



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL  
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



VARIACIÓN FENOTÍPICA Y ESTRUCTURA  
GENÉTICA POBLACIONAL DE LA SARDINA  
CRINUDA *Opisthonema libertate* (Günther, 1867) EN  
EL PACÍFICO ORIENTAL

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS

PRESENTA

CARLOS IVÁN PÉREZ QUIÑONEZ

LA PAZ, B.C.S., DICIEMBRE DE 2018



**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 13 del mes de Noviembre del 2018 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:

**"VARIACIÓN FENOTÍPICA Y ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL  
DE LA SARDINA CRINUDA *Opisthonema libertate* (Günther, 1867) EN EL PACÍFICO ORIENTAL"**

Presentada por el alumno:

**PÉREZ**

Apellido paterno

**QUIÑONEZ**

materno

**CARLOS IVÁN**

nombre(s)

Con registro: 

A	1	5	0	1	7	5
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

**DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS**

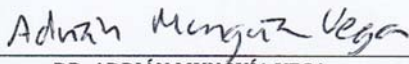
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

**LA COMISION REVISORA**

Directores de Tesis

  
DR. FRANCISCO JAVIER GARCÍA RODRÍGUEZ

Director de Tesis

  
DR. ADRIÁN MUNGUÍA VEGA

2º. Director de Tesis

  
DR. CASIMIRO QUIÑONEZ VELÁZQUEZ

  
DR. JOSÉ DE LA CRUZ AGÜERO

DR. PEDRO CRUZ HERNÁNDEZ

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

  
DR. SERGIO HERNÁNDEZ TRUJILLO



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 22 del mes de Noviembre del año 2018

El (la) que suscribe M. en C. CARLOS IVÁN PÉREZ QUIÑONEZ Alumno (a) del Programa

DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS

con número de registro A150175 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

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

DR. FRANCISCO JAVIER GARCÍA RODRÍGUEZ Y DR. ADRIÁN MUNGUIA VEGA

y cede los derechos del trabajo titulado:

VARIACIÓN FENOTÍPICA Y ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL DE LA SARDINA CRINUDA

*Opisthonema libertate* (Günther, 1867) EN EL PACÍFICO ORIENTAL

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: nash14ivan@hotmail.com - fj\_gr@yahoo.com - airdrian@email.arizona.edu

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

M. en C. CARLOS IVÁN PÉREZ QUIÑONEZ

*Nombre y firma del alumno*

## *Dedicatoria*

*A mí madre Consuelo por darme su apoyo incondicional.*

*A la personita más especial en mi vida, mi hija Ximena Pérez García, ¡Te amo mi vida!*

*Al igual que a mi tío Casimiro quien me ha apoyado a lo largo de mi vida académica.*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), al Beca de Estímulo Institucional de Formación de Investigadores (BEIFI) del Instituto Politécnico Nacional y a la comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas del Instituto Politécnico Nacional (COFFA-IPN) por el apoyo económico otorgado.

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 Dr. Francisco J. García Rodríguez y al Dr. Casimiro Quiñonez Velázquez por el valioso apoyo durante el desarrollo de mi trabajo de tesis, el tiempo dedicado a cada revisión de trabajos y las acertadas recomendaciones; pero sobre todo por la amistad y el gran apoyo personal que me brindaron, son unas excelentes personas.

A los miembros de la comisión revisora: Dr. Adrián Munguía Vega, Dr. Pedro Cruz Hernández, Dr. José de la Cruz Agüero, por el tiempo dedicado a la revisión de la tesis y sus acertadas recomendaciones.

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.

A cada uno de los amigos y amigas que han brindado su apoyo y comprensión Luis (Mijo), Jairo (Compadre), Aglaé, Adriana, Víctor. Les agradezco sus consejos y compañía, por trasmitirme sus conocimientos y apoyarme en el laboratorio.

Finalmente gracias a todos los que han depositado en mí su confianza y han contribuido en mi formación académica y personal

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURA.....	iv
LISTA DE TABLAS.....	vii
LISTA DE ANEXOS.....	viii
GLOSARIO.....	ix
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	15
JUSTIFICACIÓN.....	21
HIPÓTESIS.....	22
OBJETIVOS.....	22
Objetivo general.....	22
Objetivo específicos.....	22
METODOLOGÍA.....	23
Área de estudio.....	23
Recolecta de muestras.....	23
Definición de grupos fenotípicos.....	26
Captura de imágenes.....	26
Obtención de datos morfométricos.....	27
Análisis de los datos morfométricos.....	31
Definición de grupos genotípicos mediante ADNmt.....	33
Extracción de ADN.....	33
Amplificación y secuenciación de la Región Control.....	33
Diversidad genética.....	35
Diferenciación y estructura genética.....	35
Análisis filogeográfico.....	36
Historia demográfica.....	37

<b>Evaluación de construcción de librerías para la detección de SNPs..</b>	<b>39</b>
<b>Extracción y cuantificación de ADN.....</b>	<b>39</b>
<b>Doble digestión.....</b>	<b>40</b>
<b>Ligación de adaptadores.....</b>	<b>40</b>
<b>Agrupamiento (<i>Pool</i>).....</b>	<b>41</b>
<b>Selección de tamaño con <i>Sage Science Pippin Prep</i>.....</b>	<b>42</b>
<b>Amplificación por PCR para generar bibliotecas de secuenciación de Illumina.....</b>	<b>42</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
<b>Diferenciación morfométrica.....</b>	<b>44</b>
Diferencias morfométricas basadas en la forma del cuerpo.....	44
Diferencias morfométricas basadas en la forma del otolito <i>sagitta</i> .	48
<b>Diferenciación genética basada en el ADNmt.....</b>	<b>52</b>
Diversidad genética.....	52
Diferenciación y estructura genética.....	53
Demografía histórica.....	55
Análisis filogeográfico.....	59
<b>Desarrollo de librería para la detección de SNPs.....</b>	<b>60</b>
Extracciones de ADN para detección de SNPs.....	60
Digestiones ddRADseq.....	63
Ligación de adaptadores.....	65
Agrupamiento ( <i>Pool</i> ).....	67
Selección de tamaño.....	68
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>69</b>
<b>Análisis de grupos fenotípicos.....</b>	<b>69</b>
<b>Análisis de grupos genéticos.....</b>	<b>74</b>
<b>Diversidad genética.....</b>	<b>74</b>
<b>Diferenciación genética.....</b>	<b>76</b>
<b>Historia demográfica.....</b>	<b>78</b>

Evaluación del diseño de librería.....	80
Recomendaciones al manejo de la pesquería de sardina crinuda <i>O. libertate</i> en el Pacífico Oriental.....	83
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>85</b>
Grupos fenotípicos.....	85
Estructura genética poblacional.....	85
Diseño de librería.....	85
Conclusión general.....	86
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>86</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>87</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>110</b>



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ejemplar de sardina crinuda *Opisthonema libertate*..... 1
- Figura 2.** Representación de la molécula del ADN mitocondrial..... 9
- Figura 3.** Polimorfismo de Nucleótido Simple (SNP) y sus genotipos posibles.. 10
- Figura 4.** El proceso de RADseq. (A) El AND genómico es cortado con la enzima de restricción elegida (enzima SbfI en este ejemplo). (B) El adaptador P1 se liga a fragmentos cortados con SbfI. El adaptador P1 se adapta a partir del adaptador de secuenciación Illumina (secuencia completa no mostrada aquí), con el identificador molecular (MID; CGATA en este ejemplo) y aun sitio de corte que sobresale al final (TGCA en este ejemplo). (C) Se agrupan muestras de múltiples individuos y se fragmentan aleatoriamente todos los fragmentos. Sólo un subconjunto de los fragmentos resultantes contiene sitios de restricción y adaptadores P1. (D) El adaptador P2 es ligado a todos los fragmentos. El adaptador P2 tiene un extremo divergente. (E) Amplificación por PCR con los primers P1 y P2. El adaptador P2 se completará solamente en los fragmentos ligados con adaptador P1, y por lo tanto sólo estos fragmentos serán amplificados completamente. (F) Las muestras agrupadas con diferentes MIDs se separan bioinformáticamente y los SNPs llamados (C/G SNP subrayados). (G) A medida que los fragmentos se cortan al azar, las secuencias finales emparejadas de cada fragmento secuenciado cubrirán una región de 300 ^ 400 pb en dirección del sitio de restricción..... 12
- Figura 5.** Sitios de muestreo de *Opisthonema libertate* en el Pacífico Oriental y esquema de las corrientes marinas superficiales en el Pacífico Oriental. CC. Corriente de California; CCCR. Corriente costera de Costa Rica; CCE. Contracorriente Ecuatorial y CSE. Corriente Surecuatorial..... 25
- Figura 6.** Variación mensual de la temperatura superficial del mar (TSM) por zona en la costa noroeste de México durante 2014.....25

<b>Figura 7.</b> Ubicación de marcas naturales en el cuerpo de la sardina crinuda (a). Gradillas de referencias con distancias radiales angularmente equidistantes (b), y configuración obtenida de cada pez integrada a partir de la selección de 13 marcas totales (c). Los puntos negros indican las marcas naturales ubicadas a partir de referencias anatómicas y los puntos sin relleno las semi-marcas.....	29
<b>Figura 8.</b> Ubicación de marcas naturales en los otolitos <i>sagitta</i> de <i>Opisthonema libertate</i> (a). Gradillas de referencias con distancias radiales angularmente equidistantes (b), y configuración obtenida de cada pez integrada a partir de la selección de 20 marcas totales (c). Los puntos negros indican las marcas naturales ubicadas a partir de referencias anatómicas y los puntos sin relleno las semi-marcas.....	30
<b>Figura 9.</b> Diagrama de dispersión generado a partir de los scores de las variables canónicas para la forma del cuerpo, invierno (arriba) y verano (abajo).....	45
<b>Figura 10.</b> Dendrogramas generados para cada temporada con el algoritmo UPGMA, usando la matriz de distancia Mahalanobis de la forma del cuerpo.....	47
<b>Figura 11.</b> Diagrama de dispersión generado a partir de los scores de las variables canónicas para la forma del otolito, invierno (arriba) y verano (abajo).....	49
<b>Figura 12.</b> Dendrogramas generados para cada temporada con el algoritmo UPGMA, usando la matriz de distancia Mahalanobis de la forma del otolito.....	51
<b>Figura 13.</b> Relación entre la distancia genética ( $\Phi_{ST}/(1-\Phi_{ST})$ ) y la distancia geográfica (km) de los cinco sitios de muestreo de <i>O. libertate</i> en el Pacífico Oriental ( $r = 0.574$ , $P = 0.0070$ ).....	54
<b>Figura 14.</b> Distribución de diferencias pareadas y valores de la prueba D de Tajima para cada una de las cinco áreas de muestreo de <i>O. libertate</i> en el Pacífico Oriental. .....	57
<b>Figura 15.</b> Demografía histórica de la sardina <i>O. libertate</i> estimada utilizando el análisis Bayesiano Skyline a partir de secuencias de la región control del ADNmt. El	

tiempo de expansión de la sardina crinuda es indicada por la terminación de la línea negra (Skyline) alrededor de 150, 000 años..... 58

**Figura 16.** Red de mínima expansión (MJ Network) de todos los datos de sardina crinuda 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. Bahía Magdalena (verde), Guaymas (rosa), Mazatlán (verde oscuro), El Salvador (naranja) y Costa Rica (azul marino).....59

**Figura 17.** Electroforesis en gel de agarosa 1%. En cada pozo se sembraron 5µl de ADN extraído de la sardina crinuda más 1.5 µl de buffer de siembra y gel red. Donde se puede observar la calidad de ADN. El marcador de peso molecular indica un rango de entre 100 y 15,000 pares de bases sembrado siempre en el primer carril en los pozos superiores e inferiores.....60

**Figura 18.** Electroforesis en gel de agarosa 1%. En cada pozo se sembraron 5µl de ADN extraído pre y post limpieza con perlas, más 1.5 µl de buffer de siembra y gel red. El cual permite observar la mejora en la calidad del producto de extracción. El marcador de peso molecular indica un rango de entre 50 y 10,000 pares de bases sembrado siempre en el primer carril en los pozos superiores e inferiores.....61

