089), *lpla35* (Frecuencia de alelo nulo = 0.056), *lpla40* (Frecuencia de alelo nulo = 0.192), *lpla47* (Frecuencia de alelo nulo = 0.178) y *lpla57* (Frecuencia de alelo nulo = 0.093). Considerando lo anterior, de los 23 microsatélites probados se utilizaron 15 para los análisis poblacionales (en la tabla 5 se muestran con *).

Tabla 5. Aislamiento y caracterización de 23 *loci* microsatélites en *I. platypterus*. (M.R.) Motivo de repetición, (N_A) número de alelos, (H_o) la heterocigosidad observada y (H_e) heterocigosidad esperada.

<i>Locus</i>	M.R.	Secuencias de <i>primers</i> F y R	Tamaño esp. (bp)	Rango obs (bp)	N_A	$H_o - H_e$
lpla2	gcac ₍₁₄₎	F: GGTGATTTGGAGCAGTGCAA R: ATCAGCCTCACAGCAGGAAA	133	123-157	8	0.688- 0.836
lpla4*	cttt ₍₁₂₎	F: TGAATGTGTTCCACCCACTG R: TTGAATGATGAGGTGGTGTGA	168	173-189	5	0.625- 0.604
lpla6*	ctat ₍₁₁₎	F: CCCTGTGATGAAATGTGCTG R: TGCCTGCATGTTAGCTTTTG	328	333-448	16	0.882- 0.917
lpla12*	catc ₍₁₀₎	F: GAGAGGGATTTACATTGGAGTCA R: CATGCAACCTGGATAAGTGG	212	215-255	8	0.719- 0.731
lpla17*	agac ₍₉₎	F: TGTGGCACTGAGTGTCTGGT R: CTTGCAGCTGCCCTCTGT	166	179-195	5	0.844- 0.757
lpla20*	agac ₍₈₎	F: GTGGTTGCCTAGCAACAGGT R: GGACGGGCTCTGTTCTTCTA	132	146-154	3	0.656- 0.493
lpla21*	gttt ₍₈₎	F: GTGTGAATGCGTGTGAGACC R: GAGGAGACCTGTGAGTGGGA	157	167-184	5	0.625- 0.606
lpla23	atga ₍₈₎	F: CACCGATTTTCTGGTTCGTT R: CATTTCATCTTTCCACTCCGC	212	231-232	1	0.000- 0.000
lpla24*	attt ₍₈₎	F: GGGTGGATCTTCACAACGTC R: CTGTTTGCTGCCAGTTGTTT	242	241-261	3	0.406- 0.344
lpla25*	acag ₍₈₎	F: CCTCAGAACCACAGACCTGC R: CAGCAGCAACATGAGTCATTC	132	130-148	4	0.677- 0.583
lpla26*	tgga ₍₈₎	F: GTAAGCAAGGCTGGATGGAG R: ACCCTGTGCTGCTATATGGG	158	168-227	7	0.656- 0.697
lpla35	ac ₍₃₃₎	F: GCATCATGTGATTGGGTTGT R: TCCAGCAACAATCTGCAAAG	167	160-184	13	0.78 - 0.883
lpla36	ca ₍₃₂₎	F: CTCCTGTTGCTTGGAAAGCTC R: TGCCATAGTTAGAACTGCCG	134	138-157	9	0.750- 0.743
lpla40	ac ₍₃₀₎	F: CTGCAACACCTCAGGAAACA R: CCATCACAACTTACAAACGTCA	156	171-187	6	0.414- 0.675
lpla42	tg ₍₂₈₎	F: ATGTCAGCCCTGTTGCTTCT R: TGAACCGGTGTCATCACTGT	361	365-365	1	0.000- 0.000
lpla45*	tg ₍₂₈₎	F: GTGGGCACATTTGTCTTGG R: TTCTGTGTTAAGCCCAGGGT	131	128-173	20	0.935- 0.917
lpla47	ca ₍₂₇₎	F: TCCATCACTCGCTCCCTTAC R: CAGTCGTTGCTTCGTTTGTG	167	166-186	9	0.531- 0.831

lpla51*	tg ₍₂₆₎	F: AGCCTGGTCCCAAATAACCT R: GATCAGAACCTGAAACCCGA	376	370-380	6	0.824- 0.771
lpla55*	tg ₍₂₅₎	F: ATAAAGGCCTCGACTCTCCC R: CCTGTAAGCTGCCTGTAGCC	231	237-255	8	0.813- 0.801
lpla56*	ac ₍₂₅₎	F: ACTACTTCAACACCCGGGGA R: CTCCTCGGTATCCAGCACTT	141	137-158	10	0.813- 0.801
lpla57	tg ₍₂₅₎	F: CATGAGCACTTCAGGGAGAA R: GCTCTGCATCGTCATACCCT	150	140-175	12	0.719- 0.882
lpla59*	tg ₍₂₄₎	F: AACCACTTTGGGTTGCCATA R: TGTGCAAAGCCTTTTGATTT	214	236-245	4	0.813- 0.664
lpla60*	tg ₍₂₄₎	F: GTTAAGGCTCGGTTTAGGGG R: TGGTCCCTACACAGGACACA	174	176-215	15	0.933- 0.874

*Microsatélites seleccionados para los análisis poblacionales.

Amplificación de microsatélites

Para los 15 microsatélites seleccionados (Tabla 5), las reacciones de amplificación por PCR se realizaron en volúmenes de 15µL con 20-40 ng de ADN genómico, 1X Colorless GoTaq Flexi buffer, 0.2 mM de cada dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 U GoTaq DNA polymerase (Promega, Madison, USA), 0.02 µM del primer forward, 0.2 µM del primer forward M13 etiquetado NED, PET, VIC o 6 FAM, y 0.2 µM del primer reverse. Se utilizó el perfil térmico de PCR Touchdown que se muestra en la tabla 4.

Con el objetivo de optimizar el uso de reactivos de laboratorio y servicio para los análisis de fragmentos, se diseñó un método POOLPLEX utilizando el programa MULTIPLEX Manager 1.0 (Holleley & Geerts, 2009). Esta estrategia consistió en que una vez que se obtuvieron las reacciones de PCR, sus productos fueron mezclados en grupos que tomaron en cuenta el tamaño del fragmento y el color del marcador etiquetado con fluorescencia (NED, PET, VIC y 6 FAM) (Fig. 3). De esta manera, el análisis de fragmentos fue realizado por grupos.

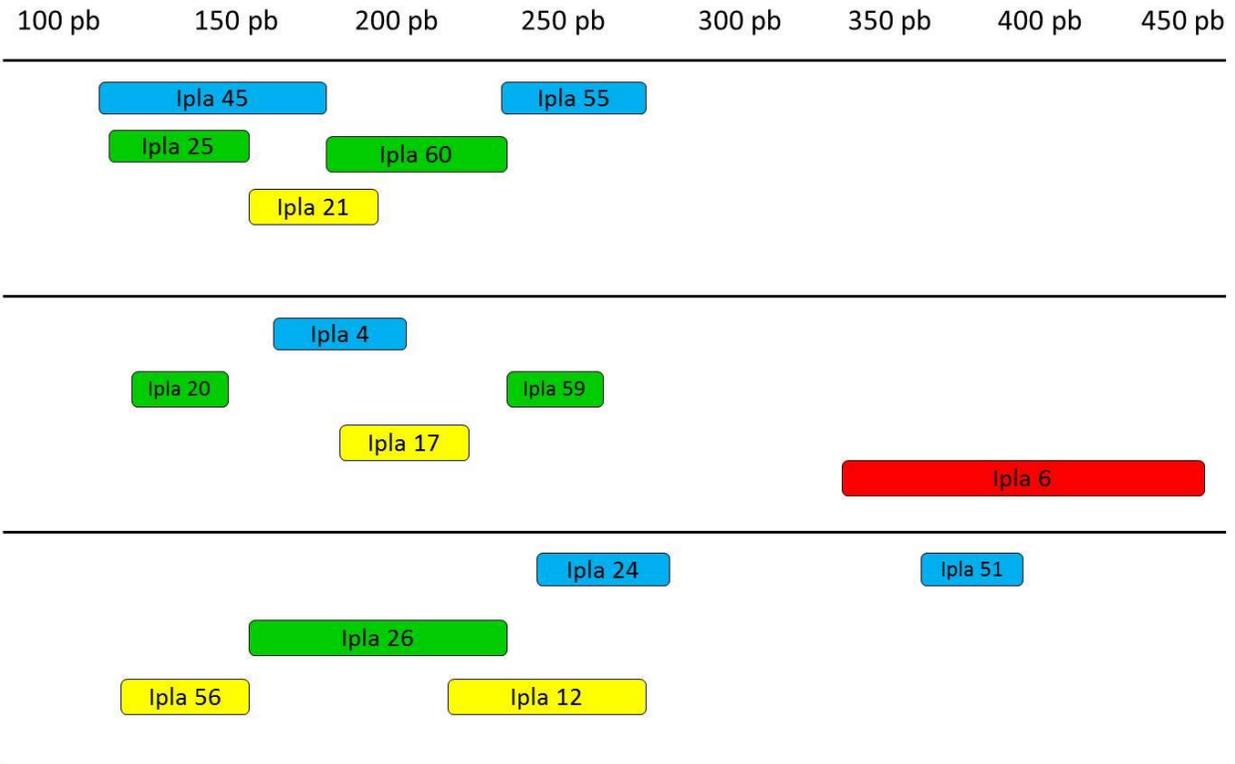


Figura 3. Diseño POOLPLEX para los 15 *loci* microsatélites con los cuatro marcadores fluorescentes.

Análisis de fragmentos y asignación de genotipos

Las amplificaciones de PCR fueron enviadas al UAGC, donde se realizó el análisis de fragmentos en un secuenciador Applied Biosystem 3730XL.

El genotipado se efectuó a través de programa GeneMarker 2.4 (SoftGenetics, State College, PA) con el que se determinó el tamaño en pares de bases de los alelos a partir de los electroferogramas. Posteriormente la asignación de alelos se realizó con el programa FLEXIBIN (Amos *et al.*, 2007).

Diversidad genética

La diversidad genética fue estimada con el programa GenAlex (Peakall & Smouse, 2012). Se obtuvo el número de alelos (N_a), número de alelos efectivos (N_e), número de alelos privados (N_p), la heterocigosidad observada (H_o), la heterocigosidad esperada (H_e) y las desviaciones de Equilibrio Hardy-Weinberg (HWE).

El programa GENEPOP (Raymond & Rousset, 1995) fue empleado para corroborar los valores de EHW utilizando Cadenas de Markov con 10,000 dememorizaciones, muestreo de 100 conjuntos (Batch) y 10,000 iteraciones por batch. La estimación de la riqueza alélica por población se realizó mediante el método de rarefacción incorporado en el programa HP-RARE (Kalinowski, 2005) ponderado para el tamaño mínimo de muestra detectado en las cinco zonas de muestreo.

Con el programa MICRO-CHECKER (Van Oosterhout *et al.*, 2004) se estimó la frecuencia de alelos nulos por locus por población según el método de Brookfield (1996). El criterio de significancia de todas las pruebas ($P < 0.05$) fue ajustada empleando una prueba secuencial de Bonferroni para comparaciones múltiples (Rice, 1989).

Diferenciación y estructura genética

La diferenciación genética dentro y entre sitios fue estimada a partir de un análisis de varianza molecular (AMOVA), el cual consiste en determinar la cantidad de variabilidad genética contenida dentro y entre grupos, por medio de un análisis jerarquizado con una matriz de distancias a partir de los estadísticos F de Wright (Excoffier *et al.*, 1992). Además se estimaron los niveles de diferenciación genética entre las localidades calculando los valores F_{ST} pareados en el programa GenAlex

(Peakall & Smouse, 2012). Debido a que la presencia de alelos nulos podría producir una sobreestimación de las distancias genéticas, las estimaciones de F_{ST} se calcularon también por el método de exclusión de alelos nulos (ENA) en el programa FreeNA (Chapuis & Estoup, 2007).

A pesar de que el estadístico F_{ST} de Wright ha sido ampliamente utilizado como una medida de estructura poblacional, Jost (2008) menciona que los valores de F_{ST} bajo condiciones de elevada heterocigosidad promedio dentro de las poblaciones, pueden subestimar la diferenciación genética. Por lo tanto, la diferenciación poblacional fue también estimada usando el estadístico D_{ST} , el cual se basa más en el número de alelos que en la heterocigosidad esperada (Jost, 2008). Para el cálculo del D_{ST} , se utilizó el software GENODIVE 2.0b24 (Meirmans & Van Tienderen, 2004).

Para identificar el número de grupos diferenciados genéticamente, se realizó un análisis basado en un modelo bayesiano implementado en el software STRUCTURE v. 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000). Este análisis permite estimar el número de grupos (K) representados por los individuos muestreados y las proporciones de mezcla de individuos. El algoritmo contenido en STRUCTURE supone un modelo en el cuál existen K (K= poblaciones) y donde cada K es caracterizada por una serie de frecuencias alélicas en cada locus, este algoritmo busca grupos que maximicen EHW y minimicen DL. Los individuos son asignados con una probabilidad asociada a una población en particular, o asociados a dos o más poblaciones (en el caso de que sus genotipos indiquen que están mezclados). El número de grupos se infirió utilizando una periodo de calentamiento (burn-in) de las cadenas de Markov (MCMC) de 1,000,000, seguida por 2,000,000 de repeticiones, 15 iteraciones por cada valor de K. El rango de grupos analizado fue para K entre 1 y 5. Se utilizó el modelo que permite la formación de grupos a partir de una mezcla histórica de poblaciones (Admixture), con las frecuencias alélicas correlacionadas y utilizando la localidad como información a priori (LOCPRIOR) para ayudar a la identificación de grupos en presencia de niveles bajos de estructura

genética (Hubisz *et al.* 2009). Los resultados obtenidos de cada una de las 15 iteraciones realizadas con STRUCTURE, fueron agrupados con los programas en línea Structure harvester usando el estadístico ΔK de Evanno (Earl & vonHoldt 2011) y CLUMPAK (Kopelman *et al.* 2015).

Tasas de migración direccional por generación

La migración es también uno de los factores que determina la estructura de las poblaciones. A menudo los genetistas utilizan el término migración para referirse al flujo genético, por lo tanto la migración implica el movimiento de un individuo reproductor de una población a otra y el éxito de la contribución de material genético en la población receptora (Gharrett & Zhivotovsky, 2003), ya que sin éxito reproductivo la migración no puede ser considerada como flujo génico. Con el programa BAYESASS 3.0.3 (Wilson & Rannala, 2003) se realizó una estimación de las tasas de migración reciente y direccional entre las poblaciones utilizando un esquema de asignación bayesiana de individuos a poblaciones. Se consideró una longitud de datos descartados o burn-in de 10,000,000 pasos, de un total de 100,000,000 iteraciones y una frecuencia de muestreo cada 10,000 iteraciones. El modelo de mezcla para las MCMC utilizó parámetros continuos como frecuencia alélica (-a), coeficiente de endogamia (-f) y tasas de migración (-m), con valores iniciales de (-a= 0.8, -f= 0.6 y -m= 0.8), el valor de cada parámetro se fue ajustando hasta que la tasa de aceptación para cada uno de los parámetro presentó valores de entre 20% y 60% (Wilson & Rannala, 2003).

Análisis de parentesco

La estimación de relaciones entre individuos es una medida continua de identidad por descendencia global. Entonces, los estudios enfocados a calcular la relación entre individuos se expresan en términos de probabilidades de que un conjunto de alelos descendan de un único alelo ancestral, lo que determina la probabilidad de que dos alelos idénticos lo sean por descendencia. Los coeficientes

de relación genética promedio dentro de cada población (r) se calcularon a partir de matrices de distancia entre cada par de individuos, utilizando la frecuencia alélica de acuerdo al estimador promedio (r) descrito por Queller & Goodnight (1989) en GenAlex 6.5 (Peakall & Smouse, 2012). Estos cálculos se realizaron con 9999 permutaciones, 10,000 bootstraps. Teóricamente, el valor de r entre individuos o grupos de individuos que comparten ambos parentales (hermanos completos) debe ser como mínimo $r = 0.5$, mientras que los medio-hermanos que sólo comparten el 25 % de su genoma, deben exhibir, como mínimo, el valor $r = 0.25$ (Queller & Goodnight, 1989).

Cuellos de botella recientes

Para determinar si el pez vela del Pacífico Oriental ha sufrido un cuello de botella reciente se utilizó el programa BOTTLENECK (Piry *et al.*, 1999), el cual lleva a cabo tres pruebas para detectar reducciones recientes del tamaño efectivo poblacional (prueba de significancia, prueba de las diferencias estandarizadas y prueba de Wilcoxon), entendiendo como recientes las ocurridas en las últimas 2 a 4 generaciones (Piry *et al.*, 1999). El programa BOTTLENECK calcula para cada locus la distribución de la heterocigosidad esperada (H_e) a partir de los alelos observados, asumiendo un equilibrio mutación-deriva. Se utilizó el modelo de mutación de dos pasos (TPM) el cual utiliza tanto el modelo de mutación gradual (SMM), como el de alelos infinitos (IAM). Para el análisis se asignó una probabilidad de 95% para el modelo SMM y un 5% para IAM (Di Rienzo *et al.* 1994).

RESULTADOS

Región control del ADNmt

De los 281 individuos analizados se obtuvo un 89% de éxito en las secuenciaciones (250 secuencias) de la región control del ADNmt, lo cual, junto con las 243 secuencias obtenidas del Genbank, sumaron un total de 493 secuencias. Estas secuencias fueron evaluadas en dos escalas espaciales: una oceánica (Pacífico Oriental y Atlántico) y otra regional (Pacífico Oriental). Para el análisis oceánico se empleó el total de secuencias (incluyendo las obtenidas de Genbank), mientras que en el análisis regional solo se utilizaron las secuencias generadas en esta investigación (México y Ecuador).

Análisis Pacífico Oriental-Atlántico

Diversidad genética

Para las comparaciones oceánicas, las secuencias de la región control del ADNmt generadas en este trabajo fueron limitadas a 227 bp, ya que las secuencias descargadas de GenBank presentaron ese tamaño.

En total se analizaron 493 secuencias, de las cuales se identificaron 217 haplotipos. La diversidad nucleotídica fue de 0.0622 ± 0.0310 para el Atlántico y de 0.0085 ± 0.0053 para el Pacífico Oriental. En general, los valores de la diversidad haplotípica, la diversidad nucleotídica, y el número medio de diferencias pareadas fueron menores en la muestra del Pacífico Oriental que en las muestras del Atlántico (Tabla 6).

Diferenciación y estructura genética

El análisis de varianza molecular mostró que el 56.46% de la varianza total fue atribuible a diferencias genéticas entre sitios de muestreo, con un valor de Φ_{ST} significativamente diferente de cero ($\Phi_{ST}= 0.564$, $P=0.000$) (Tabla 7).

Tabla 6. Medidas de la diversidad genética de *I. platypterus* en los océanos Pacífico Oriental y Atlántico, incluyendo el número de individuos (n), el número de sitios segregantes (S) y número de haplotipos mitocondriales (M).

Zona	n	S	M	Diversidad haplotípica (h)	Diversidad nucleotídica (π)	Haplotipo frecuente
Pacífico Oriental	272	59	79	0.8297 +/- 0.023	0.0085 +/- 0.0050	Hap_53 (110)
Atlántico	221	112	143	0.9779 +/- 0.005	0.0622 +/- 0.0300	Hap_6 (27)

Tabla 7. Análisis de varianza molecular de *I. platypterus* entre muestras de los océanos Pacífico Oriental y Atlántico.

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componente de varianza	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	1	1172.60	4.7933 Va	56.46
Dentro de las poblaciones	491	1815.22	3.6969 Vb	43.54
Total	492	2987.82	8.4903	

$F_{ST}= 0.5645$

Análisis filogeográfico

El análisis filogeográfico a través de la red de haplotipos confirmó la diferenciación genética entre cuencas oceánicas, desarrollando una red donde se observaron principalmente dos clados, uno con haplotipos representativos de un solo océano (Atlántico) y otro con haplotipos presentes en ambos océanos (Atlántico y Pacífico Oriental) (Fig. 4).

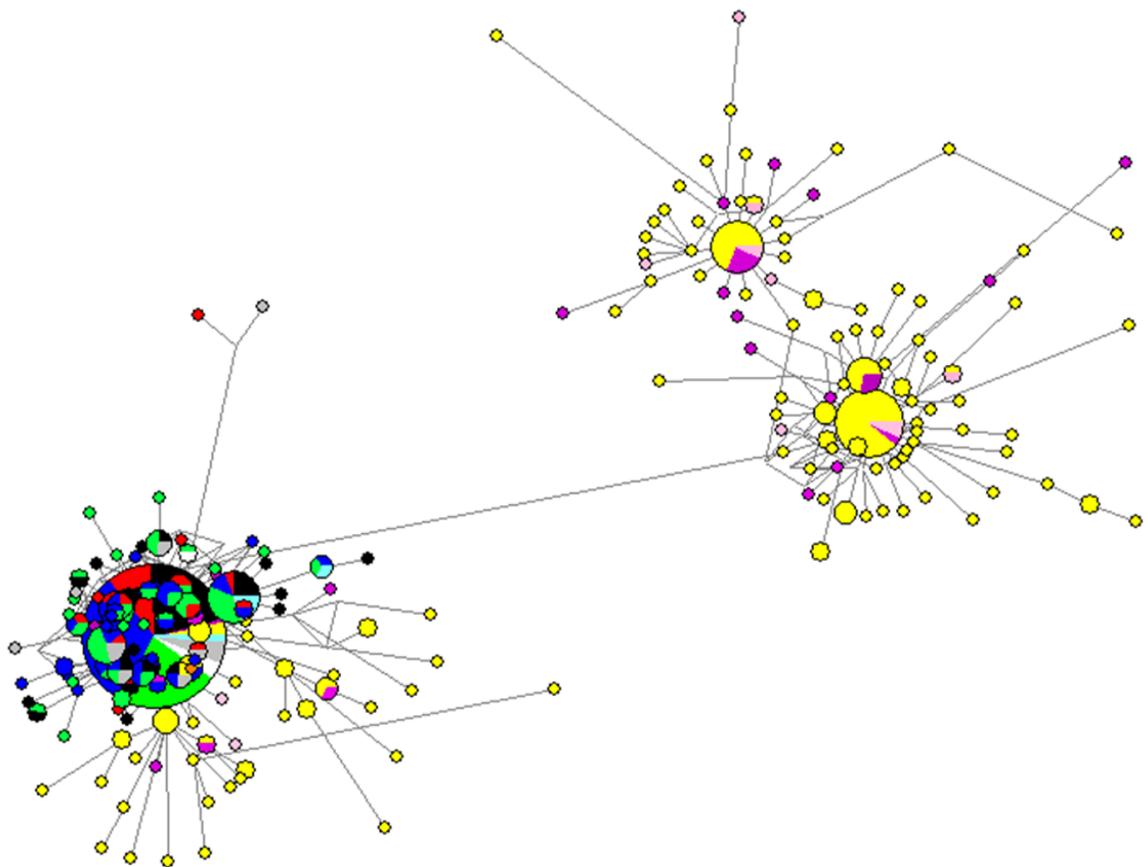


Figura 4. Red de mínima expansión (MJ Network) de todos los datos de pez vela en el Pacífico Oriental y Atlántico. Cada círculo representa un haplotipo observado, el tamaño del círculo es proporcional a la frecuencia del haplotipo y el color indica cada sitio de muestreo. Mazatlán (azul rey), Manzanillo (rojo), Acapulco (negro), Oaxaca (verde), Ecuador (azul cielo), Golfo de México (amarillo), Caribe (rosa) y Golfo de Guinea (morado).

Historia demográfica

La distribución de diferencias pareadas para el Pacífico Oriental presentó una curva unimodal indicando expansión poblacional, mientras que en el Atlántico mostró una curva multimodal con valores no significativos de las pruebas de neutralidad, sugiriendo que los organismos del Atlántico no han presentado un evento reciente de expansión poblacional (Fig. 5).

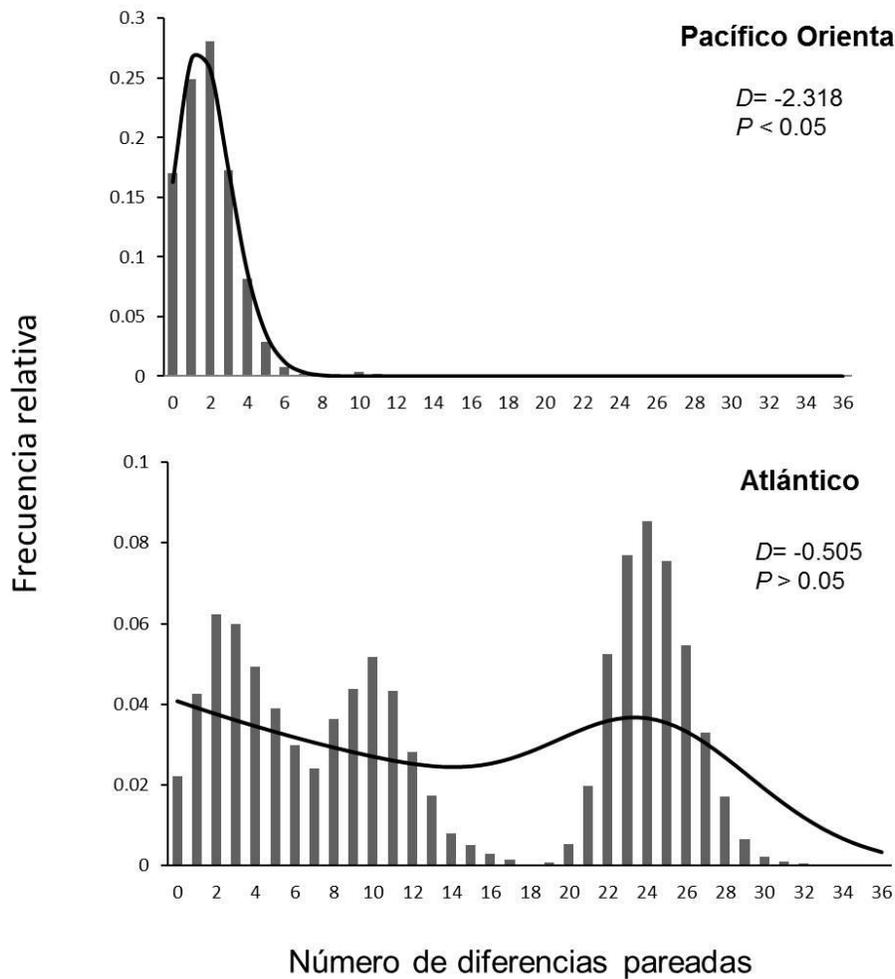


Figura 5. Distribución de diferencias pareadas y valores de la prueba D de Tajima para el pez vela del Pacífico Oriental y el Atlántico.

Análisis Pacífico Oriental

Debido a que las muestras se recolectaron en varios años, se llevó a cabo una comparación temporal de la diversidad y estructura genética, para este análisis se utilizaron los individuos recolectados durante 2008-2009 en las costas de México. En la Tabla 8 se muestran los valores de diversidad haplotípica y diversidad nucleotídica por años en cada una de las zonas. El resultado del análisis de varianza molecular no mostró diferencias significativas entre años de muestreo ($P > 0.05$), por lo que se procedió a llevar a cabo el análisis espacial sin considerar el tiempo.

Diversidad genética

Un segmento de aproximadamente 530 bp de la región control del ADNmt se obtuvo de 250 organismos secuenciados para el Pacífico Oriental. Las secuencias fueron depositadas en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) con número de acceso Genbank KR920366–KR920615.

Tabla 8. Diversidad genética temporal de *I. platypterus* en las costas del Pacífico mexicano.

Zona	Año	n	Haplotipos	Diversidad haplotípica	Diversidad nucleotídica
Mazatlán	2008	39	33	0.9879	0.006
	2009	42	30	0.9338	0.005
Manzanillo	2008	8	6	0.8929	0.005
	2009	20	16	0.9211	0.006
Acapulco	2008	30	24	0.9724	0.007
	2009	30	28	0.9931	0.007
Oaxaca	2008	36	28	0.9841	0.007
	2009	38	30	0.9787	0.007

Se identificaron 134 haplotipos y 116 sitios polimórficos, de los cuales 64 presentaron información parsimoniosa. La diversidad haplotípica varió de 0.902 ± 0.015 en Manzanillo, México a 1.000 ± 0.076 en Ecuador y la diversidad nucleotídica global fue de 0.007 ± 0.004 , con valores que oscilaron entre 0.0062 ± 0.0036 en Manzanillo y 0.0082 ± 0.0045 en Oaxaca (Tabla 9). En la figura 6 se muestra la distribución de los tres haplotipos más frecuentes para cada uno de los sitios de muestreo (en Ecuador todos los haplotipos presentaron la misma frecuencia, por lo que se seleccionaron los haplotipos compartidos con los sitios de México. En el anexo 3 se presentan las frecuencias haplotípicas para cada uno de los sitios de muestreo.

Diferenciación y estructura genética

En el AMOVA la mayor proporción de la varianza fue principalmente atribuible a la variabilidad dentro de cada localidad (99.39%), sin embargo el valor de Φ_{ST} fue significativamente diferente de cero ($\Phi_{ST} = 0.0061$, $P = 0.029$) (Tabla 10).

Tabla 9. Medidas de la diversidad genética de *I. platypterus* en el Pacífico Oriental, incluyendo el número de individuos (n), el número de sitios segregantes (S) y número de haplotipos mitocondriales (M).

Zona	n	S	M	Diversidad haplotípica (<i>h</i>)	Diversidad nucleotídica (π)	Haplotipo frecuente
Mazatlán	81	63	58	0.964 ± 0.015	0.0065 ± 0.0037	Hap_1(15)
Manzanillo	28	32	19	0.902 ± 0.051	0.0062 ± 0.0036	Hap_1(9)
Acapulco	60	66	48	0.972 ± 0.015	0.0081 ± 0.0045	Hap_1(10)
Oaxaca	74	69	50	0.980 ± 0.007	0.0082 ± 0.0045	Hap_1(8)
Ecuador	7	9	7	1.000 ± 0.076	0.0072 ± 0.0047	

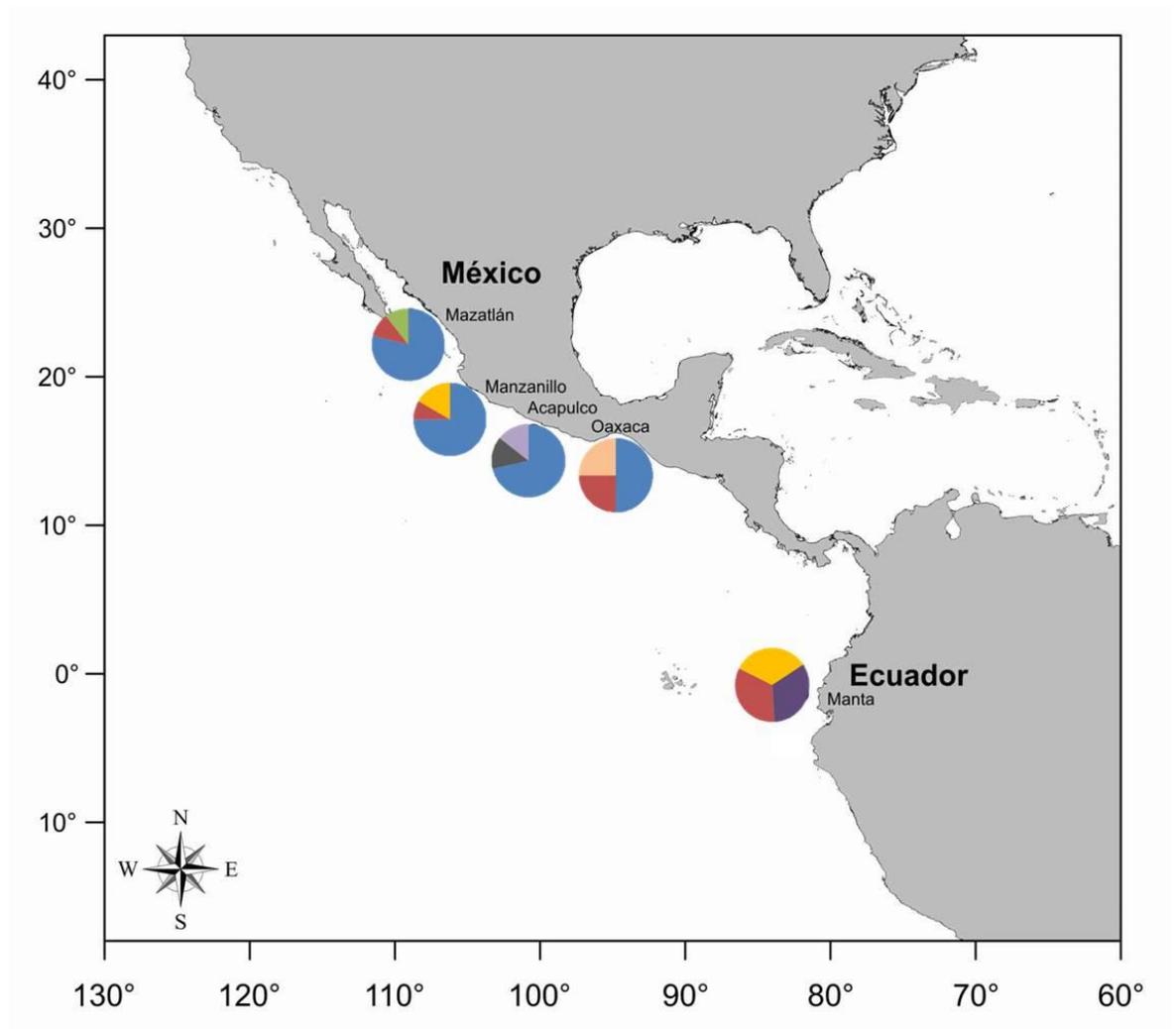


Figura 6. Distribución geográfica de los tres haplotipos más frecuentes para cada uno de los sitios de muestreo de *I. platypterus* en el Pacífico Oriental.

Tabla 10. Análisis de varianza molecular de *I. platypterus* entre muestras del Pacífico Oriental.

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componente de varianza	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	4	10.06	0.012 Va	0.61
Dentro de las poblaciones	245	480.32	1.960 Vb	99.39
Total	249	490.38	8.4903	

$$F_{ST} = 0.0061$$

Las comparaciones pareadas de los valores de Φ_{ST} indicaron que la principal diferenciación fue atribuible a los individuos de Ecuador, los cuales fueron estadísticamente diferentes del resto de los sitios de muestreo (Tabla 11). La diferenciación entre México y Ecuador podría ser producto del reducido número de muestras con las que se cuenta para Ecuador (7). Para evaluar esa posibilidad se seleccionaron al azar diez individuos por sitio de muestreo en las zonas de México y se corrió de nuevo el análisis. El resultado indicó diferencias no significativas ($\Phi_{ST} = 0.012$, $P = 0.087$), no obstante en las comparaciones pareadas los organismos de Ecuador mostraron nuevamente diferencias significativas con el resto de los sitios (Tabla 11).

Las comparaciones pareadas entre las distancias genéticas y distancias geográficas indicaron una correlación positiva sugiriendo aislamiento por distancia ($r = 0.971$) (Fig. 7). La prueba de Mantel confirmó que la asociación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas fue estadísticamente significativo ($P = 0.017$).

El análisis bayesiano con BAPS mostró que para las muestras incluidas en este estudio, la partición con el mayor valor de probabilidad fue $K = 1$ (log (ml) promedio fue de -2692.42) (Fig. 8). Este resultado fue apoyado por la agrupación jerárquica de hierBAPS, que también sugiere la falta de grupos, ya que todos los individuos fueron incluidos en un clúster (Fig. 9).

Tabla 11. Matriz de valores pareados de Φ_{ST} de las secuencias de ADNmt de *I. platypterus* en el Pacífico Oriental.

	Mazatlán	Manzanillo	Acapulco	Oaxaca	Ecuador
Mazatlán	0.00000	-0.00874	-0.01203	-0.00669	0.14356*
Manzanillo	-0.00080	0.00000	-0.01425	-0.01501	0.09345*
Acapulco	0.00119	-0.00319	0.00000	-0.00883	0.08984*
Oaxaca	0.00458	-0.00931	-0.00210	0.00000	0.08550*
Ecuador	0.11254*	0.09759*	0.05339*	0.06180*	0.00000

Debajo de la diagonal: los resultados teniendo en cuenta el tamaño de la muestra original para todos los sitios; por encima de la diagonal: resultados disminuyendo el tamaño de los sitios de México a 10 muestras por sitio. * Los valores estadísticamente significativas a $\alpha = 0.005$

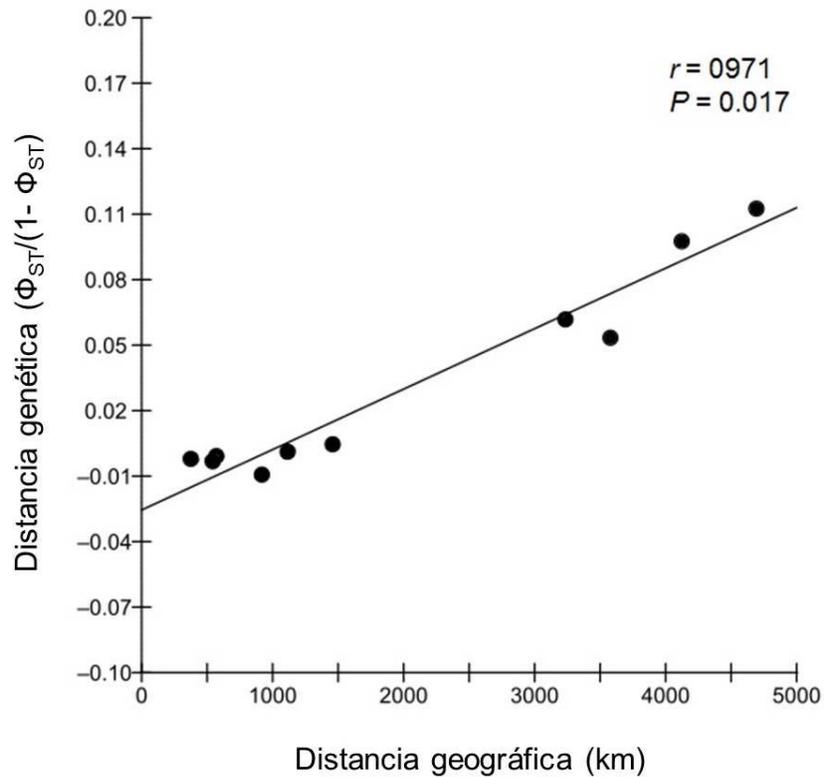


Figura 7. Relación entre la distancia genética ($\Phi_{ST}/(1-\Phi_{ST})$) y la distancia geográfica (km) de los cinco sitios de muestreo de *I. platypterus* en el Pacífico Oriental ($r = 0.971$, $P = 0.017$).

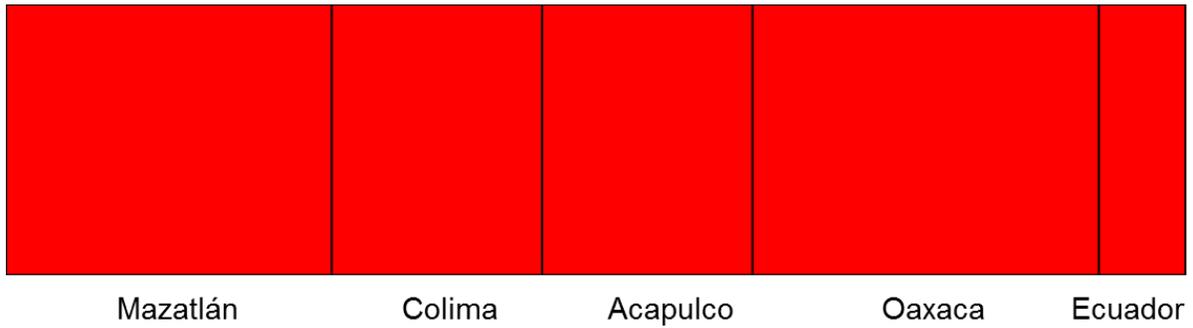


Figura 8. Análisis Bayesiano realizado en BAPS. Los individuos son representados en barras estrechas divididas en segmentos K y las líneas negras verticales delimitan los sitios de muestreo.

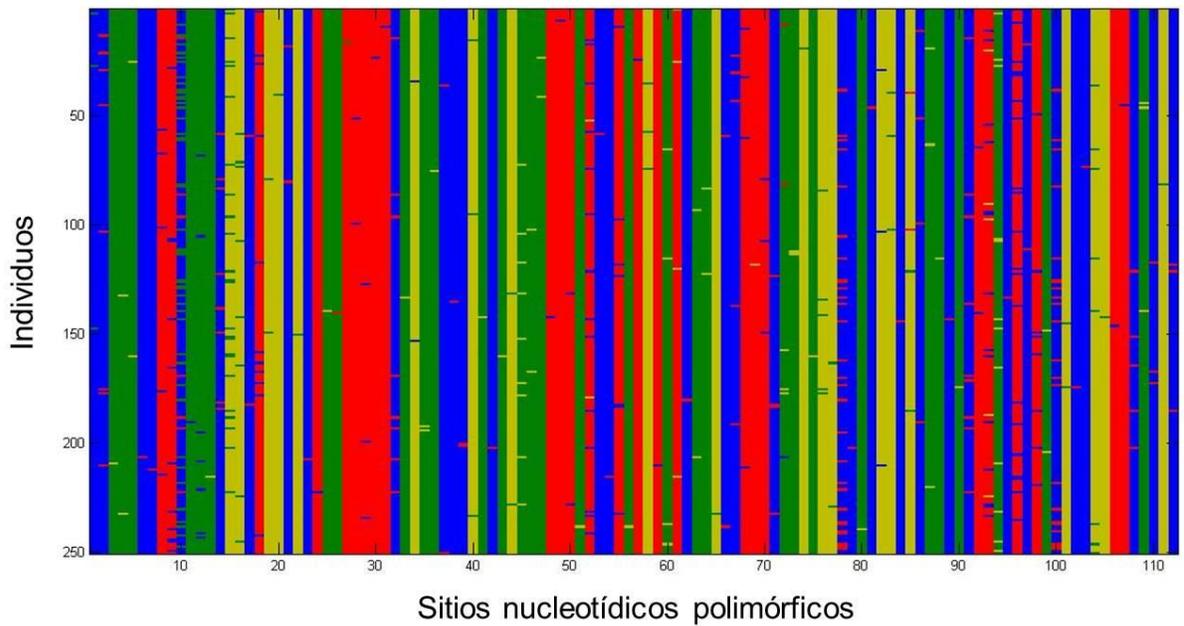


Figura 9. Análisis jerárquico de estructura genética poblacional realizado con hierBAPS. El eje "Y" representa a los organismos (del individuo 1 al 250) y el eje "X" muestra los sitios nucleotídicos polimórficos. Los colores muestran las bases nitrogenadas: Adenina (azul), Citosina (amarillo), Guanina (rojo) y Timina (verde).

Historia demográfica

La distribución de diferencias pareadas (mismatch distribution) mostró un patrón unimodal para las cinco zonas de muestreo congruente con el modelo de expansión repentina de Rogers & Harpending (1992) (Fig. 10). Las pruebas de bondad de ajuste para el modelo de expansión (SSD y Hri) dieron valores pequeños y no fueron estadísticamente significativos de los valores esperados (Tabla 12), por lo que no se rechaza la hipótesis nula de expansión poblacional.

Los valores D de la prueba de Tajima fueron negativos y altamente significativos, indicando desviaciones de neutralidad en las cuatro zonas de México, sin embargo para Ecuador el valor de D fue positivo y no significativo (Fig. 10). Para la estimación de la fecha aproximada de expansión poblacional se utilizó el valor de τ del total de los datos, un tiempo generacional de 3 años, el tamaño de secuencia de 530 bp y debido a la carencia de una tasa de mutación reportada para la región control de Istiofóridos se asumieron valores de 3.6% sugerido por Donaldson & Wilson (1999) para la región control de peces del género *Centropomus*, y de 9.3% sugerido para la región control de peces del género *Chromis* (Domingues *et al.*, 2005). Los tiempos estimados de expansión población fueron entre 80,000 y 215,000 años aproximadamente.