**Figura 19.** Electroforesis en gel de agarosa 1%. En cada pozo se sembraron 5µl de ADN digerido de la sardina crinuda más 2µl de buffer de siembra y gel red. El marcador de peso molecular indica un rango de entre 50 y 10, 000 pares de bases sembrado siempre en el primer carril en los pozos superiores e inferiores.....63

**Figura 20.** Electroforesis en gel de agarosa 1%. En cada pozo se sembraron 5µl de ADN ligado más 2µl de buffer de siembra y gel red. Los carriles 8 y 9 de los carriles inferiores son los controles + y -. El marcador de peso molecular indica un rango de entre 50 y 10, 000 pares de bases sembrado siempre en el primer carril en los pozos superiores e inferiores..... 65

**Figura 21.** Modelo de distribución espacio-temporal de la hipótesis de tres stocks de sardina crinuda (*O. libertate*). La línea gruesa negra representa el stock de B = Bahía de Magdalena, la gruesa línea gris representa el stock de G = Guaymas; y la

línea gruesa gris pálida representa el stock de M = Mazatlán. Los tamaños de las flechas no representan las intensidades de la corriente, ni los movimientos de las poblaciones, solo son indicativos de la dirección principal..... 71

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Primers diseñados para amplificar la Región Control del ADNmt de <i>Opisthonema libertate</i> .....	34
<b>Tabla 2.</b> Matriz de asignación (%) generada a partir del CVA para la forma del cuerpo. Los renglones representan los grupos originales y las columnas los grupos sugeridos por el modelo. La diagonal, representa los individuos correctamente identificados.....	46
<b>Tabla 3.</b> Matriz de asignación (%) generada a partir del CVA para la forma del otolito. Los renglones representan los grupos originales y las columnas los grupos sugeridos por el modelo. La diagonal, representa los individuos correctamente identificados.....	50
<b>Tabla 4.</b> Medidas de la diversidad genética de <i>O. libertate</i> en el Pacífico Oriental, incluyendo el número de individuos ( $n$ ), número de haplotipos mitocondriales ( $nh$ ), diversidad haplotípica ( $h$ ), diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), y desviación estándar ( $DE$ ). .....	52
<b>Tabla 5.</b> Matriz de valores pareados de $\Phi_{ST}$ de las secuencias de ADNmt de <i>O. libertate</i> en el Pacífico Oriental.....	53
<b>Tabla 6.</b> Valores de la distribución de diferencias pareadas entre secuencias de <i>O. libertate</i> en el Pacífico Oriental.....	56
<b>Tabla 7.</b> Valores de la cuantificación con Qubit del producto de la extracción post limpieza.....	62
<b>Tabla 8.</b> Valores de la cuantificación con Qubit del producto de la digestión.....	64
<b>Tabla 9.</b> Valores de la cuantificación con Qubit del producto de la ligación.....	66
<b>Tabla 10.</b> Distribución del agrupamiento ( <i>pool</i> ).....	67
<b>Tabla 11.</b> Valores de la cuantificación con Qubit del producto del agrupamiento.....	68
<b>Tabla 12.</b> Diversidades haplotípicas y nucleotídicas registradas en cupleidos....	75

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Protocolo de extracción de ADN con el kit e Qiagen.....	111
<b>Anexo 2.</b> Protocolo de extracción de ADN con el kit Wizard.....	113
<b>Anexo 3.</b> Protocolo purificación de PCR AgentCourt AMPure Xp.....	115
<b>Anexo 4.</b> Protocolo para cuantificar fluorometría ( <i>Qubit dsDNA HS Assay Kits</i> ).....	117
<b>Anexo 5.</b> Frecuencias haplotípicas de <i>O libertate</i> en los cinco sitios de muestreo del Pacífico Oriental.....	120
<b>Anexo 6.</b> Productos de investigación.....	126

## GLOSARIO

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico. Cualquiera de los ácidos nucleicos que dan desoxirribosa como producto de hidrólisis

**Alelo:** Una de dos o más formas alternativas de un gen, cada uno con una secuencia de nucleótidos única.

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

**Corrección de Bonferroni:** Procedimiento no paramétrico el cual es empleado para corregir el error tipo I (rechazar una hipótesis nula verdadera) cuando se realizan múltiples pruebas o comparaciones.

**Distancia Procrustes:** Es la sumatoria al cuadrado de las diferencias cuadráticas entre la posición de las marcas en dos configuraciones superpuestas óptimamente sobre el tamaño del centroide del objeto en análisis. Esta es la distancia que define la medida (i.e. el tamaño) en el espacio de forma de Kendall (ver Espacio de Kendall).

**Distancias de Mahalanobis:** Medida de distancia introducida por Mahalanobis en 1936. Medida de similitud entre dos variables aleatorias multifactoriales.

**Diversidad Genética:** Es el grado de variación genética en una población, especie o entre un grupo de especies medido en heterocigosidad, diversidad alélica o heredabilidad.

**Diversidad haplotípica ( $h$ ):** Es equivalente a la heterocigosidad esperada para datos diploides. Mide la probabilidad de que dos haplotipos seleccionados al azar en una muestra sean diferentes.

**Diversidad nucleotídica ( $\pi$ ):** Mide la probabilidad de que dos nucleótidos homólogos seleccionados al azar sean diferentes.

**Estructura genética poblacional:** Ocurre cuando en dos o más sitios recolectados presentan un grado de diferenciación genética tal que se consideran como sub poblaciones diferentes.

**Fenotipo:** La expresión del genotipo en un determinado ambiente. Características observables de un organismo (color de pelo, piel, etc.). Los rasgos fenotípicos incluyen rasgos tanto físicos como conductuales.

**Gen:** Unidad física y funcional de la herencia que se pasa de padres a hijos. Los genes están compuestos por ADN y la mayoría de ellos contiene la información para elaborar una proteína específica.

**Genotipo:** Composición genética de un organismo.

**Haplotipo:** Constitución genética de un cromosoma individual. Es Una combinación de alelos ligados a múltiples loci que se transmiten juntos.

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

**Heterogeneidad:** Cualidad de una cosa heterogénea o formada por elementos de distinta clase o naturaleza.

**Índice de fijación FST:** Proporción de la endogamia total en una población como consecuencia de la diferenciación entre sub poblaciones.

**Metapoblación:** se define como "una población de poblaciones" o bien como "un grupo de varias poblaciones locales (o subpoblaciones) que están ligadas por los procesos de inmigración y emigración"

**Morfometría Geométrica:** Es una herramienta de análisis estadísticos que permite abstraer la forma de los organismos mediante el uso de "marcas o puntos", donde la información sobre el tamaño, la posición y la orientación se ajustan para obtener la información de la "forma" en un contexto matemáticamente analizable



**Población:** Grupo de organismos de la misma especie que habitan en un área geográfica restringida y que tienen la capacidad de reproducirse con cualquier otro miembro de dicho grupo.

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

**Polimorfismo:** Presencia de diferentes variantes alélicas para un mismo locus en una muestra poblacional con una frecuencia significativa. Se dice que un locus es polimórfico cuando presenta al menos dos alelos.

**Prueba F-Procrustes:** Procedimiento estadístico empleado para calcular la distancia Procrustes parcial o completa entre la media de dos grupos y un estimado de la varianza en esta distancia obtenido a través de re-muestreos

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** Método utilizado para realizar copias de segmentos específicos de ADN (amplificar). El ADN es desnaturalizado por temperaturas elevadas, se añaden regiones flanqueantes (*primers*) y la secuencia es copiada por medio de una enzima polimerasa termoestable (*Taq*). Este proceso se lleva a cabo en una serie de 30 a 40 ciclos en un termociclador. 30 ciclos producirán un factor de amplificación de 100 millones de copias.

**Score:** Valor que representa la combinación lineal de un juego de variables observadas. Los coeficientes de la combinación lineal que son usualmente determinados por el cálculo de una matriz.

**Sitios parsimoniosos:** Un sitio es parsimonioso-informativo sí contiene al menos dos tipos de nucleótidos (ó aminoácidos) y en al menos dos de ellos ocurre con una frecuencia de dos.

**Stock:** Sí bien existen diversas definiciones de *stock*, en pesquerías *stock* es un grupo de individuos que se encuentran en un área específica en un tiempo específico, sin importar su integridad genética. Por otra parte, desde el punto de vista genético, se considera al *stock* como una unidad aislada reproductivamente y genéticamente diferenciada de otras, en donde unos cuantos migrantes por generación son suficientes para evitar la diferenciación genética.

**Sustitución nucleotídica:** Reemplazo de un nucleótido en una secuencia del ADN por otro nucleótido o reemplazo de un aminoácido en una proteína por otro aminoácido

## RESUMEN

La sardina crinuda *Opisthonema libertate* (Günther, 1867) es una especie de ambiente tropical que se distribuye desde el norte de Perú hasta la costa occidental de la península de Baja California y algunas localidades del Golfo de California. A la fecha, la mayor parte de los estudios de esta especie se han enfocado a proporcionar datos biológicos-pesqueros. Sin embargo a pesar de su importancia económica pocos esfuerzos han sido conducidos para estudiar la estructura poblacional. En el presente estudio, se llevó a cabo un análisis de morfometría geométrica basado en la forma del cuerpo de los individuos y en la forma de los otolitos *sagitta* procedentes de individuos capturados en el noroeste de México, y un análisis genético de organismos provenientes de México, El Salvador, Costa Rica, con la intención de examinar la variación fenotípica y la estructura poblacional de la sardina *O. libertate*. El análisis morfométrico se basó en la comparación multivariada de 13 puntos de referencia para representar la forma del cuerpo y 20 puntos de referencia para representar la forma del otolito. Todas las medidas fueron sometidas a un análisis ajuste de Procrustes Generalizado para eliminar el efecto de la talla, posición y rotación y poder comparar solo las variables de la forma de ambas estructuras. El análisis genético se basó en la revisión de 125 secuencias parciales de la región control del ADNmt. Las secuencias fueron utilizadas para estimar medidas de diversidad genética, diferenciar poblaciones a partir de estimadores análogos de  $F_{st}$  y análisis de historia demográfica. A partir del análisis morfométrico se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $P = < 0.01$ ), confirmando diferencias fenotípicas espacio-temporales en la forma de cada estructura (cuerpo y otolito). Los valores de Lambda de Wilk's ( $\Lambda$ ), las distancias de Mahalanobis y las pruebas F-Procrustes identificaron tres grupos fenotípicos lo que sugiere la presencia del al menos tres *stocks* de sardina crinuda en el noroeste del Pacífico mexicano. Estos grupos estuvieron asociados a los siguientes sitios de pesca: 1. Bahía Magdalena, B.C.S.; 2. Guaymas, Sonora y 3. Mazatlán, Sinaloa. Aunque ambas estructuras soportaron conclusiones similares, la forma del cuerpo permitió una mejor diferenciación de los grupos. El análisis

genético no detectó evidencia de una estructura genética que sugiera el establecimiento de diferentes poblaciones de sardina crinuda a lo largo del Pacífico Oriental. El AMOVA indicó que las diferencias genéticas fueron significativamente diferentes de cero ( $P= 0.008$ ) y los resultados obtenidos del análisis de mezcla genética, basada en un agrupamiento bayesiano, sugirió que las 125 secuencias de la región control debería integrar un solo grupo, y en consecuencia soportar la ausencia de una especie estructurada en poblaciones. Una prueba de aislamiento por distancia mostró una correlación significativa entre la distancia genética y la distancia geográfica; aunque el valor de  $r$  y la dispersión de los datos no sugieren una fuerte relación entre ambas variables. El análisis filogeográfico no mostró un claro patrón y la distribución de diferencias pareadas entre pares de secuencias de ADNmt mostró un patrón unimodal para las cinco áreas muestreadas, indicando una expansión demográfica. A un cuando se encontró evidencia de distintos morfotipos de sardina crinuda en el noroeste del Pacífico mexicano, los datos moleculares no soportaron un patrón claro de estructuración genética, soportando la presencia de una población panmíctica con diferentes expresiones fenotípicas a lo largo de su área de distribución.