Tabla 12. Valores de la distribución de diferencias pareadas entre secuencias de *I. platypterus* en el Pacífico Oriental.

Zonas	Parámetros de expansión poblacional			Bondad de ajuste			
	τ	θ_0	θ_1	Hri	Valor P	SSD	Valor P
Mazatlán	3.556	0.0527	99999.000	0.0229	0.4700	0.0010	0.4100
Manzanillo	4.318	0.0000	9.514	0.0317	0.6400	0.0091	0.5400
Acapulco	3.845	0.7201	46.562	0.0118	0.7900	0.0003	0.9600
Oaxaca	4.429	0.0210	96.015	0.0166	0.5800	0.0008	0.5600
Ecuador	4.265	0.0000	516.875	0.0589	0.7400	0.0179	0.6400
Total	4.083	0.1588	20133.593	0.0284	0.6440	0.0058	0.6220

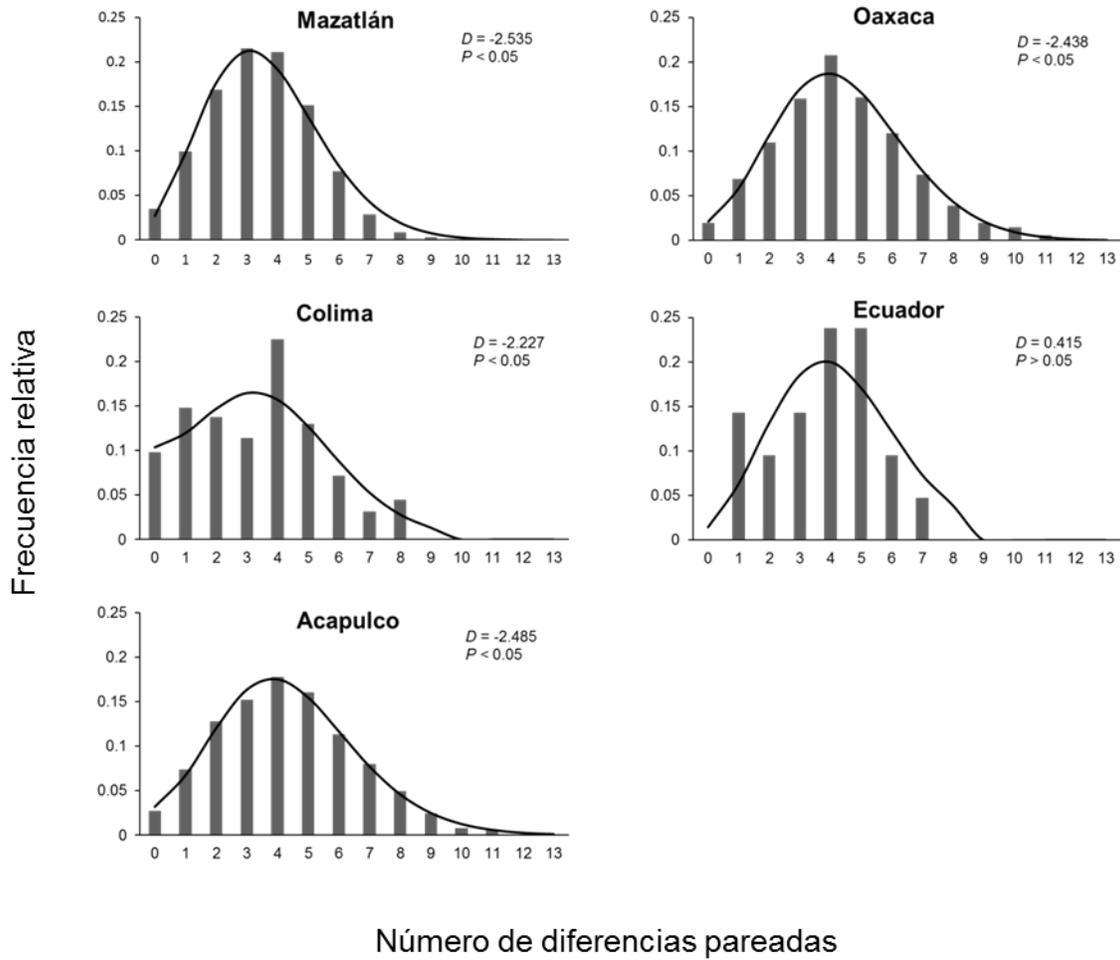


Figura 10. Distribución de diferencias pareadas y valores de la prueba D de Tajima para cada una de las cinco áreas de muestreo de *I. platypterus* en el Pacífico Oriental.

Análisis filogeográfico

La red de haplotipos mostró una aparente distribución homogénea, con una topografía tipo estrella. El haplotipo más frecuente se encontró distribuido de manera importante en las cuatro zonas de México, pero no estuvo presente en Ecuador (Figura 11). Esta red representa un reducido número de cambios entre las secuencias de los distintos haplotipos.

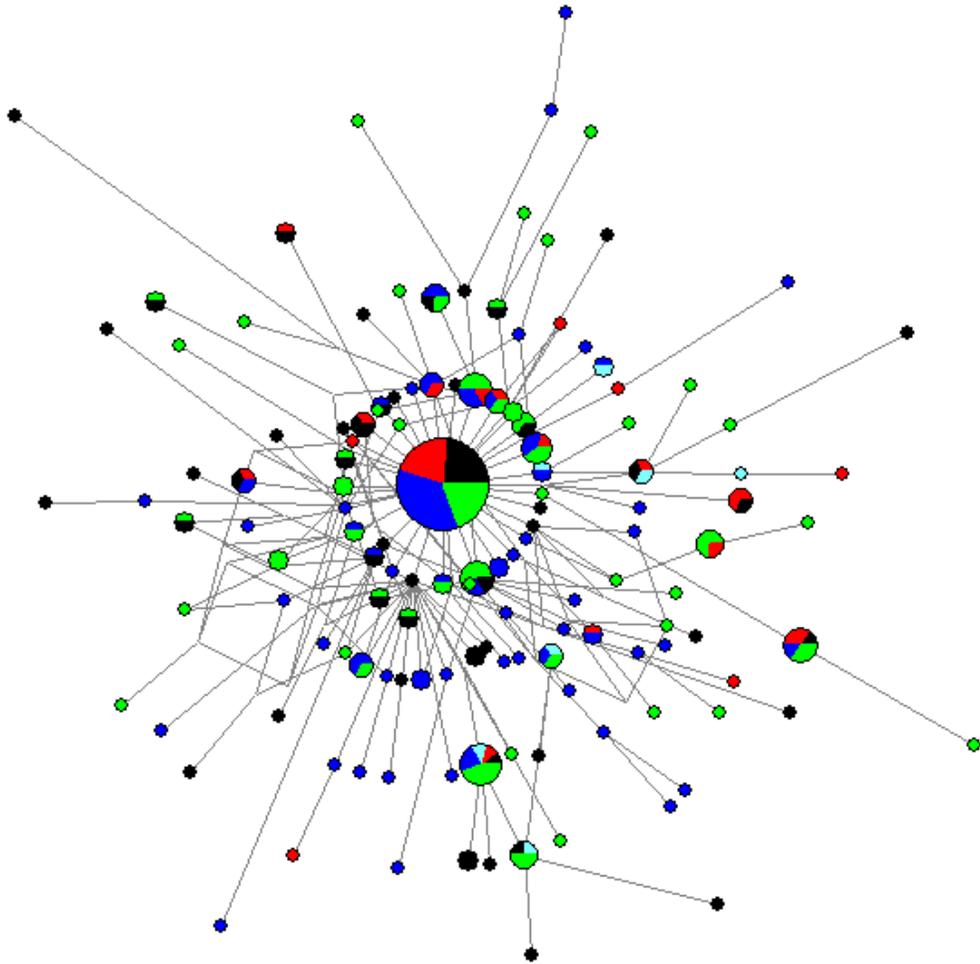


Figura 11. Red de mínima expansión (MJ Network) de todos los datos de pez vela en el Pacífico Oriental. Cada círculo representa un haplotipo observado, el tamaño del círculo es proporcional a la frecuencia del haplotipo y el color indica cada sitio de muestreo. Mazatlán (azul rey), Manzanillo (rojo), Acapulco (negro), Oaxaca (verde) y Ecuador (azul cielo).

Microsatélites

Un total de 109 individuos correspondientes a cinco sitios de muestreo en el Pacífico Oriental fueron analizados con 10 *loci* microsatélites. El número de microsatélites utilizados en los análisis poblacionales fue menor al número de microsatélites caracterizados ya que *lpla6*, *lpla24*, *lpla45*, *lpla51* e *lpla60* no amplificaron en el 59, 26, 39, 35 y 28% de las muestras respectivamente. De la misma manera, el número de individuos de Manzanillo y Acapulco tuvo que ser reducido de 32 a 19 y 20 individuos respectivamente, debido a que aunque amplificaron para la región control de ADNmt, fallaron en su mayoría con los *loci* microsatélites de manera sistemática.

Diversidad genética

Todos los *loci* fueron polimórficos y en total se obtuvieron 64 alelos. El número de alelos por *locus* fluctuó entre 2 y 10, con un promedio de 5.5. El número promedio de alelos por *locus* por sitio de muestreo varió entre 4.3 ± 0.539 en Ecuador y 6.0 ± 0.537 en Mazatlán. El número promedio de alelos efectivos fue de 3.21 ± 0.153 , y presentó el mismo patrón que el número de alelos, con el valor mínimo en Ecuador (2.95 ± 0.344) y el valor máximo en Mazatlán (3.408 ± 0.406). La heterocigosidad observada fluctuó entre 0.660 ± 0.063 y 0.751 ± 0.035 para Manzanillo y Acapulco respectivamente (Tabla 13). Los valores de frecuencias alélicas por *locus* por sitio de muestreo se muestran en el Anexo 4.

Después de la corrección de Bonferroni no se observaron desviaciones significativas del Equilibrio Hardy-Weinberg (Tabla 14). Dado el diferente número de ejemplares de *I. platypterus* analizados en cada una de las zonas de muestreo, se llevó a cabo un análisis de rarefacción, para estimaciones objetivas de la riqueza alélica (tamaño mínimo de genes= 14). Este análisis mostró que la riqueza alélica promedio para los cinco sitios de muestreo fue de 4.30 ± 0.041 , y los valores oscilaron entre 4.18 ± 0.309 en Acapulco y 4.43 ± 0.374 en Manzanillo. En promedio

la riqueza de alelos privados fue de 0.169 ± 0.028 , donde Manzanillo presentó el valor más alto (0.251 ± 0.070), seguida por Oaxaca (0.214 ± 0.079) y Mazatlán (0.152 ± 0.031), mientras que Acapulco y Ecuador tuvieron los menores valores (0.130 ± 0.035 y 0.100 ± 0.055 respectivamente) (Tabla 13).

Tabla 13. Diversidad genética de *I. platypterus* en el Pacífico Oriental con 10 *loci* microsatélites. (N) tamaño de muestra, (Na) número de alelos, (Ne) número de alelos efectivos, (RA) riqueza de alelos, (RAP) riqueza de alelos privados, (Ho) heterocigosidad Observada y (He) esperada.

Zona		<i>Ipla4</i>	<i>Ipla12</i>	<i>Ipla17</i>	<i>Ipla20</i>	<i>Ipla21</i>	<i>Ipla25</i>	<i>Ipla26</i>	<i>Ipla55</i>	<i>Ipla56</i>	<i>Ipla59</i>	Prom
Mazatlán	<i>N</i>	28	30	30	30	30	27	30	30	26	30	29.10
	<i>Na</i>	5	8	5	4	6	4	7	7	9	5	6.00
	<i>Ne</i>	2.780	5.248	3.629	1.756	1.891	3.149	2.995	4.865	5.141	2.628	3.41
	<i>RA</i>	3.803	6.004	4.445	2.992	3.326	3.810	4.068	5.287	5.882	3.687	4.33
	<i>RAP</i>	0.135	0.216	0.000	0.143	0.150	0.000	0.317	0.193	0.144	0.223	0.152
	<i>Ho</i>	0.607	0.700	0.967	0.500	0.533	0.778	0.733	0.633	0.846	0.633	0.69
	<i>He</i>	0.640	0.809	0.724	0.431	0.471	0.682	0.666	0.794	0.805	0.619	0.66
Manzanillo	<i>N</i>	18	19	19	18	19	18	18	18	18	16	18.10
	<i>Na</i>	5	7	5	4	5	4	6	8	9	5	5.80
	<i>Ne</i>	3.240	4.878	3.267	1.747	1.842	2.602	2.502	3.746	5.492	2.876	3.22
	<i>RA</i>	4.103	5.654	4.139	2.767	3.317	3.704	4.278	5.494	6.693	4.107	4.43
	<i>RAP</i>	0.370	0.067	0.001	0.298	0.042	0.000	0.351	0.653	0.243	0.487	0.251
	<i>Ho</i>	0.722	1.000	0.789	0.333	0.474	0.611	0.500	0.833	0.778	0.563	0.66
	<i>He</i>	0.691	0.795	0.694	0.427	0.457	0.616	0.600	0.733	0.818	0.652	0.65
Acapulco	<i>N</i>	18	20	20	19	19	20	20	19	20	17	19.20
	<i>Na</i>	4	8	5	3	5	4	5	7	8	4	5.30
	<i>Ne</i>	3.028	4.969	3.687	1.828	2.242	2.827	2.703	3.046	4.678	3.158	3.22
	<i>RA</i>	3.714	5.864	4.383	2.867	3.861	3.674	3.670	4.620	5.726	3.410	4.18
	<i>RAP</i>	0.155	0.264	0.001	0.000	0.251	0.000	0.148	0.238	0.201	0.040	0.130
	<i>Ho</i>	0.722	0.750	0.800	0.579	0.737	0.750	0.600	0.737	0.950	0.882	0.75
	<i>He</i>	0.670	0.799	0.729	0.453	0.554	0.646	0.630	0.672	0.786	0.683	0.66
Oaxaca	<i>N</i>	32	32	32	32	32	31	32	32	32	32	31.90
	<i>Na</i>	5	8	5	3	5	4	7	8	10	4	5.90
	<i>Ne</i>	2.522	3.717	4.121	1.971	2.541	2.400	3.298	4.376	5.020	2.972	3.29
	<i>RA</i>	3.276	5.293	4.674	2.715	3.860	3.592	4.476	5.589	6.485	3.209	4.32
	<i>RAP</i>	0.038	0.241	0.001	0.000	0.156	0.000	0.568	0.690	0.369	0.072	0.214
	<i>Ho</i>	0.625	0.719	0.844	0.656	0.625	0.677	0.656	0.813	0.813	0.813	0.72
	<i>He</i>	0.604	0.731	0.757	0.493	0.606	0.583	0.697	0.771	0.801	0.664	0.67
Ecuador	<i>N</i>	8	7	8	8	8	7	8	8	7	8	7.70
	<i>Na</i>	3	7	5	3	4	4	2	5	7	3	4.30

Ne	2.723	4.261	4.267	1.910	1.939	2.178	1.882	4.129	4.083	2.169	2.95
RA	3.000	7.000	4.875	2.992	3.750	4.000	2.000	4.975	7.000	2.875	4.25
RAP	0.000	0.408	0.003	0.002	0.434	0.000	0.000	0.006	0.142	0.000	0.100
Ho	0.625	0.857	1.000	0.625	0.625	0.571	0.500	0.750	0.571	0.625	0.68
He	0.633	0.765	0.766	0.477	0.484	0.541	0.469	0.758	0.755	0.539	0.62

Tabla 14. Valores de probabilidad de la prueba de Equilibrio de Hardy-Weinberg. Significancia después de la corrección de Bonferroni $P \leq 0.005$.

Sitio	<i>Ipla4</i>	<i>Ipla12</i>	<i>Ipla17</i>	<i>Ipla20</i>	<i>Ipla21</i>	<i>Ipla25</i>	<i>Ipla26</i>	<i>Ipla55</i>	<i>Ipla56</i>	<i>Ipla59</i>
Mazatlán	0.0400	0.3785	0.0809	1.0000	0.9333	0.2201	0.2851	0.0447	0.8532	0.4888
Manzanillo	0.0589	0.3622	0.2721	0.5497	1.0000	0.9062	0.2929	0.9227	0.1353	0.5108
Acapulco	0.2070	0.0797	0.8119	0.7854	0.7280	0.1751	0.6535	0.8149	0.9856	0.0362
Oaxaca	0.5636	0.2371	0.9228	0.1263	0.9738	0.8265	0.0662	0.1535	0.6178	0.1291
Ecuador	0.4125	0.7330	0.1603	1.0000	1.0000	0.6644	1.0000	0.3391	0.0114	1.0000

Diferenciación y estructura genética

El Análisis Varianza Molecular (AMOVA) reveló que el 0% de la variación en las frecuencias alélicas era atribuible a la variabilidad entre poblaciones, el 1% entre individuos y el 99% correspondió a la variación dentro de los individuos (Tabla 15).

El valor global de F_{ST} no mostró diferenciación genética significativa ($F_{ST} = 0.004$, $P > 0.05$). Los F_{ST} pareados por poblaciones según la clasificación de Freeland (2005), fueron bajos, y fluctuaron entre 0.000 y 0.013. Después de la corrección de Bonferroni ($P \leq 0.005$) ningún sitio presentó diferencias significativas. El método de exclusión de alelos nulos (ENA) en el programa FreeNA mostró que el valor de F_{ST} global no variaba significativamente al corregir por la presencia de alelos nulos (con ENA $F_{ST} = 0.004$; sin ENA $F_{ST} = 0.003$). Las estimaciones de Jost' D fluctuaron entre -0.005 y 0.025, y soportaron los bajos valores de diferencias genética de los F_{ST} (Tabla 16).

Tabla 15. Análisis de varianza molecular para los cinco sitios de muestreo de *I. platypterus* en el Pacífico Oriental.

Fuente de variación	Estadístico	Valor F	g.l.	Suma cuadrados	Cuadrado medio	Varianza estimada	Porcentaje de variación
Entre sitios	Fst	0.004	4	16.569	4.142	0.016	0%
Entre individuos	Fis	0.005	104	360.954	3.471	0.020	1%
Dentro individuos	Fit	0.010	109	374.000	3.431	3.431	99%
Total			217	751.523		3.467	100%

Tabla 16. Valores pareados de diferenciación genética en los cinco sitio de muestreo de *I. platypterus* en el Pacífico Oriental. Por debajo de la diagonal se muestran los valores de F_{ST} y por encima de la diagonal los valores de Jost' D.

	Mazatlán	Manzanillo	Acapulco	Oaxaca	Ecuador
Mazatlán	0.000	0.005	0.014	0.025	-0.025
Manzanillo	0.004	0.000	-0.005	0.025	-0.025
Acapulco	0.010	0.000	0.000	0.003	-0.020
Oaxaca	0.013	0.013	0.004	0.000	-0.019
Ecuador	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Debido a los bajos niveles de los valores de F_{ST} , el programa STRUCTURE no detectó estructuración poblacional. A través de Structure Harvester se estimó que el valor promedio más alto del logaritmo natural (ln) de la probabilidad de los datos era para $K=1$ ($\ln P(K) = -2970.70$), corroborando la ausencia de estructuración poblacional (Figs. 12 y 13). Mientras que el método de ΔK mostró un cluster con un valor de $K=2$, sin embargo este método no puede calcular el valor de K cuando dicho valor es igual a 1 (Evanno *et al.*, 2005).

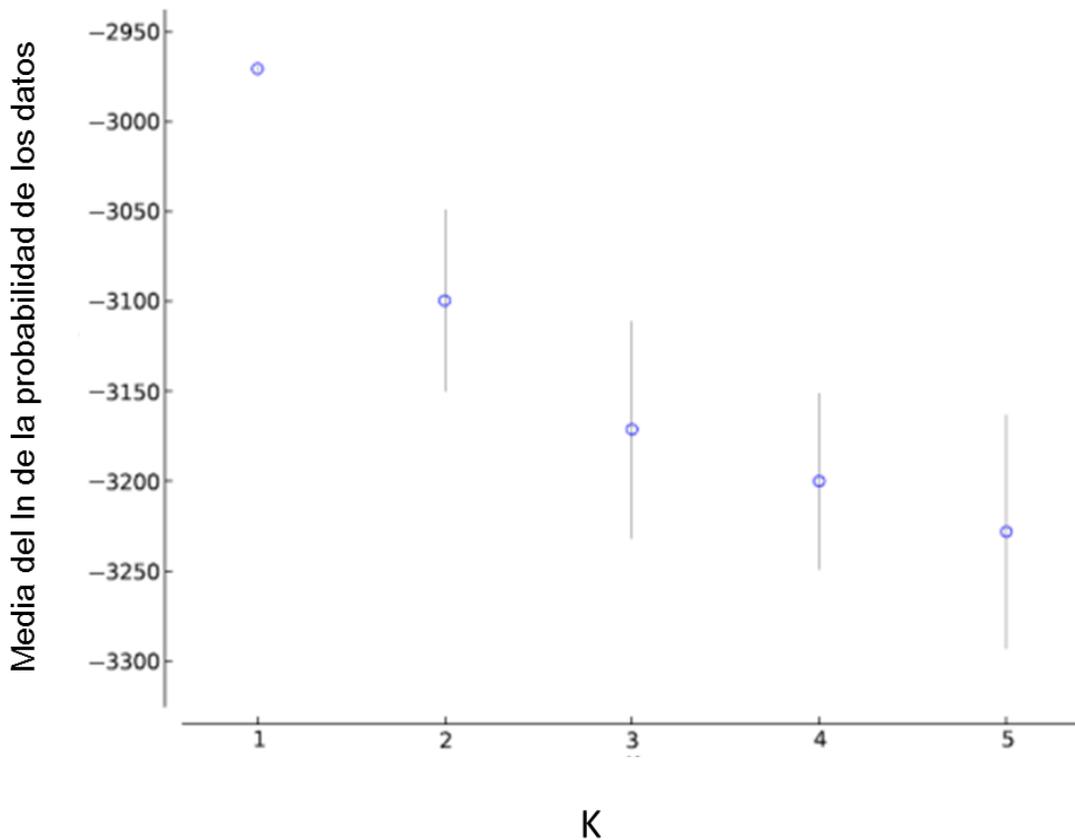


Figura 12. Media y desviación estándar del ln de la probabilidad de los datos obtenido del análisis bayesiano en Structure Harvester.