## ABSTRACT

The Pacific thread herring *Opisthonema libertate* (Günther, 1867) is a species of tropical environment that is distributed from the western coast of the Baja California Peninsula and some locations Gulf of California, Mexico, to northern Peru. Almost all studies about this specie have focused on providing biological-fishery data. However, few efforts have been made to study the population structure, despite its economic importance. In the present study we carried out a geometric morphometrics analysis based in the body and otoliths shape from individual caught in the northwest of Mexico, and a genetic analysis from individual obtained of Mexico, El Salvador and Costa Rica, with the purpose to evaluate the phenotypic variation and the population structure of Pacific thread herring *Opisthonema libertate*. The morphometric analysis was based in the multivariate comparison of 13 landmarks to represent the body shape, and 20 landmarks to represent the otolith shape. All the measurements were subjected to an adjustment analysis of Generalized Procrustes to eliminate the effect of size, position and rotation and to be able to compare only the variables of the shape of both structures. The genetic analysis was based in 125 partial sequences from mtDNA control region. The sequences were used to estimate measures of genetic diversity, differentiate populations from analogous  $F_{st}$  estimators and demographic history analysis. From the morphometric analysis, statistically significant differences were obtained between the groups ( $P = <0.01$ ), confirming spatio-temporal phenotypic differences in the shape of each structure (body and otolith). Utilizing the value of Wilk's Lambda, Mahalanobis distances and the test F-Procrustes was identified up to three *stocks* the Pacific thread herring in the Mexican Pacific Northwest, these groups were associated to the following fishing sites: 1. Bahía Magdalena, B.C.S.; 2. Guaymas, Sonora and 3. Mazatlán, Sinaloa. Although both structures supported similar conclusions, the body shape allowed a better differentiation of the groups. The evidence above a population structure was not detected that suggests the establishment of different Pacific thread herring populations throughout Eastern Pacific. The AMOVA indicated genetic differences significantly different from zero ( $P$

= 0.008), and the results obtained from the genetic mix analysis, based on a Bayesian grouping, suggested that the 125 sequences of the control region should integrate a single group and consequently support the absence of a species structured in populations. A distance isolation test showed a significant correlation between genetic distance and geographic distance; although the value of  $r$  and the dispersion of the data do not suggest a strong relationship between both variables. The phylogeographic analysis did not show a clear pattern and the distribution of paired differences between pairs of mtDNA sequences showed a unimodal pattern for the five areas sampled, indicating a demographic expansion. When there was evidence of different morphotypes of Pacific thread herring in the Mexican Pacific Northwest, the molecular data did not support a clear pattern of genetic structuring, supporting the presence of a panmictic population with different phenotypic expressions throughout its distribution area.

## INTRODUCCIÓN

El término genérico sardina crinuda hace referencia a las cinco especies del género *Opisthonema*. Son peces marinos que se encuentran sólo en aguas tropicales y subtropicales cerca de la costa del continente americano (Berry & Barrett, 1963). En el Atlántico, se localiza una de estas especies, *Opisthonema oglinum* (Lesueur, 1818), que habita desde el sur de Brasil (28° S) hasta el sur del Golfo de Maine, en la costa noroeste de Norteamérica (42° N), incluyendo el Golfo de México y Caribe. En las costas del Pacífico, se localizan las restantes cuatro especies: *Opisthonema libertate* (Günther, 1867), *O. bulleri* (Regan, 1904), *O. medirastre* (Berry & Barret, 1963), y *O. berlangai* (Berry & Barret, 1963); las tres primeras distribuidas desde el norte de Perú hasta la costa occidental de la península de Baja California y Golfo de California, y la última confinada a los alrededores de las islas Galápagos (Berry & Barret, 1963). Basado en el número y características de las branquiespinas del segmento ceratobranquial del primer arco branquial, en la forma del cuerpo y en datos genéticos, Pérez-Quiñonez *et al.* (2017) soportaron la presencia de *O. libertate*, *O. bulleri*, y *O. medirastre* como integrantes del complejo *Opisthonema* que explota la pesquería de pelágicos menores en el Pacífico Oriental mexicano.

Morfológicamente, estas especies presentan como característica distintiva una prolongación filamentosa del último radio de la aleta dorsal (Fig. 1). Se alimentan principalmente de fitoplancton (diatomeas y dinoflagelados) y en algunas ocasiones de zooplancton como copépodos y anfípodos (Gallardo-Cabello *et al.*, 1991).



**Figura 1.** Ejemplar de sardina crinuda *Opisthonema libertate*.

La pesca del recurso *Opisthonema* se realiza en aguas cercanas a la costa. Constituye un importante recurso económico en México, debido a sus significativos volúmenes de captura (3,387,012 t captura total durante el período 1972-2016), los cuales representan aproximadamente el 20% de la pesca total de pelágicos menores (Acal, 1990; Névarez-Martínez *et al.*, 2006; Jacob-Cervantes, 2010; Pérez-Quiñonez, 2017;), y soportan una de las pesquerías más estables en México (Acal, 1990; Nevárez-Martínez, *et al.*, 2006; Jacob-Cervantes, 2010; SAGARPA-CONAPESCA, 2013). Aunque los registros de captura oficiales no discriminan la pesca por especie, los estudios de Sokolov & Wong (1972), Ruiz & Lyle (1992), Jacob-Cervantes *et al.* (2007), Vega-Corrales (2010) y Pérez-Quiñonez (2014) indican que, *O. libertate* es la especie que aporta los mayores volúmenes a la captura con un 78%, *O. bulleri* 16% y *O. medirastre* 5% (Jacob-Cervantes, 2010). La pesquería de este recurso solo está regulada por un tamaño mínimo de captura de 160 mm y solo la situación de unidades de pesca (*NOM-003-PESC-1993* en Diario Oficial de la Federación, 1993).

Actualmente el Consejo de Administración Marina (MSC, por sus siglas en inglés) incluye a la sardina crinuda en especies de bajo nivel trófico (LTL, por sus siglas en inglés) dado a su importancia ecológica y económica (e.g. Cury *et al.*, 2000). Debido a su importancia ecológica, la explotación insostenible de las poblaciones de peces como la sardina puede afectar la red alimentaria marina (e.g. causando disminuciones en las poblaciones de aves marinas y mamíferos marinos). La intención de los requisitos de MSC sobre el manejo de las poblaciones consideradas como LTL se centra en limitar los impactos en el ecosistema causados por su captura comercial (Marine Stewardship Council, 2014). Una distinción principal dentro de los requisitos del MSC es la intención de que todas las especies consideradas como LTL deben evaluarse en función de su importancia potencial para el ecosistema al solicitar la certificación según el estándar MSC, pero los requisitos específicos de gestión superior solo se aplican a aquellas reservas reconocidas como "LTL clave" incluida la sardina crinuda.



El MSC requiere que la actividad de pesca en las diferentes especies explotadas se evalúe a un nivel que sea sostenible para el stock. Sin embargo, la aplicación del concepto de "stock" puede variar según el conocimiento disponible y la complejidad en la gestión. Particularmente, un *stock* pesquero puede ser definido como un grupo de organismos de una especie, que tienen los mismos indicadores de mortalidad y características fisiológicas y habitan en un área geográfica particular (Sparre *et al.*, 1989). De esta manera pueden ser administrados como una unidad independiente. En algunos casos, las poblaciones pueden estar estructuradas como "metapoblaciones": que son sistemas en los que las subpoblaciones habitan parches de hábitat discretos y donde la dispersión entre parches no es tan baja como para negar una conectividad demográfica significativa, ni tan alta como para eliminar cualquier independencia de la dinámica de la población local. En estos casos, el manejo debe considerar la conectividad entre los componentes de la metapoblación que define la dinámica subyacente de la fuente y el sumidero. El grado de conectividad entre las subpoblaciones dicta el manejo específico requerido para lograr una captura sostenible. En los casos en que las pesquerías se dirigen a una mezcla de poblaciones locales que no se pueden separar claramente, un enfoque de manejo práctico puede ser considerar la metapoblación completa como el stock unitario.

Por lo tanto, las evaluaciones pesqueras deben incluir información detallada, aclarando si el stock unitario se basa en uno o más poblaciones locales o en una metapoblación en su conjunto. Se deben proporcionar detalles, explicando:

En el caso de que el manejo se base en toda la metapoblación, se espera que se evite el agotamiento local.

Si se basa en una o más poblaciones locales, ya sea que se crea que éstas son fuentes o sumideros, la relación entre las subpoblaciones y cómo la administración evita la sobreexplotación dentro de las poblaciones locales seleccionadas.

El MSC de acuerdo al grado de conectividad y la estrategia de captura del stock, describe el nivel de evaluación y los componentes de la estrategia de captura de un stock; ya sea de una sola población (caso A) y para tres formas diferentes de

metapoblaciones (casos B, C y D). De acuerdo a estos puntos descritos por parte del MSC la sardina crinuda *O. libertate* corresponde una forma de metapoblación D, considerándose la estructura del stock como poblaciones locales con alta conectividad; descritas por ser una especie que posee: máxima conectividad, la metapoblación es panmíctica (el apareamiento es aleatorio dentro de toda la metapoblación), las subpoblaciones son arbitrarias y con un *pool* larvario bien mezclado. La pesquería del recurso sardina crinuda debe ser manejada como una metapoblación total (stock unitario), ya que la pesca en las poblaciones locales afecta la dinámica de las poblaciones vecinas.

Muchos aspectos en el manejo de las pesquerías a nivel mundial se basan en la identificación precisa de las especies objetivo de la pesca; con el propósito de mantener registros exactos que ayuden con el manejo del recurso pesquero. Tradicionalmente el manejo científico de las pesquerías se basa en modelos de evaluación de *stocks* para predecir la variabilidad en las relaciones *stock*-reclutamiento y con ello determinar límites de captura sostenibles (Myers, 2001; Worm *et al.*, 2009; Beddington *et al.*, 2007). Sin embargo, los métodos genéticos también pueden proporcionar datos fundamentales para un mejor manejo pesquero (Waples *et al.*, 2008). El nexo entre la genética y el manejo pesquero se ha centrado principalmente en el uso de herramientas genéticas para definir unidades de población (*stock*) y en cómo incorporar de una mejor manera esa información en las evaluaciones de las poblaciones explotadas (Hauser & Carvalho, 2008; Waples *et al.*, 2008; Waples & Naish, 2009).

A pesar de la capacidad demostrada por los datos genéticos para delimitar las poblaciones con precisión, las unidades de manejo se basan principalmente en unidades administrativas, que a menudo no están estrechamente relacionadas con la biología de la población (Osio *et al.*, 2015; Borja *et al.*, 2016). Esto contradice la base de la ciencia de la pesca por la cual el rendimiento máximo sostenible (RMS) solo puede lograrse mediante el manejo eficiente de poblaciones distintas (Utter, 1991; Waples *et al.*, 2008; Osio *et al.*, 2015).

El análisis genético nunca ha estado mejor equipado para ayudar con el manejo de las pesquerías. De manera general, la genética se utiliza para proporcionar información de referencia sobre la naturaleza de los recursos pesqueros o el medio ambiente (e.g. identificando estructura por *stock*) (Rubio-Castro *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2015). Sin embargo, cada vez más, la genética en la pesca se utilizará como herramienta de monitoreo: por ejemplo, la estimación de la abundancia y el número de reproductores a través de la recuperación de marcas genéticas, la determinación de la procedencia del producto y la detección de patógenos (Ovenden *et al.*, 2013).

La genómica en el campo del manejo pesquero, ayuda en la definición de las unidades de manejo, cuantifica el alcance de la divergencia adaptativa y la conectividad entre ellas, y permite realizar análisis de *stocks* mixtos con una resolución sustancialmente mayor (Yañez *et al.*, 2015). Las herramientas derivadas de la genómica también pueden mejorar nuestra comprensión de cómo los organismos acuáticos se adaptan y responden a sus entornos desde el nivel de la especie hasta el nivel de la comunidad, y mejorar nuestra capacidad para monitorear la variación ambiental biológica o las especies explotadas. Al igual que con las tecnologías existentes que se han aplicado ampliamente en otros campos, el riesgo no estará en la metodología en sí, sino en la adaptación de esa tecnología al contexto de la gestión de la pesca (Ovenden *et al.*, 2013).