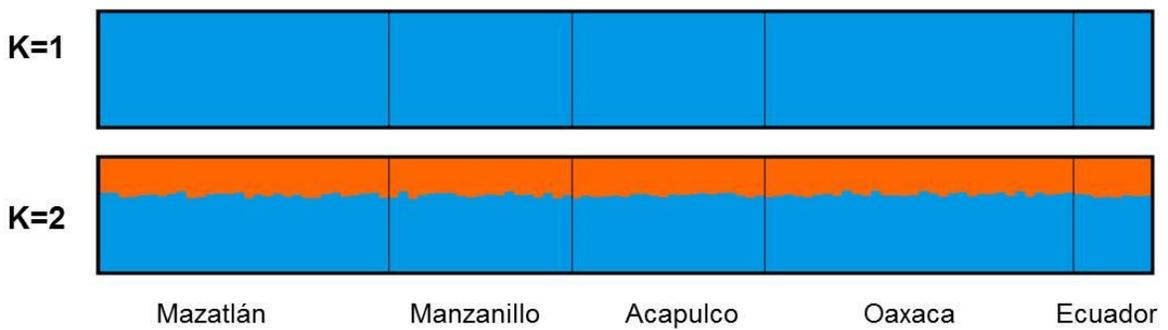


Figura 13. Análisis Bayesiano realizado en STRUCTURE, donde se muestran los gráficos de asignación de probabilidad para K=1 y K=2. Los individuos son representados en barras estrechas divididas en segmentos K (colores) y las líneas negras verticales delimitan los sitios de muestreo.

Tasas de migración direccional por generación

La matriz pareada de migración direccional entre los cinco sitios de muestreo indicó que de Oaxaca a Ecuador se presentó el menor número de migrantes con un 1.5% por generación. Mientras que la mayor tasa de migración se registró de Acapulco a Manzanillo con un 19.2% por generación (Tabla 16).

En promedio, Oaxaca y Ecuador fueron los sitios que recibieron el menor número de migrantes, mientras que Manzanillo y Acapulco recibieron la mayor migración. Por otra parte los sitios que menor número de migrantes exportaron fueron Manzanillo y Acapulco, y los que exportaron el mayor porcentaje fueron Oaxaca y Mazatlán (Tabla 17, Fig. 14).

Tabla 17. Tasas de migración direccional recientes entre los cinco sitios de muestreo de *I. platyptus* en el Pacífico Oriental. El error estándar se muestra entre paréntesis.

De:	Hacia:				
	Mazatlán	Manzanillo	Acapulco	Oaxaca	Ecuador
Mazatlán	0.6909(0.0246)	0.1601(0.1108)	0.1109(0.1067)	0.0189(0.0213)	0.0193(0.0206)
Manzanillo	0.0581(0.0459)	0.7438(0.0636)	0.1353(0.0788)	0.0322(0.0266)	0.0306(0.0318)
Acapulco	0.0405(0.0419)	0.1922(0.0867)	0.7160(0.0577)	0.0278(0.0331)	0.0234(0.0264)
Oaxaca	0.0411(0.0410)	0.1569(0.1075)	0.1046(0.1008)	0.6819(0.0187)	0.0154(0.0188)
Ecuador	0.0482(0.0390)	0.1350(0.0887)	0.0915(0.0839)	0.0311(0.0300)	0.6942(0.0256)

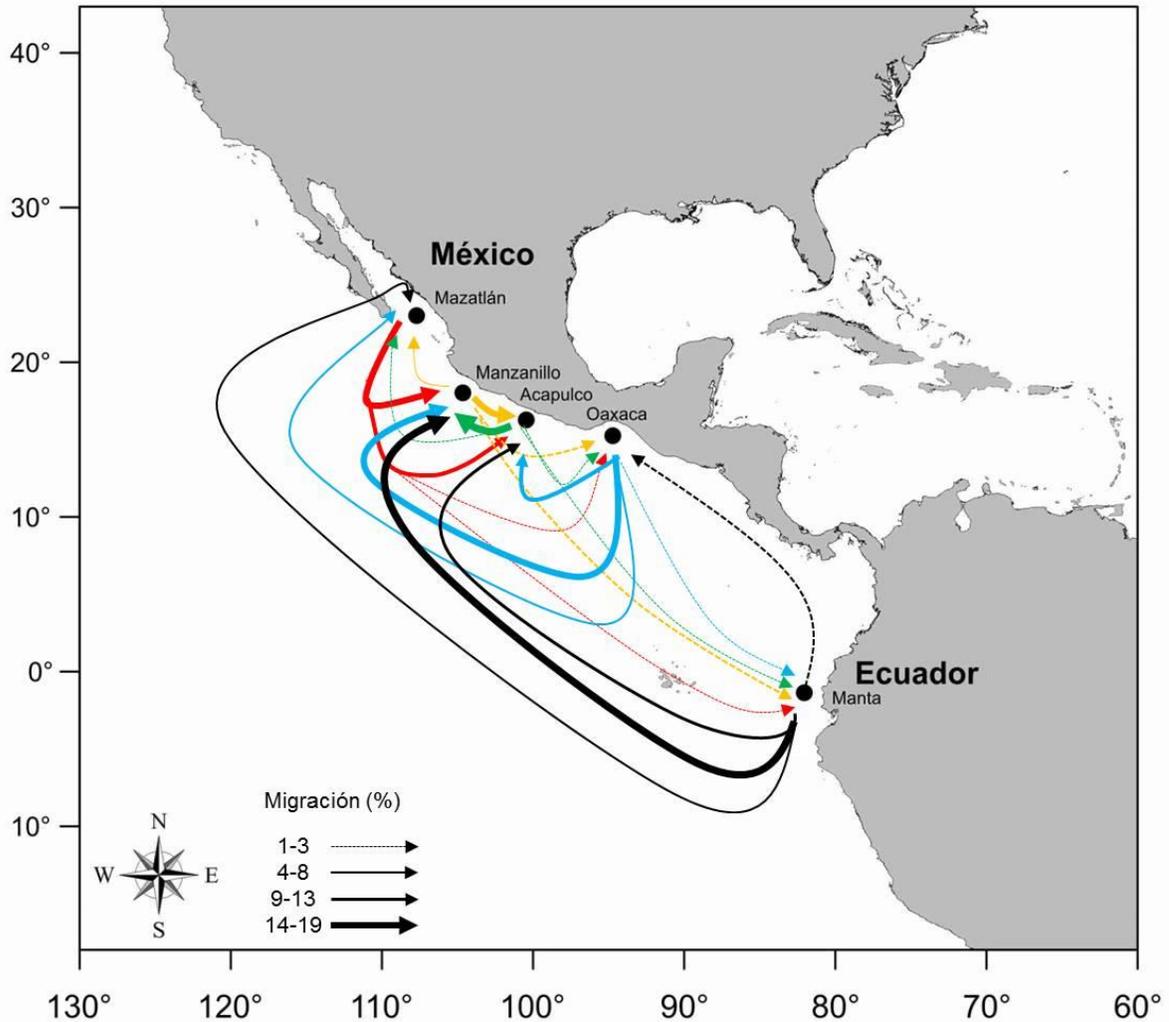


Figura 14. Mapa de porcentaje de migración reciente calculada en el programa BAYESASS. El color de cada línea representa el lugar de origen y el grosor es proporcional al porcentaje de migración.

Análisis de parentesco

El coeficiente de parentesco (r) fue calculado para cada sitio de muestreo. Los valores promedios fueron -0.0001, 0.0125, -0.0138, -0.0107 y -0.0103, para Mazatlán, Manzanillo, Acapulco, Oaxaca y Ecuador, respectivamente. Dichos valores promedio fueron bajos y no estadísticamente significativos (Fig. 15).

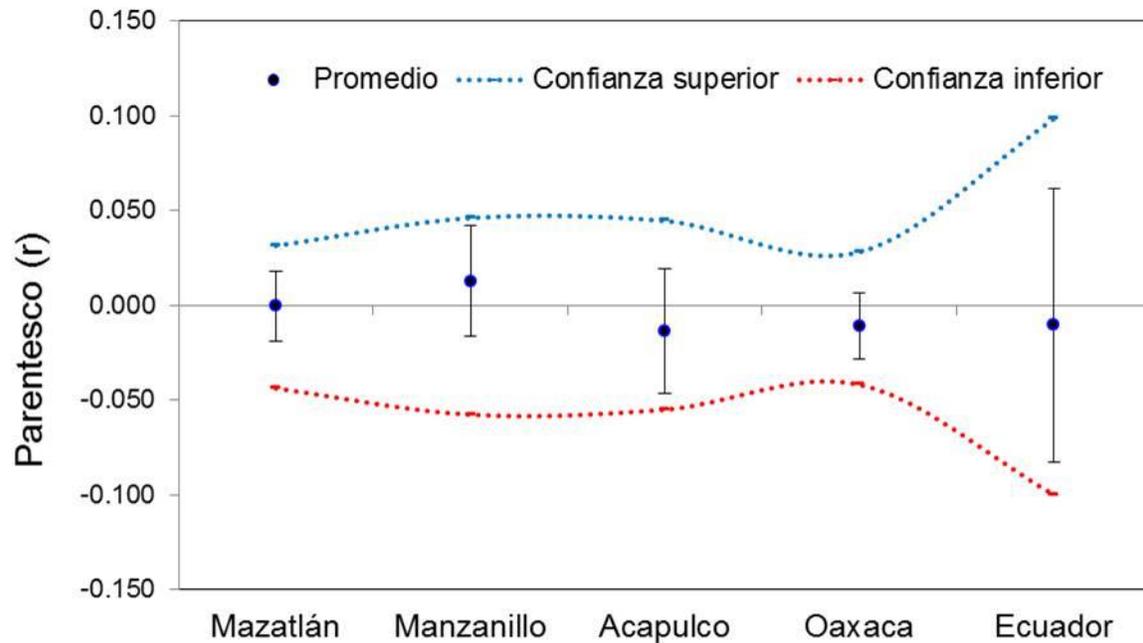


Figura 15. Análisis de parentesco, donde se observan los valores promedio de parentesco (r) pareado dentro de cada población y los intervalos de confianza al

Cuellos de botella recientes

Los valores de las pruebas para detectar excesos de heterocigosidad no fueron estadísticamente significativos para todos los sitios de muestreo, por lo tanto, no se identificaron cuellos de botella recientes en los organismos de pez vela del Pacífico Oriental (Tabla 18).

Tabla 18. Análisis de cuello de botella reciente en los cinco sitios de muestreo de *I. platypterus* en el Pacífico Oriental, incluyendo tamaño de muestra (N), número de alelos (Na), heterocigosidad (He) y las pruebas de Significancia, Desviación Estandarizada de Heterocigosidad y Rangos de Wilcoxon. Con el modelo de mutación TPM ($P \leq 0.08$).

Sitio	N	Na	He	Significancia	Desv. Est.	Wilcoxon
Mazatlán	30	6.0	0.6760	0.3702	0.3657	0.2158
Manzanillo	19	5.8	0.6668	0.6232	0.2645	0.7539
Acapulco	20	5.3	0.6799	0.3609	0.1908	0.1376
Oaxaca	32	5.9	0.6813	0.6112	0.1701	0.1162
Ecuador	8	4.3	0.6619	0.4527	0.4477	0.4609

DISCUSIÓN

Diversidad genética

Comparada con la población de pez vela del Atlántico y de otros peces de pico, los organismos de pez vela del Pacífico Oriental presentan los niveles más bajos de variación de la secuencia de ADNmt (Tabla 19). Los bajos niveles encontrados en este estudio coinciden con los reportados por Graves & McDowell (1995), Bangma (2006) y por Lu *et al.* (2015) para el Pacífico Oriental, lo que podría reflejar una reducción poblacional en el pasado. Este proceso de reducción poblacional provoca la pérdida de gran parte de los haplotipos, generando un mayor impacto de la deriva genética, que en poblaciones pequeñas favorece la dominancia de algunos haplotipos (Frankham *et al.*, 2008). Este esquema puede ser observado de la red de mínima expansión encontrada en el presente estudio, en el cual sobresale la alta frecuencia de un solo haplotipo y la gran cantidad de haplotipos muy poco frecuentes. Con base en los valores combinados de diversidad haplotípica (h) y diversidad nucleotídica (π). Grant & Bowen (1998) clasificaron a los peces marinos en cuatro categorías. El pez vela corresponde a la categoría 2, que consiste en poblaciones con altos niveles de h y bajos niveles de π , lo que se puede atribuir a una expansión poblacional después de un periodo de bajo tamaño efectivo poblacional, donde el rápido crecimiento poblacional incrementa la retención de nuevas mutaciones.

Estos bajos valores de diversidad genética mitocondrial también han sido observados para otras especies tropicales en el Pacífico Oriental, como la tortuga golfina (*Lepidochelys olivácea*) (Bowen *et al.*, 1998), la caballa (*Scomber japonicus*) (Barahona-Padilla, 2014) y el tiburón de puntas negras (*Carcharhinus limbatus*) (Keeney & Heist, 2006). Bowen *et al.* (1998) sugieren que la reducida diversidad genética en las poblaciones del Pacífico Oriental se relaciona con el hecho de que, durante un cambio evolutivo, el clima en el Pacífico Oriental tropical no fue estable, y

alguna extensión de agua fría hacia el Ecuador podría haber dado lugar a una disminución de la fauna tropical en esta región, restringiendo a estos organismos a las aguas cálidas del Pacífico Suroccidental y el océano Índico. El impacto ambiental sobre estas especies, incluyendo al pez vela, puede ser debido a que comparten una distribución tropical y a la habilidad para realizar grandes migraciones.

Todos los *loci* microsatélites analizados fueron polimórficos. La diversidad genética con base a la heterocigosidad observada fue alta, con un valor promedio de 0.701 ± 0.020 ; sin embargo el número de alelos promedio por *locus* fue bajo (5.460 ± 0.264). La heterocigosidad observada en el presente estudio, aunque con valores altos, fue relativamente menor a los observados en otros trabajos. Bangma (2006) reporta una heterocigosidad observada de 0.837 y Lu *et al.* (2015) reportan una heterocigosidad observada de 0.817. Debido a que no se utilizaron los mismos *loci* microsatélites, no es posible hacer una comparación directa de los resultados del número de alelos por locus encontrados en el estudio de Lu *et al.* (2015), donde se estimó un valor promedio de alelos por *locus* para el pez vela en el Pacífico Oriental de 12.4. Estos *loci* microsatélites utilizados en el trabajo de Lu *et al.* (2015) (*Mn01*,

Tabla 19. Medidas de diversidad genética para distintas especies de peces de pico.

Especie	Área geográfica	Autor/GenBank	<i>h</i>	π
Marlin rayado	Pacífico	McDowell & Graves (2008)	0.998	0.044
Marlin azul	Atlántico	McDowell <i>et al.</i> (2007)	0.998	0.103
Pez vela	Atlántico	EF415042.1-EF415285.1	0.952	0.055
Pez vela	Golfo de Arabia	Hoolihan <i>et al.</i> (2004)	0.820	0.039
Pez vela	Taiwán	Lu <i>et al.</i> (2015)	0.989	0.030
Pez vela	México	Lu <i>et al.</i> (2015)	0.817	0.007
Pez vela	Pacífico Oriental	Presente estudio	0.963	0.007

Mn08, *Mn10*, *Mn60* y *Mn90*) han sido usados en diferentes estudios de estructura genética poblacional en peces de pico, donde han mostrado un elevado polimorfismo (McDowell & Graves, 2008; Bangma, 2006; Purcell & Edmands, 2011).

Diferenciación y estructura genética

Varios estudios han revelado patrones de diferenciación en los que las especies oceánicas tienden a ser genéticamente homogéneas a escalas geográficas regionales, mostrando diferenciación solamente entre poblaciones extremas o entre cuencas oceánicas (Rocha-Olivares *et al.*, 2006; Graves & McDowell, 1995; Chow y Takeyama, 2000; Alvarado Bremer *et al.*, 2005). En el presente estudio el AMOVA mostró una fuerte diferenciación genética entre cuencas oceánicas, donde el mayor porcentaje de varianza fue atribuible a la diferenciación entre poblaciones (56.46%). El valor global de F_{ST} fue de 0.564, considerado como un valor alto de diferenciación en análisis poblacionales (Wright, 1978; Hartl & Clark 1997).

Dicha diferenciación fue corroborada con el análisis filogeográfico a través de la red de haplotipos, donde se puede observar claramente la presencia de dos clados de *I. platypterus*, uno con organismos solamente del Atlántico y otro que comparte organismos tanto del Atlántico como del Pacífico Oriental, estos clados ya han sido anteriormente descritos por Graves & McDowell (1995) y Bangma (2006) usando polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs) y secuencias de ADNmt respectivamente. El mismo patrón de flujo asimétrico ha sido observado en otros peces pelágicos, tales como: el atún patudo *Thunnus obesus* (Durand *et al.*, 2005), el marlín azul *Makaira nigricans* (Graves & McDowell, 1995), el pez espada *Xiphias gladius* (Alvarado-Bremer *et al.*, 1998) y el tiburón martillo *Sphyrna lewini* (Castillo-Olguín *et al.*, 2012) lo que sugiere una historia evolutiva común entre este tipo de organismos. Según Durand *et al.* (2005) una posible explicación a este patrón, es un aislamiento geográfico en el pasado, seguido por un contacto secundario. Eventos vicariantes, como el cierre del Istmo de Panamá (3.1-3.5 millones de años) han sido postulados para ser responsables del aislamiento entre

los peces marinos tropicales y subtropicales del Atlántico y del Pacífico (Gray et al., 2009). Un contacto secundario de migración unidireccional a través de la corriente de Agujas en Sudáfrica durante períodos interglaciares cálidos ha sido utilizado para explicar la presencia de dos linajes de ADN mitocondrial en diversas especies de peces pelágicos (McDowell, 2002; Graves & McDowell, 2003; Durand *et al.*, 2005)

Existe evidencia de migración de especies de atún y de peces de pico a través del cabo de Buena Esperanza en Sudáfrica (Talbot & Penrith, 1962). Estas migraciones se ven favorecidas gracias a la presencia de la Corriente de Agujas, una corriente marina cuyas aguas son cálidas y que recorre de noreste a suroeste la costa oriental de África desde 27°S a 40°S, aproximadamente entre el canal de Mozambique hasta el cabo de Buena Esperanza (Shannon *et al.*, 1990). Sin embargo, cuando se presentan grandes periodos glaciales, las temperaturas del agua en Cabo Buena Esperanza pueden ser considerablemente bajas, evitando el movimiento de organismos entre cuencas oceánicas y por lo tanto, permitiendo que el ADNmt de cada especie pueda divergir en dos clados (Alvarado-Bremer *et al.*, 1998).

A nivel regional los resultados obtenidos del AMOVA con ADNmt sugirieron en primera instancia la presencia de más de una unidad poblacional de pez vela en el Pacífico Oriental; las comparaciones pareadas del índice de fijación indicaron que las diferencias más grandes se encontraban entre los individuos de México y los de Ecuador, resultado que podría estar influenciado por el reducido número de muestras en Ecuador, ya que al reducir el muestreo en las localidades de México el valor de F_{ST} fue estadísticamente no significativo. El análisis bayesiano de estructura poblacional realizado con BAPS v6.0 asignó a los individuos a un solo grupo. De igual manera, el AMOVA para datos con microsatélites no mostró diferenciación genética estadísticamente significativa y el análisis bayesiano con STRUCTURE asignó los individuos dentro de un grupo. El estadístico F_{ST} de Wright (1978) y su análogo Φ_{ST} miden el grado de diferenciación génica entre poblaciones, en función de sus frecuencias alélicas. Sus valores oscilan entre 0 y 1, donde cero indica la no

existencia de diferenciación y uno la existencia de una fuerte estructura poblacional. Los valores de éstos estadísticos, cuando se hacen estudios de estructura poblacional, no suelen tener valores cercanos a uno. En general se clasifican como: de 0 a 0.05 pequeña; de 0.05 a 0.15 moderada; de 0.15 a 0.25 grande; y > 0.25 muy grande (Wright, 1978). En el presente estudio los valores de Φ_{ST} y F_{ST} fueron bajos: 0.006 y 0.005, respectivamente. Esta escasa diferenciación poblacional es común en organismos marinos, principalmente en especies de peces pelágicos. La alta fecundidad, la fase larvaria pelágica, el comportamiento migratorio y la alta capacidad de dispersión sumada a la ausencia de barreras geográficas, son factores que facilitan el flujo génico y reducen la diferenciación genética dentro de las poblaciones (Barahona-Padilla, 2014). Este patrón de escasa diferenciación coincide con el reportado por Lu *et al.* (2015), donde las comparaciones, tanto de Φ_{ST} como de F_{ST} no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre organismos de pez vela de México y Costa Rica. De igual manera, para el marlin rayado, Purcell & Edmands (2011) no observaron diferencias genéticas estadísticamente significativas en un análisis realizado con ADNmt y microsatélites entre muestras de marlin rayado de México, Centroamérica y Ecuador.

Uno de los principales factores que influyen en la estructuración de las poblaciones, además del tamaño poblacional, son los patrones de reproducción. El pez vela es un desovador múltiple con desarrollo asincrónico de los ovocitos (Chiang *et al.*, 2006), es decir, una hembra puede desovar varias veces durante un evento reproductivo. En el Pacífico Oriental el desove del pez vela se presenta cerca de la costa durante todo el año (Hernández-Herrera & Ramírez-Rodríguez, 1998; Ramírez-Pérez *et al.*, 2011). En Costa Rica el periodo de desove ocurre durante los meses de diciembre a marzo; en Guatemala de enero a abril y en México el periodo reproductivo tiene una duración de aproximadamente siete meses (mayo-noviembre) (Hinton & Maunder, 2013). Aunado a lo anterior, la abundancia de esta especie presenta también cambios estacionales relacionados con los cambios en la temperatura superficial del agua, donde los desplazamientos estacionales a lo largo de la costa parecen coincidir con los cambios estacionales de la isoterma de los 28

°C (Kume & Joseph, 1969; Santana-Hernández, 2001). Este patrón reproductivo aunado a los movimientos del pez vela, favorece el flujo de genes entre sitios del Pacífico Oriental, homogenizando las frecuencias alélicas en ésta región.