Los esfuerzos de investigación en la sardina crinuda se han centrado principalmente en determinar los parámetros biológicos-pesqueros (Acal, 1990; Jacob-Cervantes *et al.*, 1992; Gallardo-Cabello *et al.*, 1993; Castro-González *et al.*, 1997; Jacob-Cervantes, 2010; Jacob-Cervantes & Aguirre-Villaseñor, 2014), de tal manera que aún es indispensable obtener mayor información enfocada a soportar un buen manejo de su pesquería. Es importante conocer con mayor precisión a lo largo de su área de distribución la actividad reproductiva, las tasas de crecimiento poblacional, las tasas de mortalidad, la edad de la primera madurez y los índices de reclutamiento. Esta información toma relevancia cuando es definida bajo un esquema que considere la existencia de poblaciones genéticas con la intención de tener mejores elementos que permitan definir las unidades de manejo.

Los mecanismos de diferenciación y conectividad de las poblaciones de peces dentro del medio marino son complicados, y para muchas especies es necesario comprender mejor los factores que restringen y promueven el intercambio de individuos (Kerr *et al.*, 2017). Recientemente, se han realizado avances trascendentales en la investigación para identificar y establecer poblaciones de peces. No obstante, dichas investigaciones han demostrado que los peces marinos con poca estructura poblacional y características genéticas y fenotípicas esencialmente homogéneas han sido la excepción pero no una regla (Waples & Gaggiotti, 2006; Reiss *et al.*, 2009; Ames & Lichter, 2013; Ciannelli *et al.*, 2013); dejando claro que la estructura poblacional de las especies marinas cae a lo largo de un continuo, desde poblaciones panmíticas (e.g. anguila americana *Anguilla rostrata* (Lesuer, 1817), Côte *et al.*, 2013; anguila europea *Anguilla anguilla* (Linnaeus, 1758), Als *et al.*, 2011) hasta numerosas poblaciones distintas (e.g. arenque *Clupea harengus* (Linnaeus, 1758), Ruzzante *et al.*, 2006; Hatfield *et al.*, 2007; Geffen *et al.*, 2011); con la mayoría de las especies presentando una estructura compleja (e.g. jurel *Trachurus trachurus* (Linnaeus, 1758), Abaunza *et al.*, 2008; risco *Sebastes mentella* (Travin, 1951), Cadrin *et al.*, 2010; bacalao *Gadus morhua* (Linnaeus, 1758), Kelly *et al.*, 2009).

Un dilema en la investigación de la dinámica poblacional pesquera es la necesidad de equilibrar los modelos poblacionales a gran escala con las políticas de gestión espacial de escala fina que pretenden evitar el agotamiento y erosión de la estructura poblacional. Actualmente, ha habido un aumento en la aplicación de modelos de simulación para evaluar enfoques alternativos para abordar el manejo de unidades biológicas y *stocks* pesqueros (e.g. Kell *et al.*, 2009; Cope & Punt, 2011; Ying *et al.*, 2011; Kerr *et al.*, 2014). Algunos de estos modelos de estructura poblacional en poblaciones de peces son el de *stocks* mixtos; (e.g. Atún rojo del Atlántico *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758), Kerr *et al.*, 2017); un solo *stock* panmítico (e.g. Arenque del mar del norte *Clupea harengus*, Kerr *et al.*, 2014, 2017) y *stocks* distintos (e.g. Bacalao del Atlántico *Gadus morhua* Kerr *et al.*, 2014, 2017). Cada uno de ellos incorporando en sus evaluaciones procesos claves de la biología de la especie (e.g. distribución, periodos y sitios de desove). El desarrollo de

modelos operativos espacialmente explícitos que incorporan estructura y movimiento de la población puede proporcionar una base para determinar cómo ignorar la estructura espacial puede afectar negativamente a todo el recurso y la pesquería por ejemplo, al comparar los marcos de evaluación y manejo que utilizan diferentes supuestos sobre la estructura y la mezcla de la población (Kerr & Goethel, 2014; Goethel *et al.*, 2016). Por lo tanto, el resultado proporcionado por los modelos de simulación puede ser una herramienta invaluable para los órganos de administración, ya que proporcionan información adicional sobre las consecuencias a corto y largo plazo de sus decisiones sobre el recurso (Kerr *et al.*, 2017).

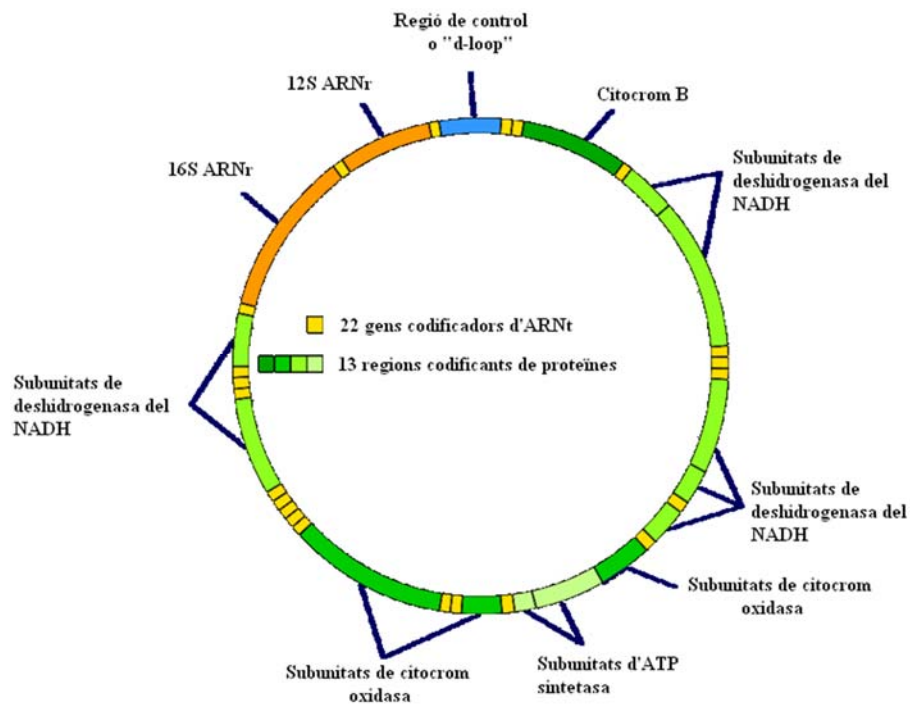
El entorno en el que viven las poblaciones marinas ofrece una amplia variedad de medios para dispersar a los individuos dentro y entre las poblaciones generando poblaciones genéticamente homogéneas. A pesar de ello algunas especies muestran cierto grado de estructura poblacional, la cual puede estar dada por la interacción de una gran variedad de factores no excluyentes unos de otros. Éstos están relacionados con la presencia de barreras ambientales, procesos históricos, historias de vida y distancia geográfica entre subpoblaciones (Tripp-Valdez, 2009). Particularmente, *Opisthonema libertate* está asociada a factores que pueden reducir la diferenciación genética entre los individuos que la integran. Entre éstos se encuentra la elevada capacidad reproductiva, el gran tamaño poblacional (Tripp-Valdez, 2009) y la alta capacidad de dispersión, sobre todo en su etapa más temprana de historia de vida (huevo o larva, un periodo larval de 48 días) (Martínez-Pecero, 2003; Cowan & Sponaugle, 2009), además de las etapas de juvenil y adulto. De esta manera, un factor relevante que influye en un elevado grado de homogenización genética en especies pelágicas como *O. libertate* es su capacidad de dispersión, ya sea por transporte pasivo de las larvas o por migración activa de los adultos (Rocha-Olivares *et al.*, 2006; González & Zardoya, 2007). Las especies con mayor capacidad de dispersión, por lo general, muestran niveles más altos de flujo genético y por lo tanto tendrán niveles bajos de diferenciación genética a lo largo de su área de distribución (Ward, 2006). 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. Cuando la dispersión se combina con factores como las tasas de crecimiento de la población, el flujo de genes y, en última instancia, la persistencia de las especies que conducen a la supervivencia de los organismos dispersos, surge el concepto de conectividad de la población (Cowan & Sponaugle, 2009) un concepto basado en la dispersión de individuos entre poblaciones discretas, pero que puede tener significados e implicaciones muy diferentes dependiendo de cómo se mida (Lowe & Allendorf, 2010). Con la combinación de métodos genéticos y demográficos pueden proporcionar la información sobre conectividad demográfica en la cual se debe de considerar los efectos de la dispersión en el crecimiento de la población y sus tasas vitales; no solo la dispersión de los individuos (Lowe & Allendorf, 2010).

Las técnicas moleculares se han hecho cada vez más accesibles, lo cual ha permitido que un mayor número de grupos taxonómicos puedan ser estudiados bajo este enfoque. La genética molecular como herramienta para estimar el grado de aislamiento reproductivo entre poblaciones ha permitido tener un acceso de manera 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 diferente origen y naturaleza. Los que son basados en el ADN nuclear (ADNn) son de herencia biparental mientras que los fundamentados en el ADN mitocondrial (ADNmt) son heredados vía uniparental (Kaneda *et al.*, 1995) y la elección de los mismos dependerá de la información que se quiera obtener. Actualmente existe un gran número de marcadores, entre los cuales los más utilizados en estudios poblacionales son las secuencias variables del ADNmt y los microsatélites (Rocha-Olivares *et al.*, 2003, 2006; McDowell & Graves, 2008; García-Rodríguez *et al.*, 2011; Rubio-Castro *et al.*, 2015). Con el avance de la tecnología de secuenciación de última generación, recientemente los estudios poblacionales han incorporado a los marcadores denominados *Single Nucleotide Polymorphism* (SNPs por sus siglas

en inglés) o polimorfismos de un solo nucleótido (Corander *et al.*, 2013; Westgaard *et al.*, 2017).

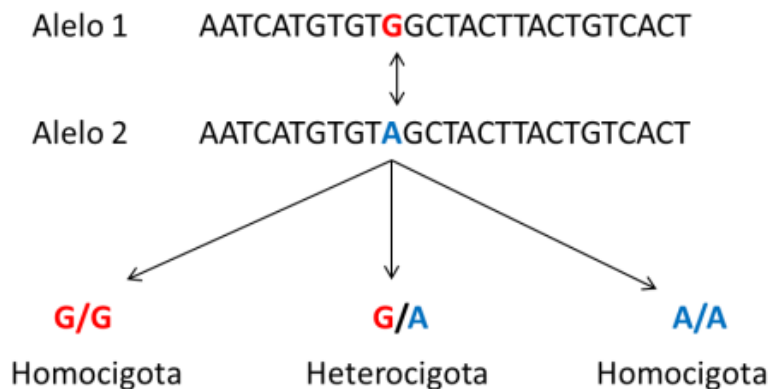
Debido a su alta tasa de sustitución nucleotídica, herencia clonal matrilineal y ausencia de recombinación, el ADN mitocondrial ha adquirido un papel preponderante en estudios poblacionales (Rocha-Olivares & Sandoval-Castillo, 2003, Rubio-Castro *et al.*, 2015). La molécula del ADNmt (Fig. 2) existe en un alto número de copias en las mitocondrias de las células y tiene una estructura circular. La región control es el único segmento no codificante y el que presenta la mayor tasa de evolución molecular del ADNmt (Brown *et al.*, 1986); en consecuencia es uno de los principales fragmento de este genoma empleado en análisis poblacionales.



**Figura 2.** Representación de la molécula del ADN mitocondrial.

Por su parte, los SNPs se definen como un locus genómico (posición genética) donde existen dos o más bases nucleotídicas alternativas con frecuencias apreciables en la población ( $> 1\%$ ) (Risch, 2000); es decir, aquellos que se

originan por una simple mutación que cambia un nucleótido por otro (Fig. 3). Los SNPs representan actualmente los marcadores moleculares con mayor potencial para evaluar la variabilidad genética, debido al desarrollo del secuenciado de última generación (NGS, por sus siglas en inglés), a su elevada frecuencia en el genoma y la capacidad de poderlos caracterizar en regiones codificantes (De Wit *et al.*, 2012). Un dato interesante de los SNPs es que a diferencia de otro tipo de marcadores nucleares como los microsatélites, presentan una tasa menor de mutación; sin embargo, el notable cambio operado con SNPs respecto a los microsatélites es que la automatización que este marcador puede permitir, facilita la lectura de centenares de millares de marcadores por cada análisis resultando más complejo el análisis bioinformático. Considerando lo anterior, los SNPs son ampliamente útiles en estudios de genética de poblaciones ya que permiten explicar fenómenos biológicos relacionados con procesos de microevolución (Checa-Caratachea, 2007).