El estudio del flujo génico ha sido un tema primordial en biología evolutiva, ya que es un componente importante en la estructura de las poblaciones. Anteriormente se pensaba que el flujo génico en general era muy restringido y de poca importancia evolutiva (Levin, 1981). Sin embargo, se ha observado en distintas especies, principalmente peces marinos, que los niveles estimados de flujo génico generalmente son altos (Riesberg & Burke, 2001) y que pueden actuar como una fuerza que mantiene integrada a la población. Asimismo, si el flujo génico entre poblaciones de una especie es alto, todas ellas evolucionan de manera conjunta, pero si es muy bajo, empiezan a divergir, lo que puede contribuir al aislamiento reproductivo y al establecimiento de linajes evolutivamente independientes (Slatkin, 1994). Dependiendo del tipo de marcador molecular utilizado, el flujo génico calculado será histórico (ADNmt) o más reciente (microsatélites) (Fasanella, 2012). En el presente estudio para datos mitocondriales se observó un patrón de aislamiento por distancia, es decir, una mayor probabilidad de flujo génico entre individuos más cercanos. Este patrón de aislamiento por distancia también fue observado por Graves & McDowell (2006), para el marlin blanco *Kajikia albidus* en el océano Atlántico, donde a pesar de que el análisis general no sustentó una estructura genética poblacional, se observó una tendencia positiva de la diferenciación genética en relación con la distancia geográfica. Por otra parte, las tasas de migración recientes calculadas a partir de microsatélites mostraron una fuerte migración reciente entre los sitios de muestreo, teniendo valores que oscilaron entre 1 y 19%, con lo que se podría justificar los bajos valores de diferenciación poblacional, es decir, el alto flujo entre los sitios mantiene homogéneas las frecuencias alélicas. Los sitios que más exportaron organismos fueron Mazatlán y Oaxaca, y los sitios que recibieron el mayor porcentaje de migración fueron Manzanillo y Acapulco. Por lo tanto, de manera general la migración se presenta con mayor intensidad hacia la parte central del Pacífico mexicano.

Aunado a lo anterior, los procesos oceanográficos como las corrientes, giros, surgencias y la topografía del área, suelen ser responsables del origen, mantenimiento, interrupción o aislamiento de las agrupaciones entre organismos marinos. En el medio marino la conectividad genética se ha centrado principalmente en el estudio del desarrollo larvario y las barreras biogeográficas (Kelly y Palumbi, 2010). Algunos estudios con especies marinas han mostrado que las especies que no presentan dispersión por larvas pelágicas pueden presentar una estructura genética poblacional fuerte (Arndt & Smith, 1998; Dawson *et al.*, 2002), mientras que aquellas que si presentan periodo larval pelágico tienden a generar poblaciones genéticamente homogéneas (Bohonak, 1999). El pez vela es una especie de rápido crecimiento; su periodo larval dura aproximadamente 10-18 días (Simms *et al.*, 2009). En su primer mes de vida puede alcanzar una longitud de 178 mm, 508 mm para el segundo mes, 889 mm en el tercer mes, y alrededor de 1,118 mm para el cuarto mes (Voss, 1953). Aunque el periodo larval del pez vela es relativamente corto, Pechenik, (1999) comenta que los estadios larvales cortos también pueden presentar dispersión a grandes distancias cuando en el área de distribución existen corrientes marinas fuertes. Tomando en cuenta que la reproducción de pez vela en el Pacífico oriental se presenta durante todo el año, y que tiene la capacidad de desovar cada 3.6 días, y al menos en 4 ocasiones durante una época reproductiva (Hernández-Herrera & Ramírez-Rodríguez, 1998; Ramírez-Pérez *et al.*, 2011), la Corriente de California, con dirección norte-sur, y la Corriente Costera de Costa Rica, con dirección sur-norte, pueden estar favoreciendo el intercambio de individuos entre regiones.

Finalmente, se considera que dos individuos están relacionados cuando el alelo de unos de ellos es idéntico por descendencia a aquel que tiene el otro (Weir *et al.*, 2006). La homogeneidad genética de *I. platypterus* observada en el Pacífico Oriental puede ser soportada por los valores del coeficiente de parentesco (r) los cuales presentaron valores promedios de -0.0001 a 0.0125, mostrando que la reproducción se realiza al azar, con un alto flujo genético entre sitios.

Análisis filogeográfico y demografía histórica

Tanto la red tipo estrella (Fig. 10) como la distribución unimodal de las diferencias por pares (Fig. 9) encontradas en este estudio, son características de poblaciones de crecimiento rápido a partir de un haplotipo ancestral. Estos cambios en tamaños poblacionales o en niveles de flujo génico a través del tiempo dejan patrones que pueden reconocerse y que son marcas de historias poblacionales particulares. De acuerdo con *Avise et al.* (1987) los factores biogeográficos históricos, los factores ecológicos y la conducta de los organismos han jugado un papel fundamental al moldear la estructura genética de varias especies; a la síntesis de esos factores se les denomina patrones filogeográficos. Estos patrones se agrupan según *Avise* (2000), en cinco categorías y cada una de ellas refleja los diferentes aspectos espaciales y temporales de la estructura genealógica de las poblaciones. Por ejemplo, se predice que una población que se ha estado expandiendo va a presentar una filogenia en forma de estrella (*Avise*, 2000). Este patrón filogeográfico pertenece a la categoría IV, esta filogenia es un árbol con linajes simpátricos donde se esperaría un flujo genético considerable en poblaciones con número efectivo poblacional moderado o pequeño que no ha experimentado división a largo plazo por barreras geográficas, donde un haplotipo ancestral se encuentra al centro y tiene la característica de ser común, de él se desprenden haplotipos derivados independientes conectados por ramas cortas, es decir, pocos pasos mutacionales (*Avise*, 2000).

Los tiempos de expansión estimados para el pez vela en el trabajo de *Bangma* (2006) con 22 muestras del Pacífico Oriental fueron de 78,500 a 173,000 años, mientras que en el presente estudio se calcularon tiempos de expansión de 80,000 a 215,000 años, los cuales concuerdan con el periodo de la glaciación de Illinois, la cual comenzó hace 200,000 años y terminó hace 140,000. Estos periodos glaciales se caracterizan por el enfriamiento de las aguas y el descenso en el nivel del mar, lo que provoca la pérdida de hábitat de peces marinos. El pez vela al ser una especie tropical redujo su hábitat y por lo tanto su tamaño efectivo poblacional,

pero luego experimentó una expansión poblacional post-glacial, congruente con la teoría propuesta por Bowen *et al.* (1998). Según Taberlet *et al.* 1998, las zonas consideradas como refugios glaciares deberían tener altos valores de diversidad genética, con historias demográficas más estables. Considerando los valores de diversidad genética y la prueba D de Tajima, el sitio de Ecuador al parecer se ha mantenido más estable, por lo que podría considerarse que fue una zona de concentración y refugio para el pez vela durante la glaciación.

En resumen, los niveles de diversidad genética son el reflejo tanto de la historia evolutiva, como de la demográfica de las poblaciones, por una parte una alta diversidad es comúnmente asociada a poblaciones grandes con una larga historia evolutiva, mientras que una baja diversidad es consecuencia de una reducción en el tamaño poblacional o un colapso en su distribución geográfica. Una alta variabilidad genética dentro de las poblaciones reduce los potenciales efectos deletéreos del apareamiento entre parientes cercanos. Además de su valor adaptativo a nivel de población, la existencia o ausencia de variación genética en los individuos puede afectar su supervivencia y rendimiento. Cuando ambas copias de un gen (en un organismo diploide) son idénticos (es decir, cuando un individuo es homocigoto en ese gen o locus), la expresión de ese gen puede incluir rasgos que son menos ventajosos para la supervivencia o la reproducción en circunstancias particulares. Esto puede conducir a problemas fisiológicos o de comportamiento de origen genético, tales como malformaciones en la estructura física, la formación y función inadecuada de órganos, el comportamiento social alterado, y la susceptibilidad a enfermedades (Chai, 1976).

En la presente investigación el ADNmt mostró altos valores de diversidad haplotípica y relativamente bajos valores de diversidad nucleotídica para el Pacífico Oriental, y elementos que soportan la ocurrencia de expansión población. Los resultados obtenidos a partir de los microsatélites mostraron altos valores de diversidad genética, en cuanto a heterocigosidad, pero bajo número de alelos. El pez vela al ser una especie tropical, en un evento de glaciación pudo haber reducido

su hábitat y por lo tanto su tamaño efectivo poblacional, para posteriormente experimentar una expansión poblacional. Transcurrido el tiempo suficiente para que las condiciones oceanográficas se estabilizaran después de la glaciación, los organismos retomaron sus migraciones a través del Pacífico Oriental. Producto de sus características de alta fecundidad y de agregaciones para el desove (Mourato *et al.*, 2014), la población *I. platypterus* incrementó su tamaño efectivo poblacional, lo que se ve reflejado en el elevado número de haplotipos y la baja diversidad nucleotídica.

Ambos marcadores soportan la ausencia de estructuración poblacional para el pez vela en el Pacífico oriental. A nivel global, se soporta la existencia de dos unidades poblacionales, una con distribución en el Pacífico Oriental y otra en el Atlántico.

CONCLUSIONES

- A nivel oceánico se soporta la existencia de dos unidades poblacionales genéticamente distintas; una presente en el Pacífico Oriental y otra en el Atlántico.
- El pez vela que habita el Pacífico Oriental presenta altos niveles de diversidad haplotípica y de heterocigosidad, pero bajos niveles de diversidad nucleotídica, y reducido número de alelos. Los valores de diversidad nucleotídica en esta región son relativamente más bajos que los encontrados en el Atlántico.
- Los valores de diversidad genética mitocondrial y los resultados del análisis de demografía histórica sugieren que la población del Pacífico Oriental experimentó un proceso de expansión poblacional, el cual pudo haber ocurrido entre 80,000 y 215,000 años aproximadamente.
- A nivel regional, ambos marcadores moleculares mostraron bajos valores de diferenciación genética poblacional, por lo que se soportan la existencia de una unidad poblacional de pez vela en el Pacífico Oriental.
- Las altas tasas de migración reciente y los bajos valores del coeficiente de parentesco apoyan la existencia de un elevado flujo génico entre los sitios de muestreo del Pacífico oriental.

RECOMENDACIONES

- Para futuros trabajos de genética poblacional en *I. platypterus* se recomienda incrementar el número de sitios de muestreo, donde se incluyan los países de Centroamérica (Guatemala, Costa Rica, Panamá). Además, incrementar el número de individuos muestreados para mejorar el poder estadístico de los análisis.
- Utilizar una mayor cantidad de marcadores microsatélites, se podrían incluir los desarrollados en este trabajo, pero que fueron eliminados del análisis por el alto porcentaje de error durante la amplificación. También deberían incluirse los cinco microsatélites, que fueron originalmente diseñados para marlín azul, pero que han sido usado en la mayoría de los estudios genéticos de peces de pico. Esto con la intención de poder comparar los valores de diversidad alélica.
- Se recomienda que durante el proceso de genotipado, la asignación de alelos sea realizada por al menos dos personas: un experto y el estudiante. De esta manera se reduciría el margen de error en los análisis posteriores.

LITERATURA CITADA

- Alvarado Bremer, R.J., B. Stequert, W.N. Robertson & B. Ely. 1998. Genetic evidence for inter-oceanic subdivision of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) populations. *Marine Biology*, 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.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 327: 167-182.
- Amos, W., J. I. Hoffman, A. Frodsham, L. Zhang, S. Best, & A. V. S. Hill. 2007. Automated binning of microsatellite alleles: problems and solutions. *Molecular Ecology Notes*, 7: 10-14.
- Arbogast, B.S. & G.J. Kenagy. 2001. Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. *Journal of Biogeography*, 28: 819-825.
- Arndt, A. & M.J. Smith .1998. Genetic diversity and population structure in two species of sea cucumber: Differing patterns according to mode of development. *Molecular Ecology*, 7: 1053-1064.
- Arias A., R. Freire, J. Méndez & A. Insua. 2010. Isolation and characterization of microsatellite markers in the queen scallop *Aequipecten opercularis* and their application to a population genetic study. *Aquatic Living Resources*, 23: 199-207.
- Arias-Olaiz, F. 2007. *Distribución espacio-temporal de la CPUE del pez vela (Istiophorus platypterus) en el Pacífico mexicano*. Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del Instituto Politecnico Nacional. La Paz, B.C.S. México. 69 pp.
- Arizmendi-Rodríguez, D.I., L.A. Abitia-Cárdenas, F. Galván-Magaña & I. Trejo-Escamilla. 2006. Food habits of sailfish *Istiophorus platypterus* off Mazatlan, Sinaloa, Mexico. *Bulletin of Marine Science*, 79(3): 777-791.
- Avise, J.C. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard

- University Press, Cambridge Ma. 447 pp.
- Avise, J.C., J. Arnold, R.M. Ball Jr., E. Bermingham, T. Lamb, J.E. Neigel, C.A. Reeb & N.C. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Reviews Ecology and Systematics*, 18: 489-522.
- Bandelt, H.J., P. Forster & A. Röhl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1): 37-48.
- Bangma, J. 2006. *Contemporary population structure and historical demography of sailfish (Istiophorus platypterus) in the Atlantic Ocean*. Master of Science Thesis. Texas A & M University. 63 p.
- Barahona-Padilla, S.P. 2014. *Utilización de loci microsatélites y ADN mitocondrial para evaluar la estructuración genético-poblacional de la caballa (Scomber japonicus Houttuyn, 1782) en el Mar Peruano*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú. 108 pp.
- Bifani, P. 2007. El desarrollo sustentable. *En: medio ambiente y desarrollo*. México: Ed. Universitaria. 699 pp.
- Bohonak, A.J. 1999. Dispersal, gene flow, and population structure. *The Quarterly Review of Biology*, 74: 21-45.
- Bowen, B.W., A.M. Clark, F.A. Abreu-Grobois, A. Chaves, H.A. Reichart, R.J. Ferl. 1998. Global phylogeography of the ridley sea turtles (*Lepidochelys spp.*) as inferred from mitochondrial DNA sequences. *Genetic*: 101:179-189.
- Brookfield J.F.Y. 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*, 5: 453-455.
- Brown, G.G., G. Gadaleta, G. Pepe & C. Saccone. 1986. Structural conservation and variation in the D-loop-containing region of vertebrate mitochondrial DNA. *Journal Molecular Biology*, 192: 503-511.
- Castillo-Olguín, E., M. Uribe-Alcocer & P. Díaz-Jaimes. 2012. Assessment of the population genetic structure of *Sphyrna lewini* to identify conservation units in the Mexican Pacific. *Ciencias Marinas*, 38(4): 635-652.
- Chai, C.K. 1976. Genetic evolution. Chicago: University of Chicago Press.
- Chambers, G.K. & E.S. MacAvoy. 2000. Microsatellites: consensus and controversy.

Comparative Biochemistry and Physiology, Part B. *Biochemistry and Molecular Biology*, 126: 455-476.

- Chapuis, M. P. & A. Estoup. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 621-631.
- Chiang, W.C., C.L. Sun, S.Z. Yeh, W.C. Su, D.C. Liu & W.Y. Chen. 2006. Sex ratio, size at sexual maturity and spawning seasonality of sailfish *Istiophorus platypterus* from Eastern Taiwan. *Bulletin of Marine Science*, 79: 727-737.
- Cheng, L., T.R. Connor, J. Sirén, D.M. Aanensen & J. Corander. 2013. Hierarchical and spatially explicit clustering of DNA sequences with BAPS software. *Molecular Biology and Evolution*, 30(5): 1224-1228.
- Chow, S., H. Okamoto, Y. Uozumi, Y. Takeuchi & H. Takeyama. 1997. Genetic stock structure of the swordfish (*Xiphias gladius*) inferred by PCR-RFLP analysis of the mitochondrial DNA control region. *Marine Biology*, 127: 359-367.
- Chow, S. & H. Takeyama. 2000. Nuclear and mitochondrial DNA analysis reveal four genetically separated breeding units of the swordfish. *Journal Fish Biology*, 56: 1087-1098.
- Collette, B.B., T. Potthoff, W.J. Richards, S. Ueyanagi, J.L. Russo, & Y. Nishikawa. 1984. Scombroidei: development and relationships, 591-620, *En: Moser H.G., W.J. Richards, D.M. Cohen, M.P. Fahay, A.W. Kendall, Jr., & S.L. Richardson, (Eds). Ontogeny and systematics of fishes. Based on An International Symposium Dedicated to the Memory of Elbert Halvor Ahlstrom.* New York, USA: American Society of Ichthyologist and Herpetologists.
- Collette, B.B., J.R. McDowell & J.E. Graves. 2006. Phylogeny of recent billfishes (Xiphioidae). *Bulletin of Marine Science*, 79: 455-468.
- Corander, J., P. Marttinen., J. Sirén & J. Tang. 2008. Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC Bioinformatics*, 9: 539.
- Dawson, M.N., K.D. Louie, M. Barlow, D.K. Jacobs & C.C. Swift. 2002. Comparative phylogeography of sympatric sister species, *Clevelandia ios* and

- Eucyclogobius newberryi* (Teleostei, Gobiidae), across the California Transition Zone. *Molecular Ecology*, 11: 1065-1075.
- Di Rienzo, A., A.C. Peterson, J.C. Garza, A.M. Valdes, M. Slatkin, & N.B. Freimer. 1994. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A.*, 91:3166-3170.
- 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.
- Donaldson, K.A. & R.R. Wilson. 1999. Amphi-Panamaic geminates of snook (Percoidei: Centropomidae) provide a calibration of the divergence rates in the mitochondrial DNA control region of fishes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 13: 208- 213.
- 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. *Marine Biology*, 147: 313-322.
- Earl, D.A. & B.M. vonHoldt. 2011. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4:359-361.
- Ehrhardt, N., & M. Fitchett . 2006. On the seasonal dynamic characteristics of the sailfish, *Istiophorus platypterus*, in the eastern Pacific off Central America. *Bulletin Marine Science*, 79(3): 589–606.
- Evanno, G., S. Regnaut & J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611-2620.
- Excoffier, L., P.E. Smouse & J. M. Quattro. 1992. Analysis of Molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2): 479-491.

- 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.
- Ewing B. & P. Green. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Recourse*, 8 (3): 186-194.
- Falterman, B.J. 1999. *Indo-Pacific population structure of the black marlin, Makaira indica, inferred from molecular markers*. Master Science Thesis. The College of William and Mary: Virginia Institute of Marine Science. Gloucester Point, VA, USA, 98 pp.
- Fasanella, M. 2012. *Variabilidad genética espacial y ecología molecular en dos especies de roedores del Archipiélago de Tierra del Fuego: Ctenomys magellanicus, especie nativa y Castor canadensis, especie invasora*. Tesis de Doctorado. Universidad de Buenos Aires, 148 pp.
- Félix, F. 2012. Atlas sobre distribución, rutas migratorias, hábitats críticos y amenazas para grandes cetáceos en el Pacífico Oriental. Comisión Permanente del Pacífico Sur - CPPS / Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente - PNUMA. Guayaquil, Ecuador. 75pp.
- Fischer, W., F. Krupp., W. Schneider., C. Sommer., K.E. Carpenter & V.H. Niem. 1995. Guia FAO para la identificación de peces para los fines de pesca. Pacífico centro-Oriental. Vol. II y III. Vertebrados, Parte 1 y 2: 647-1813.
- Frankham, R., J.D. Ballou & D.A. Briscoe .2008. Fundamentos de Genética da Conservação. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto. 280 pp.
- Freeland, J.R. 2005. Molecular Ecology. John Wiley and Sons, Inc. Gran Bretaña. 373 pp.
- Galeana-Villaseñor, I., F. Galván-Magaña & R. Gómez-Aguilar. 2008. Influencia del tipo de anzuelo y la profundidad de pesca en la captura con palangre de tiburones y otras especies pelágicas al noroeste del Pacífico mexicano. *Revista de biología marina y oceanografía*, 43(1): 99-110.
- Goudet, J. 1995. FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *Journal of Heredity*, 86: 485-486.
- Gharrett, A.J. & L.A. Zhivotovsky. 2003. Migration. 141–174, *En*: Hallerman E.M.