**Figura 3.** Polimorfismo de Nucleótido Simple (SNP) y sus genotipos posibles.

Una técnica empleada en descubrir o analizar cientos o miles de SNP en un solo, simple y efectivo costo experimental (Luikart *et al.*, 2003; Davey *et al.*, 2011), ha sido la técnica Sitios de Restricción Asociado a Secuencias (por sus siglas en inglés RADseq) la cual se ha considerado entre los más importantes avances científicos en la última década (Davey & Blaxter, 2010). Además de la técnica original hecha

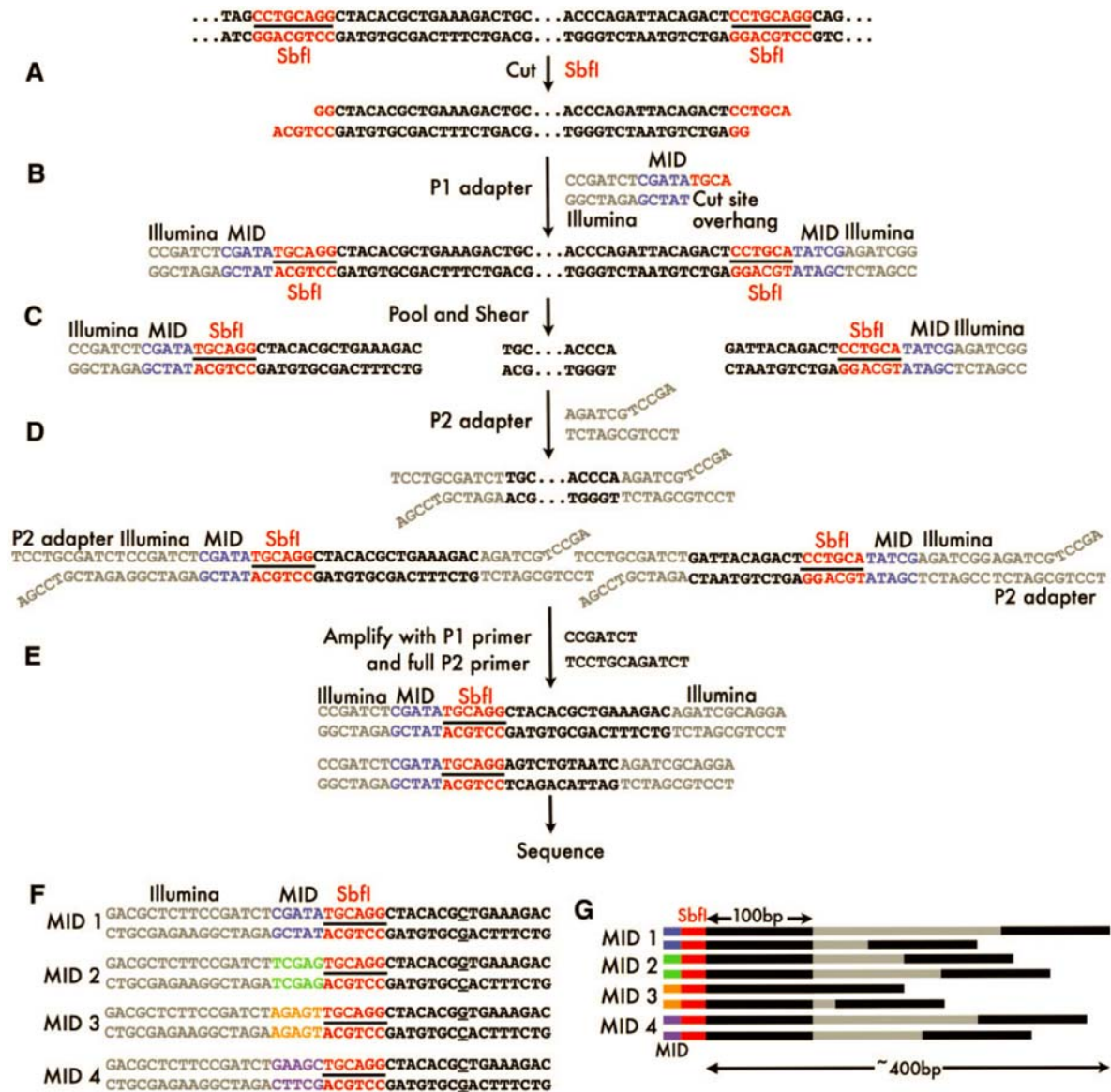


por Bair *et al.* (2008) RADseq “original”, se han desarrollado otras variaciones de la técnica prometiendo incrementar la flexibilidad (e.g. el número de loci por análisis) y reducir el costo y el esfuerzo en sus diferentes aplicaciones. Por mencionar algún ejemplo, Peterson *et al.* (2012) diseñaron la técnica realizando una “doble digestión” (ddRAD-seq) que incrementa la eficiencia en la obtención de SNPs.

El protocolo original de RADseq (Miller *et al.*, 2007; Bair *et al.*, 2008) combina dos simples técnicas de biología molecular con el secuenciador Illumina: el uso de enzimas de restricción para cortar ADN en fragmentos (como para RFLPs y AFLPs), y el uso de identificador molecular (MID) que se une a la lectura de la secuencia de un organismo particular (Fig. 4).

El ADN de algún organismo es cortado con la enzima de restricción elegida, produciendo un conjunto de fragmentos con extremos cohesivos (Fig. 4a). Al ser secuenciada en una máquina Illumina, estos fragmentos deberían estar ligados a los adaptadores que se unirán con Illumina. RADseq utiliza adaptadores modificados en Illumina que permiten la unión y la amplificación solamente de los fragmentos de sitios de restricción. Los fragmentos con extremos cohesivos son ligados con el adaptador P1 que contiene un complemento de extremos cohesivos (por ejemplo, TGCA para la enzima Sbf1) y un MID, una secuencia corta que identificará de manera exclusiva al individuo (Fig. 4b). Los individuos también pueden ser agrupados de acuerdo a cualquier criterio deseable, antes de la digestión por enzimas y la ligación con P1 (un enfoque similar al análisis de segregantes agrupados). Los fragmentos de restricción marcados a partir de un número de individuos son agrupados, y enseguida distribuidos aleatoriamente para generar fragmentos con una longitud promedio de unos cientos de pares de bases (Fig. 4c). La distribución de los fragmentos es ligada a un segundo adaptador P2 (Fig. 1d) y amplificado por PCR utilizando los primers P1 y P2 (Fig. 4e). El adaptador P2 posee una estructura divergente, por lo que solo se unirá con el adaptador P1, solo así se llevará a cabo la total amplificación. Esto asegura que todos los fragmentos amplificados contengan el adaptador P1 y MID, el sitio de restricción parcial, unos cientos de bases de la secuencia marcada y un adaptador P2. Esta distribución,

fragmentos de secuenciado listo son de tamaño (aproximadamente de 200-500 pb el tamaño de los fragmentos son aislados) y esta librería RADseq es secuenciada en la plataforma Illumina (Davey & Baxter, 2010).



**Figura 4.** El proceso de RADseq. (A) El AND genómico es cortado con la enzima de restricción elegida (enzima SbfI en este ejemplo). (B) El adaptador P1 se liga a fragmentos cortados con SbfI. El adaptador P1 se adapta a partir del adaptador de secuenciación Illumina (secuencia completa no mostrada aquí), con el identificador molecular (MID; CGATA en este ejemplo) y aun sitio de corte que sobresale al final (TGCA en este ejemplo). (C) Se agrupan muestras de múltiples individuos y se

fragmentan aleatoriamente todos los fragmentos. Sólo un subconjunto de los fragmentos resultantes contiene sitios de restricción y adaptadores P1. (D) El adaptador P2 es ligado a todos los fragmentos. El adaptador P2 tiene un extremo divergente. (E) Amplificación por PCR con los primers P1 y P2. El adaptador P2 se completará solamente en los fragmentos ligados con adaptador P1, y por lo tanto sólo estos fragmentos serán amplificados completamente. (F) Las muestras agrupadas con diferentes MIDs se separan bioinformáticamente y los SNPs llamados (C/G SNP subrayados). (G) A medida que los fragmentos se cortan al azar, las secuencias finales emparejadas de cada fragmento secuenciado cubrirán una región de 300 ^ 400 pb en dirección del sitio de restricción. (Modificado de Davey & Blaxter, 2010)

Por último, a partir de un enfoque distinto, los análisis de las diferencias morfométricas entre poblaciones resultan de gran interés debido a que pueden ser asociadas a un alto grado de plasticidad fenotípica en relación con las condiciones locales (Doadrio *et al.*, 2002, De La Cruz-Agüero & García-Rodríguez, 2004, Fusco & Minelli, 2010), o si los fenotipos se encuentran bien diferenciados pueden también sugerir la presencia de poblaciones genéticamente estructuradas (García-Rodríguez, 2006). Los métodos morfométricos permiten cuantificar las diferencias en la forma de estructuras anatómicas. Particularmente, la morfometría geométrica ha sido aplicada en estudios con especies de importancia pesquera (De La Cruz-Agüero & García-Rodríguez, 2004; Félix-Uraga *et al.*, 2005; Ramírez-Pérez *et al.*, 2010; García-Rodríguez *et al.*, 2011; Vergara-Solana *et al.*, 2013; Pérez-Quiñonez *et al.*, 2017), evaluando la potencial presencia de *stocks* a través del supuesto basado en que individuos con una alta similitud (morfotipos similares) deberían estar estrechamente relacionados biológica y ecológicamente (Cadrin *et al.*, 2005). Un *stock* fenotípico puede ser definido por similitudes en color, en la tasa de crecimiento, o en algún carácter que lo haga definible e identificable.

A pesar de la gran importancia ecológica y pesquera de la sardina crinuda, es poco lo que se conoce en relación con su estructura poblacional. Los estudios sobre dinámica poblacional, estructura y diversidad genética poblacional son de gran relevancia para el manejo y conservación de las especies (Hoolihan *et al.*, 2004), porque aportan elementos que permiten discriminar y delimitar unidades

poblacionales. De esta manera los estudios morfométricos y 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 analizan las diferencias espaciales de la sardina crinuda *O. libertate* con la finalidad de evaluar la existencia de unidades poblacionales y posibles *stocks*, cubriendo la mayor parte de su área de distribución. En este estudio se abordó un análisis de morfometría geométrica basada en estadística multivariada para el análisis de la covariación de la forma, la cual ha sido previamente empleada para distinguir grupos de peces basados en la forma del cuerpo (Silva, 2003; De La Cruz-Agüero & García-Rodríguez, 2004; Tzeng, 2004; Ibáñez-Aguirre *et al.*, 2006; García-Rodríguez *et al.*, 2011; Vergara-Solana *et al.*, 2013), en la forma del otolito *sagitta* (Campana & Casselman, 1993; DeVries *et al.*, 2002; Félix-Uraga *et al.*, 2005; Stransky *et al.*, 2008; Ramírez-Pérez *et al.*, 2010), o en la forma de ambas estructuras (Vergara-Solana *et al.*, 2013, Pérez-Quiñonez *et al.*, 2017). Además, se emplearon herramientas moleculares basadas en secuencias de la región control del ADN mitocondrial, como han sido empleadas en otras especies de peces pelágicos en México (Domínguez-López *et al.*, 2010; García-Rodríguez *et al.*, 2011; Rubio-Castro *et al.*, 2015; Ramírez-Pérez *et al.*, 2015). Finalmente, se exploró la construcción de una librería genómica para la detección de SNPs con la intención de generar una metodología base para futuros estudios poblacionales de especies pelágicas distribuidas en el Pacífico Mexicano.

## ANTECEDENTES

Uno de los grandes retos dentro del manejo de las pesquerías es la identificación de poblaciones estructuradas, de manera tal que se pueda dar una administración apropiada para cada una de los potenciales *stocks* y evitar un manejo deficiente.