- (Ed.), *Population genetics: principles and applications for fisheries scientists*. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland.
- 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. *Journal of Heredity*, 89: 415-426.
- Grant, W.S., J.L. García-Marin & F.M. Utter. 1999. Defining population boundaries for fishery management. 27–72, *En: Mustafa S. (Ed.), Genetics in Sustainable Fisheries Management*. Fishing News Books, Blackwell Science, Oxford, UK.
- Graves, J.E. & J.R. McDowell. 1995. Inter-ocean genetic divergence of istiophorid billfishes. *Marine Biology*, 122: 193-203.
- Graves, J.E. 1996. Conservation genetics of fishes in the pelagic marine realm. 335-366, *En: Avise J.C. (Ed). Conservation Genetics: Case Histories from Nature*. Chapman & Hall, New York, pp.
- Graves, J.E. & J.R. McDowell. 2003. Stock structure of the world's istiophorid billfishes: a genetic perspective. *Marine & Freshwater Research*, 54: 287-298.
- Graves, J.E. & J.R. McDowell. 2006. Genetic analysis of white marlin (*Tetrapturus albidus*) stock structure. *Bulletin of Marine Science*, 79(3): 469-482.
- Gray, K.N., J.R. McDowell, B.B. Collette & J.E. Graves. 2009. An Investigation of the Global Population Structure of the Marlinsucker (*Remora osteochir*) Inferred from Mitochondrial Control Region DNA Sequence Analysis. *Bulletin Of Marine Science*, 84(1): 25-42.
- Haag-Liautard, C., N. Coffey, D. Houle, M. Lynch, B. Charlesworth & P.D. Keightley. 2008. Direct estimation of the mitochondrial DNA mutation rate in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biology*, 6: e204.
- Hanner, R., R. Floyd, A. Bernard, B. Collette & M. Shivji. 2011. DNA barcoding of billfishes. *Mitochondrial DNA*, 22: 27- 36.
- Harpending, H. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*, 66: 591-600.
- Hartl, D.L., & A.G. Clark. 1997. *Principles of Population Genetics*, 4th Ed. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, MA. 652 pp.
- Hernández-Herrera, A. & M. Ramírez-Rodríguez. 1998. Spawning seasonality and

- length at maturity of sailfish *Istiophorus platypterus* off the Pacific coast of Mexico. *Bulletin of Marine Science*, 63(3): 459-467.
- Hinton, M.G. & M.N. Maunder. 2013. Status of sailfish in the eastern Pacific Ocean in 2011 and outlook for the future. *En: Inter-American Tropical Tuna Commission scientific advisory committee fourth meeting, 29 April–3 May 2013, La Jolla, CA, USA, Document SAC-04-07C.*
- Holleley, C.E. & P.G. Geerts. 2009. Multiplex Manager 1.0: across-platform computer program that plans and optimizes multiplex PCR. *BioTechniques*, 46: 51-517.
- Hoolihan, J.P., J. Premanandh, M.A. D'Aloia-Palmieri & J.A.H. Benzie. 2004. Intraspecific phylogeographic isolation of Arabian Gulf sailfish *Istiophorus platypterus* inferred from mitochondrial DNA. *Marine Biology*, 145:465-475.
- Hubisz, M.J., D. Falush, M. Stephens & J.K. Pritchard. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, 9: 1322-1332.
- Jensen, J.L., A.J. Bohonak & S.T. Kelley. 2005. Isolation by distance, web service. *BMC Genetics* 6: 13. v.3.23 <http://ibdws.sdsu.edu/>.
- Jorgensen, H.B.H., M.M. Hansen, D. Bekkevold, D.E. Ruzzante & V. Loeschcke. 2005. Marine landscapes and population genetic structure of herring (*Clupea harengus* L.) in the Baltic Sea. *Molecular Ecology*, 14(10): 3219- 3234.
- Jost, L.O.U. 2008. GST and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology*, 17: 4015-4026.
- Kalinowski, S.T. 2005. HP-rare: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic diversity. *Molecular Ecology Notes*, 5: 187-189.
- Keeney, D.B. & E.J. Heist. 2006. Worldwide phylogeography of the blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) inferred from mitochondrial DNA reveals isolation of western Atlantic populations coupled with recent Pacific dispersal. *Molecular Ecology*, 15(12): 3669- 3679.
- Kelly, R.P., & S.R. Palumbi. 2010. Genetic Structure Among 50 Species of the Northeastern Pacific Rocky Intertidal Community. *PLoS ONE*, 5(1): e8594.
- Kenchington, T.J. 2001. The effects of fishing on species and genetic diversity. Conference on responsible fisheries in the marine ecosystems. Reykjavik,

Iceland, 1-4.

- Kimura, M. 1981. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 78: 454-458.
- Kopelman, N.M., J. Mayzel, M. Jakobsson, N. A. Rosenberg, & I. Mayrose. 2015. Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular Ecology Resources*, 15: 1179-1191.
- Kume, S. & J. Joseph. 1969. The Japanese longline fishery for tunas and billfishes in the Eastern Pacific Ocean, East of 130°W, 1964-1966. *Inter-Am. Trop. Tuna Comm. Bull.*, 13(2):277-418.
- Larkin, M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson & D.G. Higgins .2007. Clustal w and clustal x version 2.0. *Bioinformatics*, 23: 2947-2948.
- Levin, D.A. 1981. Dispersal versus gene flow in plants. *Annals of Missouri Botanical Garden*, 68: 233-253.
- Li, Y.C., A.B. Korol, T. Fahima, A. Beiles, & E. Nevo. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11: 2453-2465.
- Librado, P. & J. Rozas. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451-1452.
- Lu, C.P., J.R. Alvarado-Bremer, J.L. McKenzie & W.C. Chiang. 2015. Analysis of sailfish (*Istiophorus platypterus*) population structure in the North Pacific Ocean. *Fisheries Research*, 166:33-38.
- Macías-Zamora, R., A. Olivos-Ortiz, A.L. Vidaurri-Sotelo, M.Á. Carrasco-Águila & E. Torres-Orozco. 2011. Modelo espacialmente explícito de la migración estacional del pez (*Istiophorus platypterus*) vela en el Pacífico mexicano. *Hidrobiológica*, 21(2): 126-134.
- McDowell, J.R. 2002. Genetic stock structure of the sailfish, *Istiophorus platypterus*, based on nuclear and mitochondrial DNA. Virginia Institute of Marine Science: College of William and Mary, Gloucester Point (Disertación doctoral).

- McDowell, J.R. & J.E. Graves. 2002. A genetic perspective on Atlantic sailfish stock structure. International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas, Collected Volume of Scientific Papers, 54: 805–810.
- McDowell J.R. & J.E. Graves. 2008. Population structure of striped marlin (*Kajikia audax*) in the Pacific Ocean based on analysis of microsatellite and mitochondrial DNA. *Canadian Journal Fishery Aquatic Science*. 65: 1307-1320.
- Megléczy, E., C. Costedoat, V. Dubut, A. Gilles, T. Malausa, N. Pech, & J.F. Martin. 2010. QDD: a user-friendly program to select microsatellite markers and design primers from large sequencing projects. *Bioinformatics*, 26: 403-404.
- Meirmans, P.G. & P.H. Van Tienderen. 2004. Genotype and genodive: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Molecular Ecology Notes*, 4: 792-794.
- Mourato, B.L., F.C. Carvalho, F.H.V. Hazin, J.C. Pacheco, H.G. Hazin, P. Travassos & A.F. Amorim. 2010. First observations of migratory movements and habitat preference of Atlantic sailfish, *Istiophorus platypterus*, in the southwestern Atlantic ocean. *Collect. Vol. Sci. Pap. ICCAT*, 65(5): 1740-1747.
- Mourato, B.L., F. Hazin, K. Bigelow, M. Musyl, F. Carvalho & H. Hazin. 2014. Spatio-temporal trends of sailfish, *Istiophorus platypterus* catch rates in relation to spawning ground and environmental factors in the equatorial and southwestern Atlantic Ocean. *Fisheries Oceanography*, 23: 32-44.
- Muths, D., P. Grewe, C. Jean & J. Bourjea. 2009. Genetic population structure of the swordfish (*Xiphias gladius*) in the southwest Indian Ocean: Sex-biased differentiation, congruency between markers and its incidence in a way of stock assessment. *Fisheries Research*, 97: 263–269.
- Myers, R.A. & B. Worm. 2003. Rapid worldwide depletion of predatory fish communities. *Nature*, 423: 280- 283.
- Nakamura, I. 1985. Billfishes of the world. An annotated and illustrated catalogue of marlins, sailfishes, spearfishes and swordfishes known to date. FAO Species Catalogue. *FAO Fisheries Synopsis*. 5(125): 65 pp.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York. E.U.A. 512 pp.

- Oliveira, E. J., J.G. Pádua, M.I. Zucchi, R. Vencovsky & M.L.C. Vieira. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29: 294-307.
- Orrell, T., B. Collette & D. Jhonson. 2006. Molecular data support separate Scombrids and Xiphioid clades. *Bulletin of Marine Science*, 79(3): 505-519.
- Peakall, R. & P. Smouse. 2012. GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*, 28: 2537-2539.
- Pechenik, J.A. 1999. On the advantages and disadvantages of larval stages in benthic marine invertebrate life cycles. *Marine Ecology Progress Series*, 177: 269-297.
- Pimenta, E., G. Lima, C. Cordeiro, M. Tardelli & A. Amorim 2005. Reproduction and stomach content analysis of sailfish, *Istiophorus platypterus*, off Rio de Janeiro state, Brazil. *Collective Volume of Scientific Papers*, (58): 1589- 1596.
- Piry, S., G. Luikart, & J.M. Cornuet. 1999. Computer note. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data. *Journal of Heredity*, 90: 502-503.
- Purcell, C.M. & S. Edmands. 2011. Resolving the genetic structure of striped marlin, *Kajikia audax*, in the Pacific Ocean through spatial and temporal sampling of adult and immature fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 68: 1861-1875.
- Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7): 1253-1256.
- Pritchard, J.K., M. Stephens, & P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.
- Prince, E.D., D.B. Holts, D. Snodgrass, E.S. Orbesen, J. Luo, M.L. Domeier & J.E. Serafy. 2006. Transboundary movement of sailfish, *Istiophorus platypterus*, off the Pacific coast of Central America. *Bulletin of Marine Science*, 79(3): 827–838.
- Queller, D.C. & K.F. Goodnight. 1989. Estimating Relatedness Using Genetic Markers. *Evolution*, 43: 258-275.

- Ramírez-Pérez, J.S., C. Quiñónez-Velázquez, L.A. Abitia-Cárdenas, F.N. Melo-Barrera. 2011. Age and growth of sailfish *Istiophorus platypterus* (Shaw in Shaw and Nodder, 1792) from Mazatlan, Sinaloa, Mexico. *Environmental Biology of Fishes*, 92: 187- 196.
- Raymond, M. & F. Rousset. 1995. GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86: 248-249.
- Rentaría-Alcántara, M. 2007. Breve revisión de los marcadores moleculares. 541-566, *En: Eguiarte L.E., V. Sousa & X. Aguirre (eds). Ecología molecular.* Semarnat-INE-UNAM-Conabio. México.
- Rice, R.W. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43: 223-225.
- Riesberg, L.H. & J.M. Burke. 2001. The biological reality of species: gene flow, selection and collective evolution. *Taxon*, 50: 235-255.
- Rocha-Olivares, A., & J.R. Sandoval-Castillo. 2003. Diversidad mitocondrial y estructura genética en poblaciones alopátricas del huachinango del Pacífico *Lutjanus peru*. *Ciencias Marinas*, 29(2): 197- 209.
- Rocha-Olivares, A., M. Bobadilla-Jiménez, S. Ortega-García, N. Saavedra-Sotelo & J.R. Sandoval-Castillo. 2006. Variabilidad mitocondrial del dorado *Coryphaena hippurus* en poblaciones del Pacífico. *Ciencias Marinas*, 32(3): 569-578.
- Rogers, A.R. & H. Harpending. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 552-569.
- Rogers, A.R. 2002. The theoretical mismatch distribution. *Lecture Notes on Gene Genealogies*, 7: 30-46.
- Rousset, F. 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics*, 145: 1219-1228.
- Rozen, S. & H.J. Skaletsky. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. 365-386, *En: Krawetz S. & S. Misener (eds). Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology.* Humana Press, Totowa, NJ.
- Santana-Hernández, H. 2001. Estructura de la comunidad de pelágicos mayores capturados con palangre en el Pacífico mexicano (1983-1996) y su relación con

- la temperatura superficial del mar. Tesis de Doctorado. Universidad de Colima, México. 123 pp.
- Schneider, S. & L. Excoffier. 1999. Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetics*, 152: 1079-1089.
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18: 233-234.
- Shannon, L.V., J.J. Agenbag, N.D. Walker & J.R.E. Lutjeharms. 1990. A major perturbation in the Agulhas retroflection area in 1986. *Deep Sea Research*, 37: 493-512.
- Simms, J.R., S. Holt, J.G. Holt, J. Bangma & J.R. Rooker. 2009. Age and growth of larval sailfish, *Istiophorus platypterus*, in the northern Gulf of Mexico. Gulf and Caribbean Fisheries Institute, 61: 17-21.
- Slatkin, M. 1994. Gene flow and population structure. 3-18, *En*: L.A. Real (ed.), *Ecological genetics*, Princeton University Press, Princeton.
- Taberlet, P., L. Fumagalli, A.G. Wust-Saucy & J. Cossons. 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, 7:453- 464.
- Tajima, F. 1989. The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 597–601.
- Talbot, F.H. & M.J. Penrith. 1962. Tunnies and marlins of South Africa. *Nature*, 193: 558-559.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski & S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.
- Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin & D.G. Higgins. 1997. The ClustalW Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24: 4876-4882.
- Trasviña, A., D. Lluch-Cota, A.E. Filonov & A. Gallegos. 2004. Oceanografía y El Niño. *En*: Magaña-Rueda V. (Edr.). *Los impactos del niño en México*. Centro

- de Ciencias de la Atmósfera, Universidad Nacional Autónoma de México, Secretaría de Gobernación. México, 229 pp.
- Utter, F.M. 1991. Biochemical genetics and fishery management: An historical perspective. *Journal of Fish Biology*, 39: 1-20.
- Van Oosterhout, C., W.F. Hutchinson, D.P.M. Wills & P. Shipley. 2004. Microchecker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4: 535-538.
- Voss, G.L. 1953. A contribution to the life history and biology of the sailfish, *Istiophorus americanus* Cuv. and Val. in Florida waters. *Bulletin of Marine Science*, 3: 206-240.
- Weir, B.S., A.D. Anderson & A.B. Hepler. 2006. Genetic relatedness analysis: modern data and new challenges. *Nature Reviews Genetics*, 7: 771-780.
- Wilson, G. A. & B. Rannala. 2003. Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics*, 163: 1177-1191.
- Whittaker, J.C., R.M. Harbord & N. Boxall. 2003. Likelihood-based estimation of microsatellite mutation rates. *Genetics*, 164:781-787.
- Wright, S. 1978. *Evolution and the genetics of populations*: vol. 4. Variability within and among natural populations. University of Chicago Press, Chicago, 590 pp.

ANEXOS

Anexo1. Protocolo de extracción de ADN con el Kit de Qiagen.

1. Etiquetar tubos de 1.5.
2. Extraer tejido del alcohol con pinzas, lavar el tejido con agua destilada y limpiar las pinzas con alcohol entre cada muestra.
3. Colocar tejido en c/tubo.
4. Agregar a c/tubo 180 μ l de ATL y 20 μ l de proteinasa K. (Extraer antes la cantidad total a utilizar para evitar contaminar el reactivo de los tubos, para 18 muestras son 3600 μ l de ATL y 400 μ l de proteinasa K.
5. Colocar en incubadora a 56 $^{\circ}$ C durante 24 hrs.
6. Colocar en el vortex cada tubo durante 15 segundos.
7. Hacer una mezcla de 200 μ l de AL y 200 μ l de etanol (96-100%) para cada tubo. Por lo tanto, si son 18 muestras se mezclan 4000 μ l de cada reactivo (200*18 + 1%).
8. Agregar 400 μ l de la mezcla anterior a c/tubo (al agregar colocar en el vortex cada tubo para evitar la formación de grumos).
9. Etiquetar los tubos de columna.
10. Cambiar la mezcla de los tubos ependof a los de columna (calibrar bien la pipeta para succionar toda la muestra).
11. Centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto.
12. Tirar el precipitado y utilizar el mismo colector.
13. Agregar 500 μ l de AW1 y centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto.
14. Tirar el precipitado y colocar la parte superior en un colector nuevo.
15. Agregar 500 μ l de AW2 y centrifugar a 14000 rpm durante 3 minutos.
16. Tirar precipitado y tubo colector.
17. En tubos colectores nuevos colocar la columna.
18. Agregar 200 μ l de buffer AE, incubar a temperatura ambiente por 1 min.
19. Centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto.
20. Colocar el líquido de los tubos de columna a tubos ependof de 0.6.
21. Colocar las muestras en el congelador.

Anexo 2. Protocolo de electroforesis en geles de agarosa.

1. Añadir 0 .5 gr de agarosa
2. Agregar 50 ml de buffer TBE 1X y cubrir con tapa
3. Colocar en microondas durante 1:30 minutos
4. Cuando esté listo para vaciar agregar 3 μ l de gelgreen
5. Colocar peines en la cámara y agregar la mezcla, esperar a que gelifique
6. Quitar el peine y llenar la cámara con el buffer, cuidando que cubra bien los pozos
7. Poner 2 μ l de BPB en el papel
8. Agregar a cada gota 5 μ l de cada muestra
9. Mezclar bien mediante pipeteo y colocar en cada pozo del gel (cuidando que no lleve burbujas)
10. Colocar en un pozo 2 μ l de la escalera
11. Encender la cámara a 100 v durante 30 minutos.

Anexo 3. Frecuencias haplotípicas de *I. platypterus* en los cinco sitios de muestreo del Pacífico Oriental.

Haplotipo	Mazatlán	Manzanillo	Acapulco	Oaxaca	Ecuador
Hap_1	0.185	0.321	0.167	0.108	0.000
Hap_2	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000
Hap_3	0.000	0.000	0.033	0.000	0.000
Hap_4	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000
Hap_5	0.000	0.000	0.017	0.014	0.000
Hap_6	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000
Hap_7	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000
Hap_8	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000
Hap_9	0.000	0.000	0.017	0.014	0.000
Hap_10	0.000	0.036	0.017	0.000	0.000
Hap_11	0.000	0.000	0.017	0.014	0.000
Hap_12	0.000	0.000	0.033	0.000	0.000
Hap_13	0.000	0.000	0.017	0.027	0.000
Hap_14	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000
Hap_15	0.025	0.036	0.017	0.054	0.143
Hap_16	0.000	0.000	0.017	0.014	0.000
Hap_17	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000
Hap_18	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000
Hap_19	0.000	0.036	0.033	0.000	0.000
Hap_20	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000
Hap_21	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000
Hap_22	0.025	0.000	0.017	0.014	0.000
Hap_23	0.000	0.000	0.017	0.014	0.000
Hap_24	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000
Hap_25	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000
Hap_26	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000
Hap_27	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000
Hap_28	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000
Hap_29	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000
Hap_30	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000
Hap_31	0.025	0.000	0.017	0.000	0.000
Hap_32	0.000	0.000	0.017	0.014	0.000
Hap_33	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000
Hap_34	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000
Hap_35	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000
Hap_36	0.012	0.036	0.017	0.000	0.000
Hap_37	0.012	0.000	0.017	0.000	0.000

Hap_38	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000
Hap_39	0.012	0.000	0.017	0.000	0.000
Hap_40	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000
Hap_41	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000
Hap_42	0.000	0.000	0.017	0.027	0.143
Hap_43	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000
Hap_44	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000
Hap_45	0.000	0.036	0.017	0.000	0.143
Hap_46	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000
Hap_47	0.012	0.000	0.017	0.054	0.000
Hap_48	0.012	0.071	0.017	0.027	0.000
Hap_49	0.025	0.036	0.000	0.041	0.000
Hap_50	0.012	0.036	0.000	0.014	0.000
Hap_51	0.000	0.036	0.000	0.000	0.000
Hap_52	0.025	0.036	0.000	0.000	0.000
Hap_53	0.012	0.036	0.000	0.000	0.000
Hap_54	0.000	0.036	0.000	0.000	0.000
Hap_55	0.000	0.036	0.000	0.000	0.000
Hap_56	0.025	0.036	0.000	0.027	0.000
Hap_57	0.000	0.036	0.000	0.000	0.000
Hap_58	0.000	0.036	0.000	0.000	0.000
Hap_59	0.000	0.036	0.000	0.041	0.000
Hap_60	0.000	0.036	0.000	0.000	0.000
Hap_61	0.012	0.000	0.000	0.000	0.143
Hap_62	0.000	0.000	0.000	0.000	0.143
Hap_63	0.012	0.000	0.000	0.014	0.143
Hap_64	0.012	0.000	0.000	0.000	0.143
Hap_65	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000
Hap_66	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000
Hap_67	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000
Hap_68	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000
Hap_69	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000
Hap_70	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000
Hap_71	0.025	0.000	0.000	0.000	0.000
Hap_72	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000
Hap_73	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000
Hap_74	0.025	0.000	0.000	0.000	0.000
Hap_75	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000
Hap_76	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000
Hap_77	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000
Hap_78	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000
Hap_79	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000
Hap_80	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000

Hap_81	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000
Hap_82	0.025	0.000	0.000	0.014	0.000
Hap_83	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000
Hap_84	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000
Hap_85	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000
Hap_86	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000
Hap_87	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000
Hap_88	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000
Hap_89	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000
Hap_90	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000
Hap_91	0.012	0.000	0.000	0.014	0.000
Hap_92	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000
Hap_93	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000
Hap_94	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000
Hap_95	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000
Hap_96	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000
Hap_97	0.012	0.000	0.000	0.014	0.000
Hap_98	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000
Hap_99	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000
Hap_100	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000
Hap_101	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000
Hap_102	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000
Hap_103	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000
Hap_104	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000
Hap_105	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000
Hap_106	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000
Hap_107	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000
Hap_108	0.000	0.000	0.000	0.027	0.000
Hap_109	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000
Hap_110	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000
Hap_111	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000
Hap_112	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000
Hap_113	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000
Hap_114	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000
Hap_115	0.000	0.000	0.000	0.027	0.000
Hap_116	0.000	0.000	0.000	0.027	0.000
Hap_117	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000
Hap_118	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000
Hap_119	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000
Hap_120	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000
Hap_121	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000
Hap_122	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000
Hap_123	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000

Hap_124	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000
Hap_125	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000
Hap_126	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000
Hap_127	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000
Hap_128	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000
Hap_129	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000
Hap_130	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000
Hap_131	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000
Hap_132	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000
Hap_133	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000
Hap_134	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000

Anexo 4. Frecuencias alélicas por locus por sitio de muestreo de *I. platypterus* en el Pacífico Oriental.

Sitio	Alelos	<i>Ipla4</i>	<i>Ipla12</i>	<i>Ipla17</i>	<i>Ipla20</i>	<i>Ipla21</i>	<i>Ipla25</i>	<i>Ipla26</i>	<i>Ipla55</i>	<i>Ipla56</i>	<i>Ipla59</i>	
Mazatlán	N	28	30	30	30	30	27	30	30	26	30	
	1	0.089	0.017	0.083	0.117	0.017	0.463	0.017	0.267	0.212	0.033	
	2	0.482	0.100	0.233	0.733	0.183	0.111		0.000		0.117	
	3	0.339	0.317	0.417	0.133	0.700		0.100	0.117	0.000	0.533	
	4	0.036	0.100	0.183	0.017	0.017	0.222	0.017	0.250	0.019	0.283	
	5	0.054	0.217	0.083		0.067	0.204		0.100	0.096		
	6		0.000			0.017			0.033	0.308	0.033	
	7		0.117						0.000	0.019		
	8							0.017	0.217	0.038		
	9		0.083					0.417	0.017	0.019		
	10							0.050		0.115		
	11		0.050							0.173		
	15							0.383				
	Manzanillo	N	18	19	19	18	19	18	18	18	18	16
		1	0.139	0.026	0.026	0.222	0.000	0.556	0.028	0.444	0.111	0.094
2		0.361	0.237	0.132	0.722	0.184	0.139		0.056		0.094	
3		0.389	0.316	0.421	0.028	0.711		0.056	0.139	0.028	0.500	
4		0.083	0.105	0.316	0.028	0.053	0.222	0.000	0.028	0.111	0.281	
5		0.028	0.132	0.105		0.026	0.083		0.083	0.083		
6			0.053			0.026			0.028	0.333	0.031	
7			0.132						0.000	0.028		
8								0.056	0.194	0.083		
9			0.000					0.583	0.028	0.000		
10								0.056		0.167		
11			0.000							0.056		
15								0.222				
Acapulco		N	18	20	20	19	19	20	20	19	20	17
		1	0.139	0.025	0.050	0.158	0.026	0.500	0.025	0.500	0.200	0.029
	2	0.417	0.200	0.175	0.711	0.184	0.150		0.026		0.353	
	3	0.361	0.325	0.350	0.132	0.632		0.050	0.053	0.000	0.294	
	4	0.000	0.175	0.325	0.000	0.079	0.275	0.000	0.132	0.150	0.324	
	5	0.083	0.025	0.100		0.079	0.075		0.026	0.025		
	6		0.000			0.000			0.026	0.350	0.000	
	7		0.125						0.000	0.000		
	8							0.000	0.237	0.050		
	9		0.075					0.425	0.000	0.025		
	10							0.075		0.150		

		11		0.050						0.050	
		15						0.425			
Oaxaca	N		32	32	32	32	32	31	32	32	32
		1	0.109	0.063	0.188	0.266	0.016	0.597	0.078	0.391	0.094
		2	0.516	0.156	0.141	0.656	0.188	0.129		0.000	0.281
		3	0.344	0.453	0.375	0.078	0.578		0.094	0.094	0.031
		4	0.016	0.031	0.188	0.000	0.109	0.194	0.016	0.141	0.094
		5	0.016	0.156	0.109		0.109	0.081		0.094	0.156
		6		0.000			0.000			0.016	0.375
		7		0.031						0.031	0.078
		8							0.047	0.188	0.078
		9		0.094					0.328	0.047	0.016
		10							0.016		0.031
		11		0.016							0.047
		15							0.422		
Ecuador	N		8	7	8	8	8	7	8	8	7
		1	0.188	0.000	0.188	0.188	0.000	0.643	0.000	0.313	0.143
		2	0.375	0.286	0.250	0.688	0.188	0.143		0.000	0.063
		3	0.438	0.357	0.313	0.125	0.688		0.000	0.125	0.000
		4	0.000	0.071	0.188	0.000	0.063	0.143	0.000	0.125	0.143
		5	0.000	0.071	0.063		0.000	0.071		0.125	0.000
		6		0.071			0.063			0.000	0.429
		7		0.071						0.000	0.071
		8							0.000	0.313	0.071
		9		0.071					0.375	0.000	0.000
		10							0.000		0.071
		11		0.000							0.071
		15							0.625		

Anexo 5. Productos de investigación.

Congresos

Rubio-Castro, Griselda Guadalupe; Quiñones-Velázquez, Casimiro; García-Rodríguez, Francisco Javier; Pérez-Quiñonez, Carlos Iván; Ruiz-Domínguez, Marcelino. Ponencia: GENÉTICA POBLACIONAL DEL PEZ VELA *Istiophorus platypterus* (SHAW IN SHAW & NODDER, 1792) EN EL PACÍFICO MEXICANO. XX Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología del Mar “El mar, el verdadero territorio”, Los Cabos, B.C.S.

Rubio-Castro, Griselda Guadalupe; Quiñones-Velázquez, Casimiro; García-Rodríguez, Francisco Javier; Pérez-Quiñonez, Carlos Iván; Ruiz-Domínguez, Marcelino. Ponencia: GENÉTICA POBLACIONAL DEL PEZ VELA *Istiophorus platypterus* (SHAW IN SHAW & NODDER, 1792) EN EL PACÍFICO ORIENTAL. XXII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología del Mar, Ensenada, B.C.

Publicaciones científicas

Rubio-Castro, G.G., Quiñónez-Velázquez, C., García-Rodríguez, F.J. 2015. Genetic diversity and population structure of Indo-Pacific sailfish *Istiophorus platypterus* in the eastern Pacific. *Fisheries Science*. 82: 241-249. DOI 10.1007/s12562-015-0952-x.

Rubio-Castro, G.G., Quiñónez-Velázquez, C., García-Rodríguez, F.J., Munguia-Vega, A. Isolation and characterization of microsatellite loci from sailfish *Istiophorus platypterus* Shaw 1792, using 454 shotgun pyrosequencing (Por someter).

Genetic diversity and population structure of Indo-Pacific sailfish *Istiophorus platypterus* in the eastern Pacific

Griselma G. Rubio-Castro¹ · Casimiro Quiñonez-Velázquez¹ · Francisco J. García-Rodríguez¹

Received: 31 May 2015 / Accepted: 9 November 2015
© Japanese Society of Fisheries Science 2015

Abstract Population genetics provides information for the management and conservation of species, because it supports the delimitation of population units. A mitochondrial DNA marker was used to determine the genetic structure of the sailfish *Istiophorus platypterus* at four locations in Mexico (Mazatlán, Colima, Acapulco, Oaxaca) and one location in Ecuador. We analyzed 250 nucleotide sequences of the mitochondrial control region, where 134 haplotypes were identified. Genetic diversity was relatively low in relation to other regions in the world, and other billfish species. Analysis of molecular variance indicated that genetic differences were significantly different from zero ($P = 0.029$), although the Φ_{ST} value (0.0061) was very low. Pairwise comparisons of Φ_{ST} indicated that the difference was attributable mainly to individuals of Ecuador, which were statistically different from those at other sampling sites. However, the genetic structure in this species could not be inferred using Bayesian analysis. Furthermore, a test of isolation by distance showed significant correlation between genetic distance and geographic distance. Phylogeographic analysis revealed a distribution of haplotypes with a star-type pattern, and mismatch distribution showed a unimodal pattern for the five sampled areas, indicative of recent demographic expansion. We

estimated that the beginning of the sudden expansion happened between 80,000 and 215,000 years ago. Our results did not support a clear pattern of genetic differentiation. Capture of this species occurs in several countries, and the overall management of the resource could depend on local efforts. Further sampling is need, and additional analysis using molecular markers with high resolution (microsatellites, SNPs) must be implemented in order to gain a more robust understanding of sailfish population structure in the eastern Pacific.

Keywords Genetic diversity · Haplotypes · Mitochondrial DNA · Demographic expansion

Introduction

The sailfish *Istiophorus platypterus* occupies the warmer waters of the Pacific, Indian, and Atlantic Oceans [1]. In the eastern Pacific, this sailfish is found from the coast of Ecuador to the Gulf of California in Mexico [2]. The greatest sailfish catch rates in the world occur off Central America's coast, where this species supports multi-million dollar catch-and-release sports fisheries. It is also captured as a bycatch in coastal artisanal long-line fisheries, which primarily target dolphin fish, sharks, and tunas [3]. In spite of this species' importance, very little is known about its population genetics and life history in the eastern Pacific.

Based on pectoral fin length, scale shapes, and growth, Nakamura [1] recognized the Atlantic sailfish as a distinct species (*Istiophorus albicans*) from the Indo-Pacific sailfish (*I. platypterus*). However, genetic data supported only a single species with global distribution; molecular information on sailfish has been used in this way to detect populations and determine species [4–6].

✉ Francisco J. García-Rodríguez
fjgarcia@ipn.mx

Griselma G. Rubio-Castro
griselma_rubio@hotmail.com

Casimiro Quiñonez-Velázquez
cquinone@ipn.mx

¹ Instituto Politécnico Nacional–Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Av. Instituto Politécnico Nacional s/n, Col. Playa Palo de Santa Rita, Apdo Postal 592, 23096 La Paz, Baja California Sur, Mexico

Several studies of sailfish population genetic structure have been conducted using different molecular markers at various spatial scales. Based on restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) of the control region of mtDNA and on three microsatellite loci, McDowell and Graves [7] found no genetic differences between populations in the Atlantic Ocean; however, comparisons between specimens of the Atlantic and Pacific Ocean revealed significant differences [5]. Using RFLP of the control region, Hoolihan et al. [8] found differences between individuals collected inside and outside of the Arabian Gulf, and considered therefore their results as the first report of phylogeographic isolation of a highly mobile species in a marginal sea.

McDowell [9] and Graves and McDowell [5, 10] used RFLP of mtDNA and microsatellite loci, and detected two populations in the Pacific Ocean, one in the eastern Pacific and one in the western Pacific. These results were supported by Lu et al. [11], who compared sequences of the control region and of five microsatellite loci of specimens from Taiwan, Mexico, and Costa Rica. Their results indicated that individuals captured in Mexico and Costa Rica did not represent distinct populations, and that those from Taiwan had significant genetic differences. Lu et al. [11] considered a limited number of sites (one in Mexico and one in Costa Rica) as representative of the eastern Pacific Ocean. In consequence, an analysis covering a wider area would provide a clearer picture of sailfish population structure in the eastern Pacific Ocean. An important result of their work is that mitochondrial and nuclear DNA provided similar conclusions. Thus, an analysis using the control region could provide a comprehensive overview of this species' genetic structure.

In our study, we extend the investigation of sailfish in the eastern Pacific by analyzing sailfish captured at four sites in Mexico and one in Ecuador. Our results were based on the analysis of the control region, using a fragment that includes the fragment used by Lu et al. [11]; thus, we report data that supplement the existing information and provide a better understanding of the population structure of sailfish in the eastern Pacific. The aim of this study was to determine whether sailfish genetic variability was similar in the eastern Pacific, with a homogeneous genetic population being present in this area. Considering previous studies, we hypothesized that the sailfish lacks a genetic population structure, and is represented by one panmictic population in the eastern Pacific.

Materials and methods

Sampling and DNA extraction

Sailfish were captured by recreational fishermen at four locations in Mexico between March 2008 and December

2009, and at one location in Ecuador in October 2012 (Fig. 1). Tissue from the dorsal muscle was preserved in 95 % ethanol until processing. Total DNA extraction was done with DNA extraction kits (Qiagen). The amount of DNA was inferred by electrophoresis in 1 % agarose gel stained with Gel Red (Biotium) and visualized with a UV transilluminator (Labnet).

Amplification and sequencing

We amplified the control region of the mtDNA using primers Ipla-F (5'-CCCTAACTCCCAAAGCTAGGA) and Ipla-R (5'-CCTGATATCCTGATTATGGTGGGA) (Sigma-Aldrich Co.). We designed these primers based on one sequence deposited in GenBank (accession number AB470306.1), using the Primer3 program (http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html). PCR reactions were performed in a volume of 35 μ l containing: 3.5 μ l *Taq* buffer (10 \times), 0.7 μ l dNTP mix (10 mM), 1.68 μ l of each primer (10 μ M), 2.8 μ l MgCl₂ (50 mM), 0.35 μ l *Taq* DNA polymerase (5 U/ μ l), and 0.7 μ l DNA, with the remainder of Milli-Q water (EMD Millipore, Billerica, MA). The reactions were performed with the following thermocycling sequence: initial denaturation for 2 min at 94 °C, 35 cycles of denaturation at 94 °C at 30 s each, annealing at 58 °C for 45 s, extension at 72 °C for 1 min, and final extension at 72 °C for 3 min. Amplifications were verified by electrophoresis in stained 1 % agarose gels and visualized with a UV transilluminator. Amplified products were sequenced (Macrogen, Seoul, South Korea) in both directions using the same primers used in the amplification.

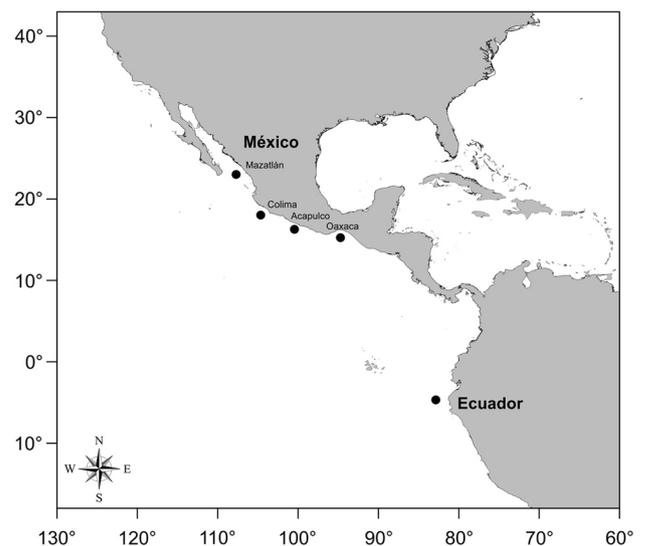


Fig. 1 Sailfish sampling sites in the eastern Pacific

Data analysis

The sequences were edited using the software Sequencher 5.2.4 (Gene Codes, Ann Arbor, MI). Subsequently, a multiple sequence alignment was performed with the Clustal W algorithm [12], included in the Mega 6 software [13], using the default settings. The number of mitochondrial haplotypes (M), number of segregating sites (S), haplotype diversity (h) and nucleotide diversity (π) were estimated using ARLEQUIN 3.0 software [14]. Genetic differentiation among populations was calculated by means of the analysis of molecular variance (AMOVA), using the statistic Φ_{ST} (analogous to F_{ST}). Φ_{ST} was also used for molecular pairwise comparisons between locations. The probability of significance was obtained from 10,000 permutations. These analyses were carried out using ARLEQUIN 3.0 [14].

A genetic mixture analysis based on Bayesian inferences of genetic structure was performed using BAPS (Bayesian Analysis of Population Structure) v. 6.0 [15]. We used the spatial model for clustering units, running a range of K (cluster) values multiple times to increase the probability of finding the best partition [15]. Finally, the genetic population structure was inferred in a hierarchical manner using the program hierBAPS and its bundled tools [15, 16].

The Isolation By Distance Web Service (IBDWS) version 3.15 (<http://ibdws.sdsu.edu/>) was used to estimate the slope and intercept of the isolation by distance (IBD) relationship based on a reduced major axis (RMA) regression. A Mantel test based on 30,000 permutations, was used to assess the relationship between the genetic and geographical distances. Φ_{ST} results were adjusted using the following transformation: Rousset's genetic distance $\Phi_{ST}/(1 - \Phi_{ST})$ [17], and the geographic distances between sampling sites were measured using Google Earth (<http://earth.google.com>).

We explored the phylogeographic pattern through a minimum spanning network, which integrates the relationship between evolutionary lineages, geographic distribution, and frequency of haplotypes using the Network 4.6.1.2 program (www.fluxusengineering.com/sharenet.htm).

Finally, the historical demography was inferred from the mismatch distribution [18] constructed on the observed number of differences among all pairs of

haplotypes. A unimodal distribution can indicate a rapid growth from a small population, while a multimodal distribution suggests long-term population stability. The sudden expansion model was tested using Harpending's raggedness index (Hri) [19] and the sum of square deviations (SSD) [20] between the observed and the expected mismatch. The P estimate was based on the number of the SSD, calculated under simulation as greater than or equal to the observed SSD, as implemented in Arlequin 3.0. A second approach for examining the historical demography was based on the Tajima's D statistic [21] for testing the departure from neutrality. Significant negative estimates can be interpreted as signatures of population expansion. The demographic parameters τ (time since expansion in units of mutational time), θ_0 (population size before expansion), and θ_1 (population size after expansion) were calculated using Arlequin 3.0 [14], and the τ estimate value was used to estimate expansion time in generations (t), using the formula $t = \tau/2\nu$ [18], where ν represents the mutation rate.

Results

A fragment of around 530 base pairs of the mitochondrial control region of 250 sailfishes caught in the eastern Pacific Ocean was amplified. Sequences were deposited in GenBank (accession numbers KR920366–KR920615). We identified 134 haplotypes and 116 polymorphic sites, of which 64 had parsimonious information. Haplotype diversity ranged from 0.902 ± 0.015 in Colima to 1.000 ± 0.076 in Ecuador. The nucleotide diversity for all the data was $0.007 (\pm 0.004)$, ranging from $0.0062 (\pm 0.0036)$ in Colima to $0.0082 (\pm 0.0045)$ in Oaxaca (Table 1).

AMOVA indicated genetic differences, since Φ_{ST} estimates were significantly different from zero ($\Phi_{ST} = 0.0061$, $P = 0.029$). Pairwise comparisons of Φ_{ST} indicated that the differences were attributable mainly to individuals from Ecuador, which were statistically different from the other sampling sites (Table 2). Since the comparisons between Mexico and Ecuador could be affected by the relatively small sample size in Ecuador, we randomly took ten individuals per sampling site in Mexico, trying to compare sample sizes that were

Table 1 Measures of genetic diversity of sailfish in the eastern Pacific, including the number of individuals (n), number of segregating sites (S) and number of mitochondrial haplotypes (M)

Site	n	S	M	Haplotype diversity (h)	Nucleotide diversity (π)	Frequent haplotype
Mazatlán	81	63	58	0.964 ± 0.015	0.0065 ± 0.0037	#1 (15)
Colima	28	32	19	0.902 ± 0.051	0.0062 ± 0.0036	#1 (9)
Acapulco	60	66	48	0.972 ± 0.015	0.0081 ± 0.0045	#1 (10)
Oaxaca	74	69	50	0.980 ± 0.007	0.0082 ± 0.0045	#1 (8)
Ecuador	7	9	7	1.000 ± 0.076	0.0072 ± 0.0047	

Table 2 Matrix of pairwise Φ_{ST} values for mtDNA sequences

	Mazatlán	Colima	Acapulco	Oaxaca	Ecuador
Mazatlán	0.00000	-0.00874	-0.01203	-0.00669	0.14356*
Colima	-0.00080	0.00000	-0.01425	-0.01501	0.09345*
Acapulco	0.00119	-0.00319	0.00000	-0.00883	0.08984*
Oaxaca	0.00458	-0.00931	-0.00210	0.00000	0.08550*
Ecuador	0.11254*	0.09759*	0.05339*	0.06180*	0.00000

Below diagonal: results considering the original sample size for sites in Mexico; above diagonal: results considering the decreased sample size in sites of Mexico

* Statistically significant values at $\alpha = 0.05$

similar, and again performed AMOVA and pairwise comparisons. This AMOVA indicated no significant differences ($\Phi_{ST} = 0.0128$, $P = 0.087$), but the pairwise comparisons between Ecuador and Mexico again indicated significant differences (Table 2). The Bonferroni correction for pairwise comparisons adjusted the significance level (α) to avoid committing a Type I error in the comparison between Ecuador and Colima; however, since α was zero when we compared Ecuador to the other sites, the Bonferroni adjustment did not change the results.

The results obtained from the Bayesian analysis did not suggest that there are different sailfish populations in the study area. The results of the spatial clustering model, implemented in BAPS, indicated that the best partition was one unique group, considering the log (marginal likelihood) of optimal partition (-2692.4228). It was supported by hierarchical clustering, which also suggested lack of clusters (populations), since all individuals were included in one cluster. Taking into account the previous analyses, the inability of the AMOVA to detect noticeable differences could be a result of the high genetic similarity among sites from Mexico, and the small sample size from Ecuador, or of a moderate or absent genetic differentiation along the eastern Pacific.

Paired comparisons of genetic distances against geographic distances between the five sampling sites showed a positive correlation, suggesting IBD ($r = 0.971$; Fig. 2). The Mantel test confirmed that this relationship was statistically significant ($P = 0.0170$).

The most common haplotype in the entire sample was found only in sailfish from Mexico. However, other haplotypes were shared by Mexico and Ecuador, as is shown in the minimum spanning network of haplotypes, which indicates an apparent homogeneous distribution, with a star-type pattern (Fig. 3). The BAPS also supported the lack of different clusters.

Mismatch distribution resulted in a unimodal pattern for the five sampling areas, consistent with the model of sudden expansion by Rogers and Harpending [18]. The test of goodness of fit for the model expansion (SSD and Hri)

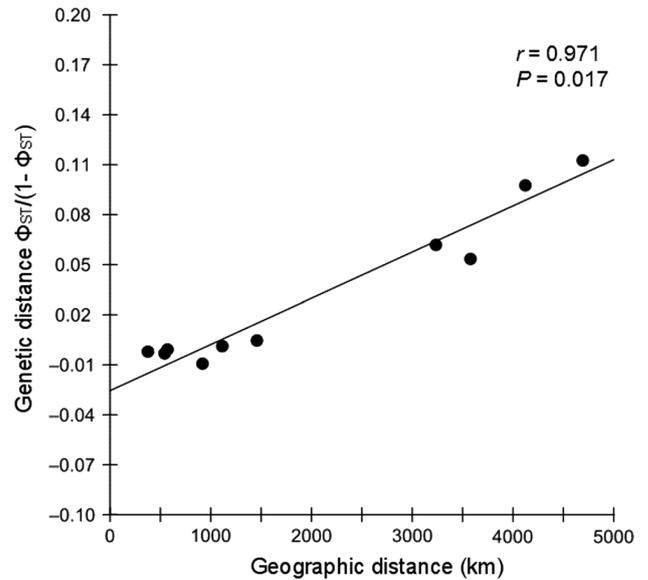


Fig. 2 Isolation by distance plot of $\Phi_{ST}/(1 - \Phi_{ST})$ plotted against the geographic distance (km) of the five populations of *Istiophorus platypterus*, showing the RMA regression line ($r = 0.971$, $P = 0.017$)

revealed no significant differences between observed and expected values (Table 3). Tajima's D estimates were negative and highly significant, indicating deviations from neutrality at the sites in Mexico. In Ecuador, the D estimate was positive and not statistically significant, suggesting a possible minor selective effect or population expansion (Fig. 4). The global value of τ for all data, the generation time of 3 years, and the size of the DNA sequence (~ 530 bp), were used to estimate the approximate date of sudden population expansion. Because of the lack of a mutation rate reported for the control region in *Istiophoridae*, we used two divergence estimates reported for other fish species; one (3.6 %) for the genus *Centropomus* [22], and the other (9.3 %) for the genus *Chromis* [23]. Thus, we estimated that the beginning of sudden expansion happened between about 80,000 and 215,000 years ago (Arlequin 3.0).