La detección de *stocks* proporciona información relevante para entender la dinámica poblacional, por lo que es de gran interés para fines pesqueros (Begg & Waldman, 1999; Cadrin *et al.*, 2005). Una estrategia utilizada para el reconocimiento de estas unidades de manejo ha sido basada en la utilización de las características morfométricas del cuerpo de los individuos (Cadrin, 2000; Waldman, 2005). Otra mediante datos genéticos, los cual han 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 (Rubio-Castro, 2016). El uso de distintas fuentes (e.g. parámetros poblacionales, datos morfométricos y herramientas moleculares) para la identificación de poblaciones o *stocks* puede proporcionar resultados distintos (García-Rodríguez *et al.*, 2011; Ramírez-Pérez *et al.*, 2015), debido a la distinta naturaleza de los datos y a las diferentes escalas de tiempo en que las diferencias se expresan, pero el combinar distintas fuentes de información permite tener una visión más amplia de la naturaleza y específicamente una mejor comprensión de la estructura y dinámica de una población.

En el pacífico mexicano se han abordado distintos estudios enfocados a determinar la existencia de poblaciones o *stocks* empleando diferentes herramientas. Lecomte *et al.* (2004) mediante secuencias de ADNmt encontraron una alta diversidad genética en la sardina del Pacífico *Sardinops sagax* y en la anchoveta *Engraulis mordax* pero ausencia de estructura genética poblacional. Félix-Uraga *et al.* (2005) realizaron un estudio para evaluar la hipótesis de la existencia de tres *stocks* de *Sardinops sagax* a lo largo de la costa occidental de Baja California y el sur de California a través del análisis de la forma del otolito. Los resultados soportaron la existencia de tres *stocks* fenotípicos y fueron consistentes con hallazgos previos

obtenidos mediante diferentes metodologías (Clark & Janssen, 1945; Félix-Uraga *et al.*, 1996).

García-Rodríguez *et al.* (2011) examinaron la estructura poblacional de la sardina monterrey mediante la aplicación de dos enfoques distintos: uno basado en análisis de morfometría geométrica empleando la forma del cuerpo y otro basado en datos genéticos empleando la región control del ADNmt. Los resultados morfométricos mostraron diferencias entre los tres grupos asociados a diferencias en la temperatura superficial del mar (TSM), sugiriendo la existencia de diferentes morfotipos de sardinas; sin embargo, los datos moleculares aun cuando presentaron altos valores de diversidad genética, no soportaron la existencia de una población estructurada genéticamente. Posteriormente, Vergara-Solana *et al.* (2013) retomando la hipótesis de los diferentes *stocks* de sardina monterrey asociados a la TSM; confirmaron diferencias temporales en la forma del cuerpo y otolitos en los *stocks* previamente asociados a TSM (García-Rodríguez *et al.*, 2011). Aunque ambas estructuras resultaron en conclusiones similares, fue la forma del cuerpo la que discriminó de manera más apropiada a los grupos.

En el Pacífico mexicano existen estudios en otros pelágicos menores que mostraron diferencias genéticas entre sitios de colecta. Por ejemplo, Domínguez-López *et al.* (2010) detectaron para la sierra del Pacífico *Scomberomorus sierra* Jordan & Starks, 1895 dos grupos genéticos a partir de secuencias del ADNmt. Los organismos de Sinaloa fueron distintos a los recolectados en Oaxaca y Chiapas; sin embargo, los de Perú, representando el grupo más sureño, no mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los de Sinaloa. Un evento de parcheo caótico fue sugerido para explicar sus resultados. Ramírez-Pérez *et al.* (2015) realizaron también un estudio de la sierra del Pacífico. Ellos soportaron la existencia de *stocks* fenotípicos a partir del análisis de la forma de los otolitos, pero no soportaron la presencia de una población estructurada genéticamente sugiriendo que de existir diferencias genéticas como lo reporta Domínguez-López *et al.* (2010) éstas podrían ser relativamente bajas.

A pesar de la importancia de la sardina crinuda como recurso pesquero, la información disponible para evaluar el estado poblacional de las especies del género *Opisthonema* en el noroeste mexicano es limitada. Los primeros estudios moleculares realizados para este grupo fueron enfocados a comprender su estatus taxonómico. López-Lemus (1986) basado en el análisis de alozimas propuso la hipótesis de que se trataba de una sola especie con tres morfotipos y consideró, como otros autores (Gould *et al.*, 1974; Woodruff & Gould, 1980; Lam & Calow, 1988; Sánchez *et al.*, 2011), que un mismo genotipo presentaba plasticidad fenotípica en respuesta a los distintos ambientes. Distinta a esta conclusión, Hedgecock *et al.* (1988) encontraron características morfométricas y moleculares que validan específicamente los caracteres merísticos propuestos inicialmente por Berry & Barrett (1963) para la identificación de las tres especies del género *Opisthonema* Gill, 1861 del Pacífico Mexicano. Lagunez-Moreno (1989) mediante análisis cariológico y análisis electroforético en proteínas de las especies *O. libertate* y *O. medirastre* en las costas de Baja California Sur, sugirió la presencia de una sola especie de acuerdo con la variación intra-específica para esta región. Recientemente, Pérez-Quñonez *et al.* (2017) soportaron con datos morfométricos y por primera vez con datos genéticos basados en secuencias de ADNmt la validez taxonómica de las tres entidades (*O. libertate*, *O. bulleri* y *O. medirastre*).

Particularmente, las investigaciones sobre *Opisthonema libertate* de las que se tiene registro tratan sobre aspectos generales de la especie y se han realizado sólo en sitios en donde el recurso se explota de manera comercial. En México, García-Gómez & Molina (1986) estimaron los parámetros de edad y crecimiento del género *Opisthonema*. Las muestras se obtuvieron de la captura comercial en Guaymas, Sonora, durante 1976-1978 y 1985-1986. Estos autores identificaron siete grupos de edad (0-6) y comentan la posibilidad de que exista más de un desove anual para este género. Desafortunadamente, sus datos integran información proveniente de la mezcla de las tres especies del complejo *Opisthonema*, por lo cual carecen de precisión. Gallardo-Cabello *et al.* (1993) analizaron información de una manera similar. El autor se refiere a *O. libertate* en la descripción del crecimiento individual,

sin embargo, en el trabajo no se precisa la identificación de la especie. En ese trabajo se detectaron siete grupos de edad (1-7).

Carmona & Alexandres (1994) utilizaron por primera vez los otolitos para la determinación de la edad en el género y describieron el crecimiento de *O. libertate* para organismos procedentes de la costa occidental de Baja California, desembarcados en Bahía Magdalena y capturados durante el período 1982-1988. Ellos obtuvieron cinco grupos de edad (0-4). Rodríguez-Domínguez (1987) analizó información biológica y ecológica de las tres especies de crinuda a partir de organismos provenientes de la costa de Sinaloa durante las temporadas de pesca 1984-1985 y 1985-1986. De acuerdo con este autor, las especies presentan diferencias espaciales y temporales: *O. medirastre* y *O. bulleri* se capturan principalmente en la parte sur de la zona de pesca a inicio y fin de la temporada, respectivamente; *O. libertate*, se captura en toda la zona de pesca y durante toda la temporada, y es la especie más abundante. También detectó diferencias en las temporadas de desove: *O. medirastre* desova en invierno y las otras dos especies desovan en verano. Con relación al desove en la región noroeste del Pacífico mexicano (Golfo de California y costa occidental de Baja California Sur) sitios donde se explota de manera comercial el recurso; el desove de *O. libertate* se presenta en los meses de verano-otoño (Páez-Barrera, 1976; Torres-Villegas et al., 1985; Rodríguez-Domínguez, 1987) con un periodo larval de 48 días (Matus-Nivon, 1994; Martínez-Pecero, 2003). Jacob-Cervantes (2010) estudió la estructura de tallas y estadios de madurez gonadal de *Opisthonema* spp descargada en Mazatlán, Sinaloa, durante 2008. El intervalo de tallas varió entre 118 y 200 mm de longitud estándar (LE), y mostraron actividad reproductiva durante todo el año. Vallarta-Zarate (2012) analizó la distribución y abundancia de *Opisthonema* spp en cinco zonas administrativas-pesqueras en el sur del Golfo de California y su relación a los cambios en el ambiente durante 1997-2010. Utilizando la captura por unidad de esfuerzo (CPUE) y como variables predictivas la TSM, el índice de surgencia (IS) y el índice de turbulencia (IT), identificó la mayor abundancia de sardina en las zonas centrales (III y IV), correspondientes a la parte centro-sur del estado de Sinaloa y norte de Nayarit. También reportó una relación entre la estabilidad de las



condiciones ambientales y el aumento de la abundancia de sardina crinuda, así como una relación entre la presencia del fenómeno El Niño y la disminución de su abundancia.

Los estudios realizados en centro y Sudamérica, en donde el recurso se explota de manera comercial, también son escasos. Vega-Corrales (2010) evaluó el *stock* explotable de la pesquería de crinuda en el Golfo de Nicoya, Costa Rica, en la temporada 2007-2008 y estimó los parámetros poblacionales (reproducción y crecimiento) de *O. libertate*. Con base en ello determinó que esta especie tiene su máximo desove en los meses de febrero y mayo, una talla de primera madurez de 18.7 cm de longitud total (LT) y presenta una longitud total estimada de  $LT = 25.9$ . Recomendando con base a esta información para el manejo del recurso en la región, ajustar la época de veda y no incrementar el esfuerzo pesquero. En Ecuador Gonzales & Solis (2010) reportaron que el complejo crinuda presenta dos períodos máximos de desove: febrero-mayo y septiembre-octubre, con una longitud de primera madurez de 22.6 cm de LT. Desafortunadamente, en este trabajo las especies no fueron identificadas.

Ha sido demostrado que los parámetros poblacionales de una especie cambian en función del tiempo, del ambiente y de los efectos de la pesca. Estos cambios se reflejan en la reducción del número de modas en la estructura de tallas y en el número de individuos de tamaño grandes. También, la talla de primera madurez varía debido a una estrategia reproductiva para alcanzar un nuevo punto de equilibrio biológico (Gulland, 1971; Csirke, 1980; García-Alberto, 2010). De esta manera, la población biológica cambia en tamaño, estructura y composición.

Los trabajos previamente mencionados sobre la sardina crinuda, han detectado diferencias en la estructura de tallas, en los parámetros de crecimiento y en la talla de primera madurez en las diferentes zonas estudiadas. Tal situación induce a pensar que podría tratarse de distintos *stocks*, con características propias de acuerdo con el ambiente donde residen y posiblemente sitios de reproducción específicos. Por tal motivo resulta de gran relevancia llevar a cabo un estudio sobre

estructura poblacional basados en diferentes metodologías como el análisis detallado de la forma del cuerpo y otolitos y el empleo de datos moleculares.

## JUSTIFICACION

Toda pesquería, debe estar sustentada 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). Para establecer un plan de manejo adecuado para la sardina crinuda *Opisthonema libertate* se requiere contar con información de la estructura poblacional y con ello evidenciar el número de *stocks* pesqueros. De tal manera que cada unidad poblacional pueda ser administrada independientemente de acuerdo con sus características específicas, como tasa de crecimiento, fecundidad y desarrollo, entre otras. Si estos elementos no son considerados, la explotación podría generar la disminución progresiva de la variación genética, modificando la capacidad de la población a recuperarse de la presión de la pesca y del ambiente (Rubio-Castro, 2016). Las consecuencias no solo serían económicas con la desaparición de las pesquerías, sino también ecológicas afectando la relación depredador-presa. Dada la importancia que tiene la pesca de *O. libertate* en las regiones a lo largo de su distribución como son México, Costa Rica, Ecuador y Perú, se requiere información de la estructura poblacional con la finalidad de aportar datos que permitan en un futuro soportar medidas para su explotación racional.

## **HIPÓTESIS**

Debido a las características biológicas de la sardina crinuda en relación con su alta capacidad de migración, desovador parcial y duración del periodo larval; y a los resultados encontrados con otras especies de pelágicos menores con similares características biológicas, se espera encontrar diferencias fenotípicas espaciales pero una ausente o poca estructura genética poblacional.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Evaluar la variabilidad morfológica y la estructura poblacional de la sardina crinuda *Opisthonema libertate* por medio de análisis morfométrico y genético.