Discussion

Our estimates of genetic diversity are consistent with those reported by Graves and McDowell [4] and Lu et al. [11] for the coast of Mexico. However, the nucleotide diversity values are lower than estimates for sailfish populations in the Atlantic and for other billfish species (Table 4). Low genetic variability found in the eastern Pacific may reflect historical events associated with a reduction in population size and a bottleneck effect as a consequence of

Fig. 3 Minimum spanning network (MJ Network) of all saifish data in the eastern Pacific. Each *circle* represents an observed haplotype, and the *circles* are proportional to the number of individuals sampled with that haplotype. Each *color* indicates a sampling site: Mazatlán (*dark blue*), Colima (*red*), Acapulco (*black*), Oaxaca (*green*), and Ecuador (*light blue*) (color figure online)

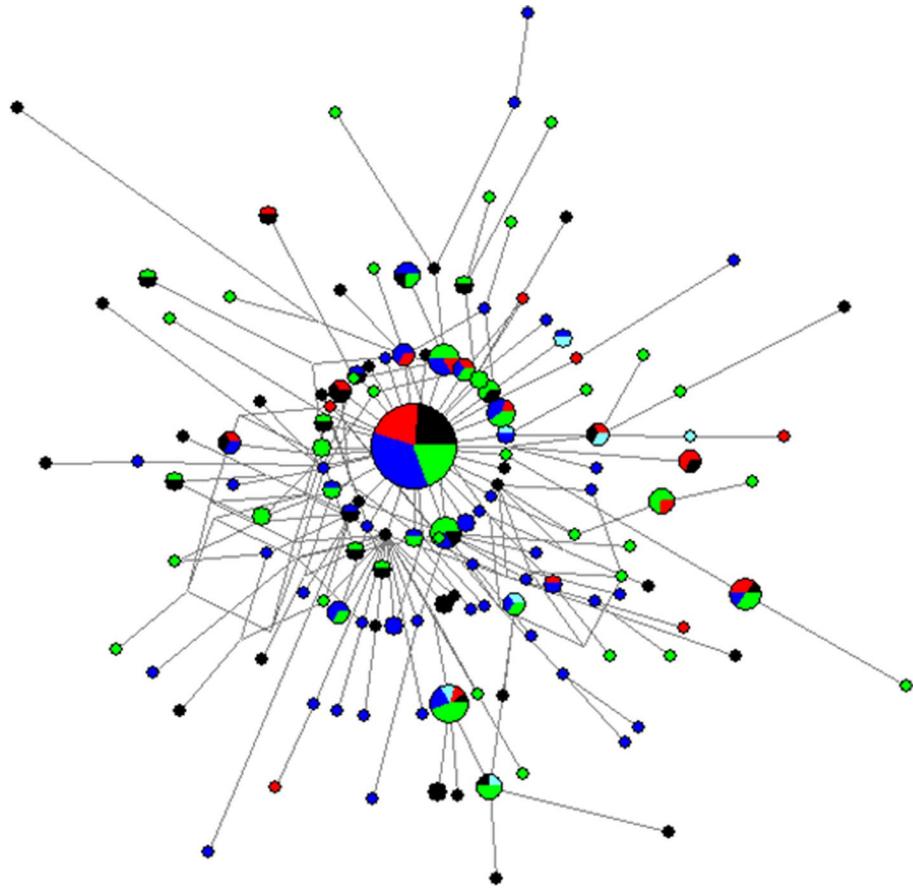


Table 3 Values of the distribution of paired differences

Sites	Parameters of population expansion			Goodness of fit			
	τ	θ_0	θ_1	Hri	<i>P</i> value	SSD	<i>P</i> value
Mazatlán	3.556	0.0527	99,999.000	0.0229	0.4700	0.0010	0.4100
Colima	4.318	0.0000	9.514	0.0317	0.6400	0.0091	0.5400
Acapulco	3.845	0.7201	46.562	0.0118	0.7900	0.0003	0.9600
Oaxaca	4.429	0.0210	96.015	0.0166	0.5800	0.0008	0.5600
Ecuador	4.265	0.0000	516.875	0.0589	0.7400	0.0179	0.6400
Total	4.083	0.1588	20,133.593	0.0284	0.6440	0.0058	0.6220

environmental pressures. A small population may be significantly affected by genetic drift, resulting in loss of many haplotypes and promoting dominance of a few by inbreeding [24]. The amount, frequency, and genetic relationship of the lineages found in our study, using a minimum spanning network, also support a possible reduction in the population size of sailfish in the eastern Pacific, where we found a high frequency of a single haplotype and a large number of rare haplotypes. Similar results have been found for the olive ridley turtle *Lepidochelys olivacea* [25] and blacktip shark *Carcharhinus limbatus* [26] in the eastern Pacific. Although the similarities between olive ridley turtles, blacktip sharks, and sailfish are not apparent, they are

all highly migratory species and that share a tropical distribution. Bowen et al. [25] suggest that reduced genetic diversity in populations of the eastern Pacific is due to a recent climatic event when the weather was unstable and intrusions of cold water through Ecuador reduced the tropical fauna, restricting species to the warm waters of the southwest Pacific and Indian Ocean, where there have been warm waters for the past 20 million years.

Several studies reveal that pelagic species tend to be genetically homogeneous at regional geographic scales, only showing differentiation between extreme ends of populations or between ocean basins [27]. In our study, the results of AMOVA suggest that there is more than one

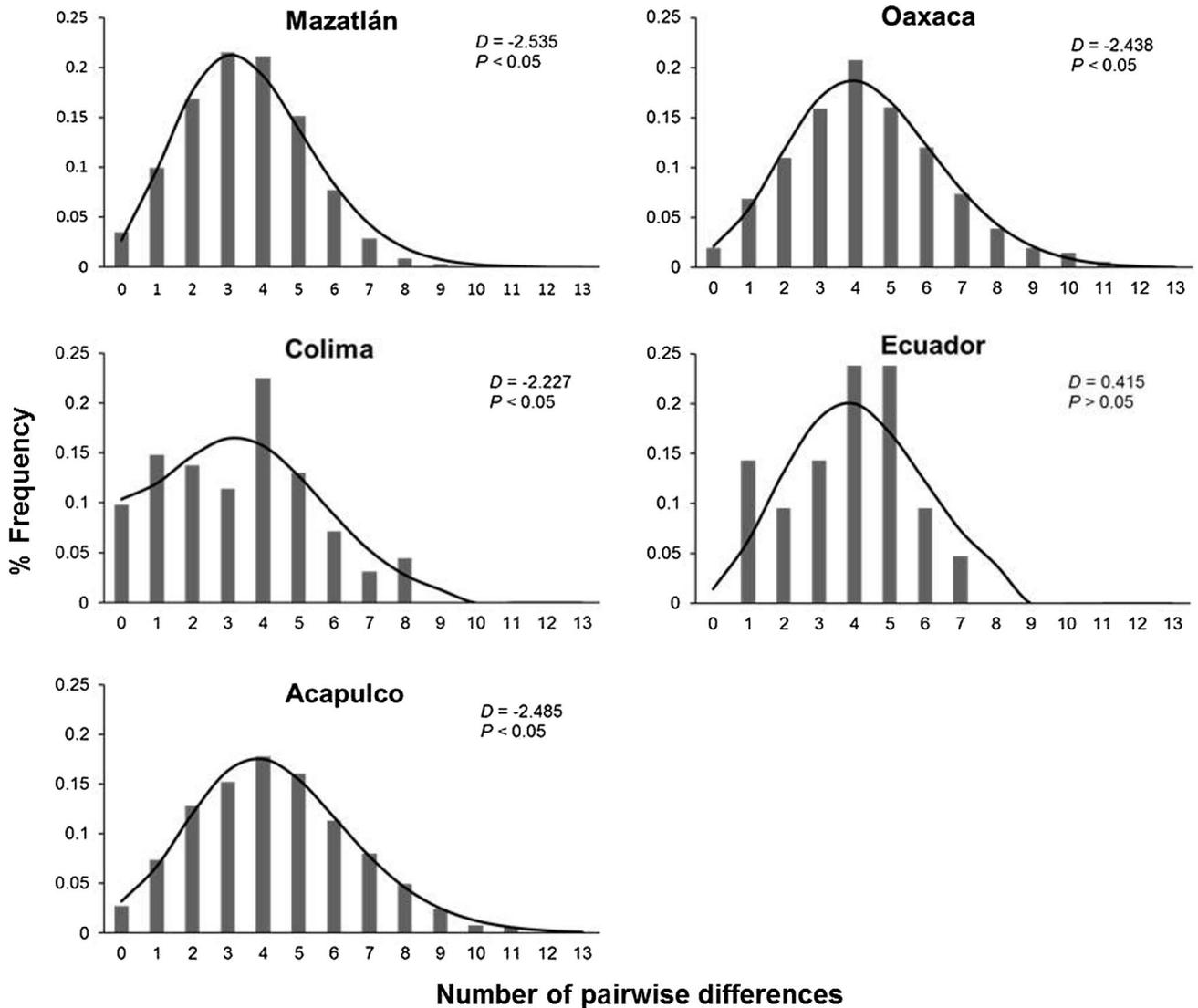


Fig. 4 Mismatch distribution and values of Tajima's *D* test for each of the five sampling areas in the eastern Pacific

Table 4 Measures of genetic diversity for species of billfish

Species	Geographic area	Author/GenBank accession numbers	<i>h</i>	π
Striped marlin	Pacific	McDowell and Graves [28]	0.998	0.044
Blue marlin	Atlantic	McDowell et al. [41]	0.998	0.103
Sailfish	Atlantic	EF415042.1–EF415285.1	0.952	0.055
Sailfish	Gulf of Arabia	Hoolihan et al. [8]	0.820	0.039
Sailfish	Taiwan	Lu et al. in press	0.989	0.030
Sailfish	Mexico	Lu et al. in press	0.817	0.007
Sailfish	Eastern Pacific	This study	0.963	0.007

Sailfish values from the Atlantic were estimated using GenBank accession numbers

population in the eastern Pacific. Pairwise comparisons of the fixation index indicated that the Mexican sailfish represented one genetic population and that the main molecular variation between sites was related to sailfish from

Ecuador. With the aim of understanding the genetic structure between Mexico and Ecuador, sequence (260 bp) data from Costa Rica deposited in GenBank (accession numbers: EF415043-EF415285) were compared. The result of

the AMOVA showed significant differences ($\Phi_{ST} = 0.0099$, $P = 0.024$). Pairwise comparisons of Φ_{ST} indicated that the differences were attributable mainly to individuals of Ecuador, which were statistically different from the other sampling sites. Similar results were found for striped marlin, with marlin from Ecuador being genetically different from populations from Mexico [28]. Results of satellite tracking of tagged sailfish show that sailfish have a coastal regional migratory behavior, with short movements from the tagging sites [29–31]. According to Prince et al. [29], fish travelled no more than 572 miles from the coastal sites of Mexico and Central America. Sailfish tagged in Guatemala, Costa Rica, and Panama moved between these countries; sailfish tagged in Mexico moved only within Mexico. Moderate movement could explain the genetic differences between Mexico and Ecuador.

However, since the haplotype network showed shared haplotypes between Mexico and Ecuador, and the Bayesian analysis indicated that the best partition was for one unique cluster, an alternative interpretation to the existence of different populations in sailfish should be considered. The little to moderate genetic differentiation (based on AMOVA) estimated in Ecuador could be a consequence of the limited sample size and/or of a process related to “chaotic patchiness” [32]. It has been noticed in other taxonomic groups that population subdivisions inferred from maternally inherited mtDNA markers can seem high as a consequence of female-biased dispersal [33, 34]. Although moderate movements of adults may occur, as seen in Mexico and Central America, dispersal of eggs and larvae along with the water current patterns can contribute to the existence of only one homogeneous population. Other pelagic species with elevated dispersal and large population sizes have shown a weak phylogeographic pattern [35, 36], and consequently the study of their genetic populations is a challenge. Molecular markers (such as microsatellites or SNPs) with high resolution could help detect weak genetic differences in a clearer manner.

Based on the estimates of haplotype diversity (h) and nucleotide diversity (π) Grant and Bowen [37] classified marine fish into four categories. Sailfish (second category) have high h and low π . This condition can be attributed to expansion after a period of low effective population size, as rapid population growth enhances the retention of new mutations. Changes in population size and level of gene flow leave a characteristic signature in the history of particular populations, which can be inferred from the phylogenetic relationships of lineages [38]. A star-type network and a unimodal distribution of pairwise differences, as found in this study, are characteristic of sudden increases in a small number of haplotypes [37]. If Ecuador represents a population that is different from Mexico, a clearer phylogeographic pattern should be observed from an analysis of a larger sample of sailfish from Ecuador.

From the two estimates of divergence in the literature [22, 23], we estimated the population expansion time for sailfish in the eastern Pacific at 80,000–215,000 years ago. The last two glaciations, which started ~70,000 and 200,000 years ago, respectively, impacted sailfish. These glacial periods were characterized by cooler seawater and lower sea levels, which reduced the habitats of marine fish. Since the sailfish is a warm water species, its effective population size and its distribution contracted to equatorial regions. This would have then led to population expansion during interglaciations [25]. The relatively high genetic diversity and the lack of neutrality in the Tajima’s D analysis could suggest that individuals from Ecuador are a more stable population than those from Mexico, and were less impacted during glaciations.

A better understanding of populations from Ecuador could be achieved by obtaining larger samples to detect the main haplotypes and frequencies. The use of a greater number of microsatellites in relation to those used in previous analyses, or the employment of SNPs, would provide a more comprehensive understanding of sailfish genetic population structure in the eastern Pacific. Lineages that have recently diverged or populations that are geographically proximate (which produce a weak phylogeographic pattern) can be detected by the use of highly polymorphic molecular markers, such as SNPs. They allow a population perspective based on neutral markers and a deeper understanding of natural selection events associated with the adaptive process [39, 40].

Our results provide novel insights into the population structure of sailfish and highlight the possibility of a different population in South America. However, since the differences among localities were small, a weak or absent population subdivision should be considered for management of sailfish populations until other findings can be obtained.

Acknowledgments This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) of Mexico (Grant SEP-CONACYT-60376) and the Secretaría de Investigación y Posgrado-Instituto Politécnico Nacional. G.G.R.C. is a recipient of a graduate fellowship and of grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Beca de Estímulo Institucional de Formación de Investigadores, and Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas-Instituto Politécnico Nacional. C.Q.V. and F.J.G.R. are fellows of Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas-Instituto Politécnico Nacional, Estímulos al Desempeño de los Investigadores-Instituto Politécnico Nacional and Sistema Nacional de Investigadores-Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

References

1. Nakamura I (1985) FAO species catalogue. Billfishes of the world. An annotated and illustrated catalogue of marlins, sailfishes, spearfishes and swordfishes known to date. FAO fisheries synopsis. FAO/UNDP vol 5, Rome

2. Kume S, Joseph J (1969) Size composition and sexual maturity of billfish caught by the Japanese longline fishery in the Pacific Ocean east of 130°W. *Bull Far Seas Fish Res Lab* 2:115–162
3. Ehrhardt N, Fitchett M (2006) On the seasonal dynamic characteristics of the sailfish, *Istiophorus platypterus*, in the eastern Pacific off Central America. *Bull Mar Sci* 79(3):589–606
4. Graves JE, McDowell JR (1995) Inter-ocean genetic divergence of istiophorid billfishes. *Mar Biol* 122:193–203
5. Graves JE, McDowell JR (2003) Stock structure of the world's istiophorid billfishes: a genetic perspective. *Mar Freshw Res* 54:287–298
6. Collette BB, McDowell JR, Graves JE (2006) Phylogeny of recent billfishes (Xiphoidei). *Bull Mar Sci* 79:455–468
7. McDowell JR, Graves JE (2002) A genetic perspective on Atlantic sailfish stock structure. *Int Comm Conserv Atl Tunas Collect Vol Sci Pap* 54:805–810
8. Hoolihan JP, Premanandh J, D'Aloia-Palmieri MA, Benzie JAH (2004) Intraspecific phylogeographic isolation of Arabian Gulf sailfish *Istiophorus platypterus* inferred from mitochondrial DNA. *Mar Biol* 145:465–475
9. McDowell JR (2002) Genetic stock structure of the sailfish, *Istiophorus platypterus*, based on nuclear and mitochondrial DNA. PhD Dissertation, Virginia Institute of Marine Science, Gloucester Point, VA
10. Graves JE, McDowell JR (2015) Population structure of istiophorid billfishes. *Fish Res* 166:21–28
11. Lu CP, Alvarado-Bremer JR, McKenzie JL, Chiang WC (2015) Analysis of sailfish (*Istiophorus platypterus*) population structure in the North Pacific. *Fish Res* 166:33–38
12. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The ClustalW Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 24:4876–4882
13. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729
14. Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1:47–50
15. Corander J, Cheng L, Marttinen P, Sirén J, Tang J (2013) BAPS: Bayesian analysis of population structure V. 6.0. Department of Mathematics and statistics. University of Helsinki, Finland
16. Cheng L, Connor TR, Sirén J, Aanensen DM, Corander J (2013) Hierarchical and spatially explicit clustering of DNA sequences with BAPS software. *Mol Biol Evol*. doi:10.1093/molbev/mst028
17. Rousset F (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics* 145:1219–1228
18. Rogers AR, Harpending H (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol Biol Evol* 9:552–569
19. Harpending H (1994) Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Hum Biol* 66:591–600
20. Schneider S, Excoffier L (1999) Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetics* 152:1079–1089
21. Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585–595
22. Donaldson KA, Wilson RR (1999) Amphi-Panamaic geminates of snook (Percoidei: Centropomidae) provide a calibration of the divergence rates in the mitochondrial DNA control region of fishes. *Mol Phylogenet Evol* 13:208–213
23. Domingues VS, Bucciarelli G, Almada VC, Bernardi G (2005) Historical colonization and demography of the Mediterranean damselfish, *Chromis chromis*. *Mol Ecol* 14:4051–4063
24. Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2008) Fundamentos de Genética da Conservação. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto
25. Bowen BW, Clark AM, Abreu-Grobois FA, Chaves A, Reichart HA, Ferl RJ (1998) Global phylogeography of the ridley sea turtles (*Lepidochelys* spp.) as inferred from mitochondrial DNA sequences. *Genetica* 101:179–189
26. Keeney DB, Heist EJ (2006) Worldwide phylogeography of the blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) inferred from mitochondrial DNA reveals isolation of western Atlantic populations coupled with recent Pacific dispersal. *Mol Ecol* 15(12):3669–3679
27. Rocha-Olivares A, Bobadilla Jiménez M, Ortega García S, Saavedra Sotelo N, Sandoval Castillo JR (2006) Variabilidad mitocondrial del dorado *Coryphaena hippurus* en poblaciones del Pacífico. *Ciencias Marinas* 32:569–578
28. McDowell JR, Graves JE (2008) Population structure of striped marlin (*Kajikia audax*) in the Pacific Ocean based on analysis of microsatellite and mitochondrial DNA. *Can J Fish Aquat Sci* 65:1307–1320
29. Prince ED, Holts DB, Snodgrass D, Orbesen ES, Luo J, Domeier ML, Serafy JE (2006) Transboundary movement of sailfish, *Istiophorus platypterus*, off the Pacific coast of Central America. *Bull Mar Sci* 79:827–838
30. Mourato BL, Carvalho FC, Hazin FHV, Pacheco JC, Hazin HG, Travassos P, Amorim AF (2010) First observations of migratory movements and habitat preference of Atlantic sailfish, *Istiophorus platypterus*, in the southwestern Atlantic Ocean. *Collect Vol Sci Pap ICCAT* 65:1740–1747
31. Chiang WC, Musyl MK, Sun CL, Chen SY, Chen WY, Liu DC, Su WC, Yeh SZ, Fu SC, Huang TL (2011) Vertical and horizontal movements of sailfish (*Istiophorus platypterus*) near Taiwan determined using pop-up satellite tags. *J Exp Mar Biol Ecol* 397:129–135
32. Hedgecock D (1994) Temporal and spatial genetic structure of marine animal populations in the California current. *CalCOFI Rep* 35:73–81
33. Lukoschek V, Waycott M, Keogh JS (2008) Relative information content of polymorphic microsatellites and mitochondrial DNA for inferring dispersal and population genetic structure in the olive sea snake, *Aipysurus laevis*. *Mol Ecol* 17:3062–3077
34. González-Suárez M, Flatz R, Aurióles-Gamboa D, Hedrick PW, Gerber LR (2009) Isolation by distance among California sea lion populations in Mexico: redefining management stocks. *Mol Ecol* 18:1088–1099
35. Lecomte F, Grant WS, Dodson JJ, Rodríguez-Sánchez R, Bowen B (2004) Living with uncertainty: genetic imprints of climate shifts in east Pacific anchovy (*Engraulis mordax*) and sardine (*Sardinops sagax*). *Mol Ecol* 13:2169–2182
36. García-Rodríguez FJ, García-Gasca SA, Cruz-Agüero JC, Cota-Gómez VM (2011) A study of the population structure of the Pacific sardine *Sardinops sagax* (Jenyns, 1842) in Mexico based on morphometric and genetic analyses. *Fish Res* 107:169–176
37. Grant WS, Bowen BW (1998) Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *J Hered* 89:415–426
38. Avise JC (2000) Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, MA
39. De Wit P, Pespeni MH, Ladner JT, Barshis DJ, Seneca F, Jaris H, Palumbi SR (2012) The simple fool's guide to population genomics via RNASeq: an introduction to high-throughput sequencing data analysis. *Mol Ecol Resour* 12(6):1058–1067

40. Peterson BK, Weber JN, Kay EH, Fisher HS, Hoekstra HE (2012) Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PLoS One* 7(5):e37135
41. McDowell JR, Carlsson JEL, Graves JE (2007) Genetic analysis of blue marlin (*Makaira nigricans*) stock structure in the Atlantic Ocean. *Gulf Caribb Res* 19:75–82