### **Objetivo específicos**

- Evaluar las diferencias morfológicas del cuerpo y otolitos de la sardina crinuda *Opisthonema libertate* en el Pacífico Oriental mexicano.
- Determinar los niveles de diversidad y diferenciación genética de la sardina crinuda en la costa del Pacífico Oriental, a partir de secuencias de ADN mitocondrial.
- Establecer un protocolo ddRADSEQ para el aislamiento y caracterización de marcadores SNPs en sardinas crinudas para su aplicación en futuros estudios poblacionales.

## **METODOLOGÍA**

### **Área de estudio**

La costa Occidental de la Península de Baja California y Golfo de California hasta la parte norte de Perú, está influenciada por cuatro sistemas de corrientes: 1) la Corriente de California (CC), 2) la Corriente Surecuatorial (CSE), 3) la Contracorriente Ecuatorial (CCE) y 4) la Corriente Costera de Costa Rica (CCCR) (Fig. 5). De manera general, la circulación estacional en esta región puede ser observada dentro de tres regímenes (Trasviña *et al.*, 2004):

- De agosto a diciembre, tanto la CSE como la CCE se intensifican. La contracorriente fluye hacia la costa, se une a la (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 CC se separa de la costa de Baja California (25°N), alimentando a la Corriente Norecuatorial.
- De febrero a abril, la CC se intensifica y se dirige hacia el sur hasta los 20°N. La CCE está ausente durante este período y es reemplazada por un flujo variable hacia el oeste o noroeste. La CSE es débil y muestra movimientos ocasionales hacia el este, cerca del ecuador. La CCCR 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 CCE se forma de nuevo y la mayor parte de sus aguas fluyen hacia el norte, cerca de la costa, para alimentar la CCCR.

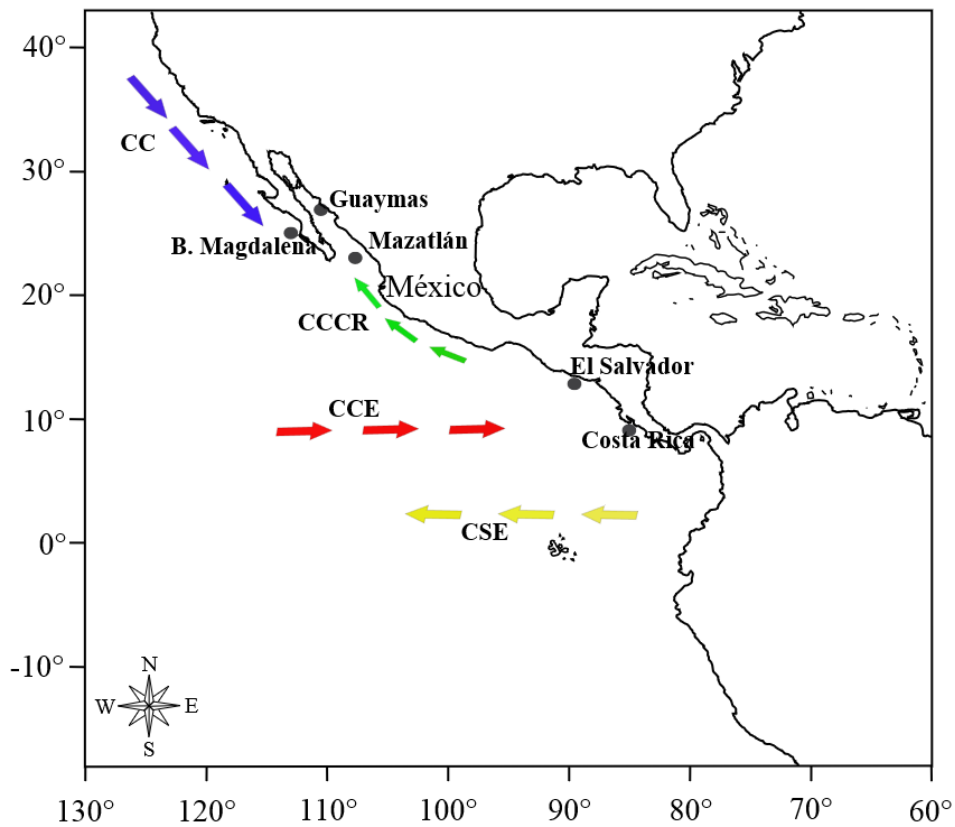
### **Recolecta de muestras**

Para el análisis fenotípico basado en la forma del cuerpo y de los otolitos *sagitta* (lado derecho) se revisaron 204 ejemplares de sardina crinuda obtenidos en 2013 y 2014 a partir de la captura comercial desembarcada en invierno y verano en los puertos de Bahía Magdalena (BM), Guaymas (GYM) y Mazatlán (MAZ) (Fig. 5). La

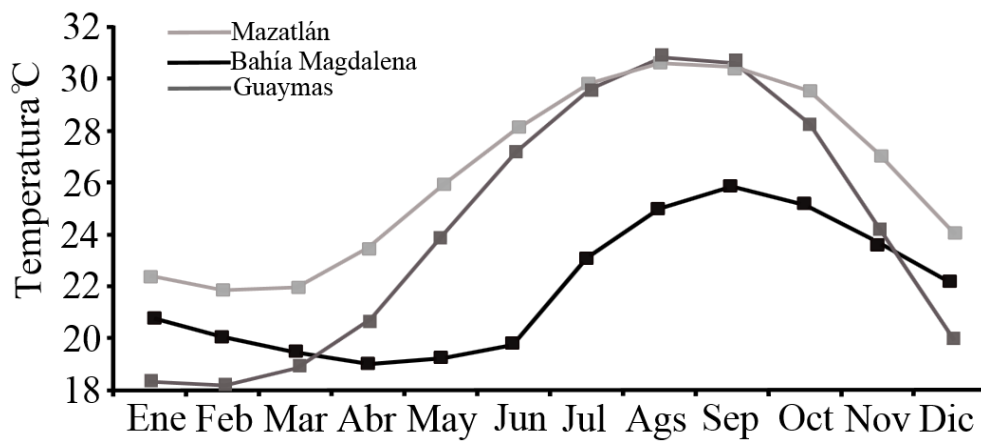
obtención de muestras fue realizada en estas temporadas debido a que es cuando se registran las diferencias más pequeñas (invierno) y más grandes (verano) en Temperatura Superficial del Mar (TSM) entre las tres zonas de pesca (Fig. 6). Estas condiciones en la TSM son consecuencia de la influencia de dos sistemas de corrientes en la región (CC y CCE), las cuales podrían promover la expansión y concentración de la población de sardina crinuda.

Para el análisis genético basado en secuencias del ADNmt se emplearon 125 individuos. Los ejemplares fueron obtenidos de la captura comercial desembarcada en BM, GYM y MAZ entre junio y julio del 2015. Muestras adicionales fueron obtenidos en junio del 2015 de flotas artesanales en El Salvador (ES) y de capturas comerciales en Costa Rica (CR) (Fig. 5). Todas las muestras de tejido muscular fueron preservadas en alcohol al 96%.

Para la construcción de la librería genómica para la detección de SNPs se emplearon especímenes colectados entre junio y julio del 2017 en las capturas comerciales de los puertos de BM, GYM y MAZ. Para este análisis se emplearon 80 individuos.



**Figura 5.** Sitios de muestreo de *Opisthonema libertate* en el Pacífico Oriental y esquema de las corrientes marinas superficiales en el Pacífico Oriental. CC. Corriente de California; CCCR. Corriente costera de Costa Rica; CCE. Contracorriente Ecuatorial y CSE. Corriente Surecuatorial.



**Figura 6.** Variación mensual de la temperatura superficial del mar (TSM) por zona en la costa noroeste de México durante 2014.

La identificación de todos los organismos se llevó a cabo con base en el conteo del número de branquiespinas en el primer arco branquial, como lo describe Berry & Barret (1963) y considerando las características descritas por Torres-Ramírez (2004). El primer arco branquial fue extraído y lavado con agua, dejado a temperatura ambiente por 24 horas y digitalizado posteriormente mediante una cámara digital empotrada en un estereoscopio.

Todos los organismos colectados fueron medidos considerando la longitud total (LT), furcal (LF) y estándar (LE) con una precisión de  $\pm 1$  mm. También se registró el peso total (PT) y peso eviscerado (PE) con una precisión  $\pm 1$  g. Se les determinó el sexo y el estadio de madurez con base en la escala morfo cromática establecida por Nikolsky (1963). Todos los individuos analizados fueron considerados adultos ( $\geq 120$  mm LE) con base en la relación entre la longitud y la condición sexual (Berry & Barrett 1963; Jacob-Cervantes & Aguirre-Villaseñor, 2014; Pérez-Quñonez *et al.*, 2017). El rango de tallas varió entre 140 a 210 mm LE.

## **Definición de grupos fenotípicos**

### Captura de imágenes

El análisis morfométrico fue realizado a partir de individuos colectados en BM, GYM y MAZ ya que no fue posible obtener sardinas de las otras localidades. Para su análisis, las sardinas fueron agrupados en invierno y verano debido a que los movimientos migratorios de la especie podrían confundir el origen de los individuos, como se ha sugerido para otros peces pelágicos (Félix-Uraga *et al.*, 2005; García-Rodríguez *et al.*, 2011).

El análisis de las diferencias entre la forma del cuerpo y otolitos de los organismos muestreados se basó en la comparación de imágenes digitales. Para el cuerpo, las fotografías fueron tomadas del lado izquierdo de los organismos con una cámara digital Kodak EasyShare CD33, 3.1 megapíxeles, montada sobre una base y con una escala métrica. Para los otolitos, las imágenes digitales fueron obtenidas a



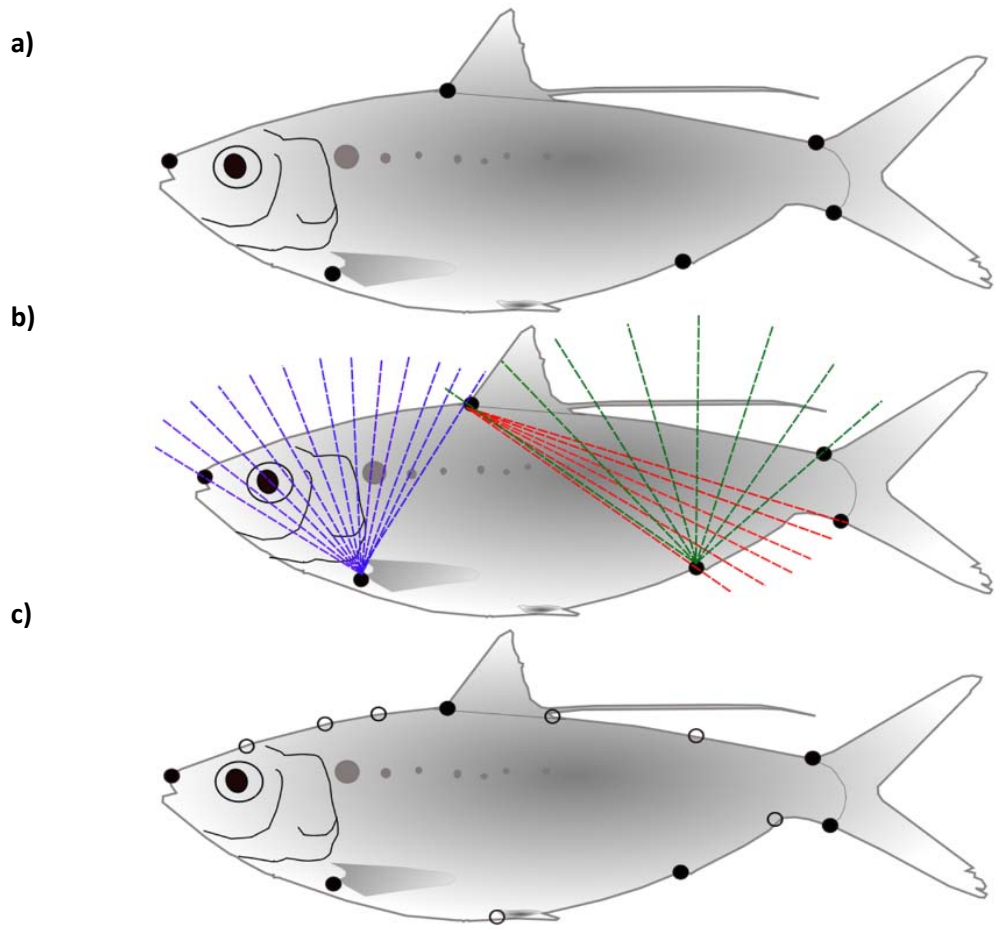
16.5x de aumento utilizando un sistema digitalizador integrado por un microscopio estereoscópico Olympus SZX-ILLK100, conectado a una videocámara a color y con salida a un video-monitor. Este equipo a su vez estuvo conectado a una computadora.

#### Obtención de datos morfométricos

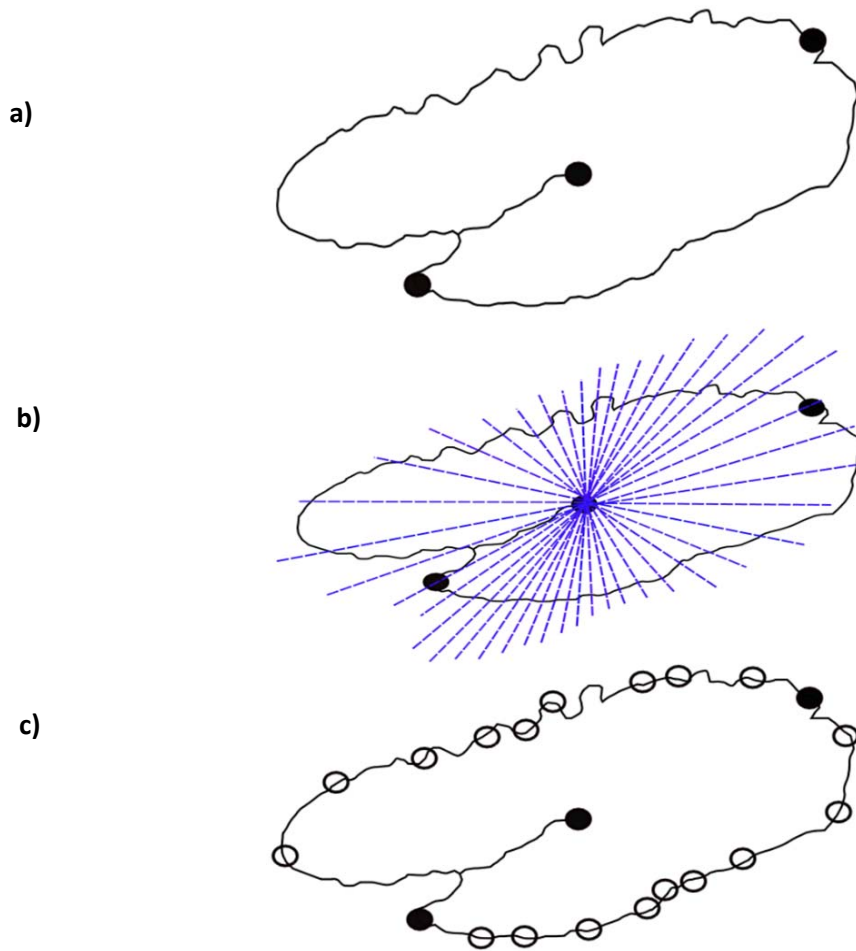
La descripción y comparación de la forma del cuerpo y de la forma de los otolitos, se basó en las configuraciones generadas por la digitalización (coordenadas X, Y) de marcas anatómicas naturales (“Landmarks” término con el que se conoce en la literatura inglesa) ubicadas principalmente sobre el contorno de ambas estructuras. El criterio para la selección de las marcas consistió en elegir aquellas que pudieran reconocerse fácilmente y que estuvieran en el mismo plano. Para minimizar los sesgos durante la toma de datos se siguieron los siguientes criterios: a) todos los individuos fueron digitalizados por la misma persona, b) el orden en la cual se digitalizaron los organismos fue al azar y c) las digitalizaciones en todos los casos fueron tomadas de un mismo lado del espécimen; para este caso particular se consideró el lado izquierdo del cuerpo del pez y la cara interna del otolito derecho.

Para poder capturar la forma en aquellas áreas en donde no fue posible ubicar marcas naturales en ambas estructuras, se generó una gradilla de referencia con distancias radiales angularmente equidistantes (Fig. 7a, 8a). Las referencias fueron creadas utilizando el programa MakeFan (Sheets, 2004) y una vez construidas fueron empleadas como referencias para asignar y ubicar puntos (semi-marcas o *semi-landmarks*) en la intersección de cada distancia radial con el contorno de las estructuras (Fig. 7b, 8b). En total, se seleccionaron 13 puntos de referencia (considerando marcas y semi-marcas) para representar la forma del cuerpo (Fig. 7c) y 20 puntos de referencia (considerando marcas y semi-marcas) para representar la forma del otolito (Fig. 8c). Todas las digitalizaciones fueron realizadas empleando el programa TpsDig (Rohlf, 2004).

El efecto ajeno a la variación propia de la forma como es la posición, escala y rotación de las configuraciones de los puntos que definieron el contorno del cuerpo y otolito del organismo, fue removido ubicando todas las configuraciones sobre un mismo origen y escalándolas a un mismo tamaño del centroide (en geometría, el centroide de un objeto "A" perteneciente a un espacio  $n$ -dimensional es la intersección de todos los hiperplanos que dividen "A" en dos partes de igual  $n$ -volumen con respecto al hiperplano. Matemáticamente, es el promedio de todas las coordenadas que definen al objeto "A"). El efecto de la rotación, fue eliminado mediante el proceso de superimposición por medio de un Análisis de Procrustes Generalizado el cual consiste en minimizar las diferencias entre los puntos homólogos, ajustándolos a través del procedimiento de mínimos cuadrados. Es pertinente mencionar que el espacio donde se realiza el ajuste de Procrustes Generalizado es una hiperesfera de  $n$ -dimensiones, conocido como el espacio de Kendall (Toro-Ibache *et al.*, 2010).



**Figura 7.** Ubicación de marcas naturales en el cuerpo de la sardina crinuda **(a)**. Gradillas de referencias con distancias radiales angularmente equidistantes **(b)**, y configuración obtenida de cada pez integrada a partir de la selección de 13 marcas totales **(c)**. Los puntos negros indican las marcas naturales ubicadas a partir de referencias anatómicas y los puntos transparentes las semi-marcas.



**Figura 8.** Ubicación de marcas naturales en los otolitos *sagitta* de *Opisthonema libertate* **(a)**. Gradillas de referencias con distancias radiales angularmente equidistantes **(b)**, y configuración obtenida de cada pez integrada a partir de la selección de 20 marcas totales **(c)**. Los puntos negros indican las marcas naturales ubicadas a partir de referencias anatómicas y los puntos transparentes las semi-marcas.

## Análisis de los datos morfométricos

Con la finalidad de probar las diferencias fenotípicas entre los organismos de las localidades se comparó la Distancia Total Procrustes (DTP) entre cada par de las configuraciones promedio de los grupos (localidad). La cual es la sumatoria al cuadrado de las diferencias cuadráticas entre la posición de las marcas en dos configuraciones superpuestas óptimamente sobre el tamaño del centroide del objeto en análisis. Esta es la distancia que define la medida (i.e. el tamaño) en el espacio de forma de Kendall (ver Espacio de Kendall). La significancia estadística de la prueba fue basada en la comparación del valor de F (razón de varianzas) obtenido de los valores observados con aquellos valores obtenidos mediante 100 remuestreos. La significancia estadística se obtuvo del porcentaje de veces que el valor de F fue igual o mayor que el valor de F obtenido de los datos observados. Estos análisis fueron realizados en el programa TwoGroup (Sheets, 2004).

Las coordenadas ajustadas mediante el método de Procrustes Generalizado fueron transformadas usando un Análisis de Componentes Principales (PCA, por sus siglas en inglés) con la matriz de las fuerzas de deformación. Este procedimiento se realiza para evitar incluir variables correlacionadas entre sí y para llevar las variables de un espacio curvo (espacio de Kendall) a uno euclidiano, ya que al hacer análisis estadísticos es necesario tener variables que cumplan con estas premisas. Este análisis consiste en generar nuevas variables a través de ajustar una función de interpolación a las coordenadas X, Y de los puntos homólogos para cada organismo en una muestra con respecto a una referencia. La interpolación genera una matriz de fuerzas de deformación, y con estas variables se construyen las gradillas finas de deformación. La referencia empleada fue la configuración promedio de los puntos homólogos. Posteriormente se realizó el PCA para generar unas nuevas variables llamadas Deformaciones Parciales, las cuales son los eigenvectores de los componentes principales en el espacio de Kendall y son utilizados para describir la tendencia en la variación de la forma entre estructuras dentro de una muestra y las deformaciones en forma (Rohlf, 1993).

Los puntajes (scores) o coeficientes de las Deformaciones Parciales son las cantidades que caracterizan la localización de cada espécimen en el espacio de las deformaciones parciales y éstos fueron usados para realizar los análisis estadísticos. En primer lugar, se realizó un Análisis de Variables Canónicas (CVA, por sus siglas en inglés), el cual describe y cuantifica la variación fenotípica entre grupos. El CVA produce un nuevo juego de variables que son las combinaciones lineales de las variables originales que buscan maximizar la varianza que discrimina los grupos. Las diferencias en los grupos se observaron al graficar los valores (scores) producidos del CVA. Estadísticamente, la diferencia entre grupos fue evaluada mediante un Análisis de Varianza Multifactorial (MANOVA, por sus siglas en inglés), y de acuerdo al valor de Lambda de Wilk's ( $\Lambda$ ) cuyo límite inferior (cero) indica una discriminación perfecta y su límite superior (uno) sugiere la no diferenciación.

Se generó una matriz de asignación *a posteriori* con base en las distancias cuadráticas de Mahalanobis obtenidas a partir de los scores producidos por el CVA. La asignación se basa en considerar la distancia existente entre cada individuo y la media del grupo más cercano. Las distancias cuadráticas de Mahalanobis entre las medias de cada grupo fueron empleadas para construir un dendrograma con el fin de visualizar las afinidades fenotípicas entre los grupos. Los resultados del CVA fueron obtenidos con el programa CVAGen6m (Sheets, 2004). Las distancias cuadráticas de Mahalanobis se obtuvieron usando el programa de cómputo Statistica v.8 ([www. Statsoft.com](http://www.Statsoft.com)) y el dendrograma fue construido usando el módulo Neighbor del programa de cómputo PHYLIP v. 3.69 (Felsenstein, 1989).

Finalmente, la tendencia en la variación de la forma entre los grupos, fue visualizada graficando los vectores producidos del análisis de las deformaciones parciales e interpolando la variación ocurrida entre las marcas homólogas (Thin Plate Spline).

## Definición de grupos genotípicos mediante ADNmt

### Extracción de ADN

La extracción del ADN genómico se realizó a partir del tejido muscular de cada individuo usando 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. Posteriormente, las muestras extraídas fueron almacenadas a -20 °C.

### Amplificación y secuenciación de la Región Control

A partir del ADN total extraído se amplificó un fragmento de la región control del ADN mitocondrial mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Uno de los aspectos más importantes para la amplificación de un fragmento seleccionado, es la selección de de *primers* o iniciadores. *Primers* mal diseñados podrían amplificar fragmentos de ADN distintos a los buscados. Para amplificar el fragmento de la región control se diseñaron los *primers* Olib RCF y Olib RCR (Tabla 1), a partir de una secuencia completa del ADNmt depositada en Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, No. Acceso AP009136.1) correspondiente a un individuo de *Dorosoma petenense*, orden *Clupeiformes*, familia *Clupeidae*, y empleando el programa Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000). Las consideraciones que se tomaron en cuenta para el diseño fueron:

1. Seleccionar *primers* con una longitud entre 18 y 28 pares de bases (bp).
2. Contener una proporción G: C (Guanina: Citosina) alrededor del 50-60%.
3. Alcanzar su temperatura de alineamiento ( $T_m$ ) entre 55-60 °C.
5. Tener terminaciones 3' que no fueran complementarias debido a que podrían originar la formación de dímeros.

6. Elegir *primers* que no formen secuencias auto-complementarias.

**Tabla 1.** Primers diseñados para amplificar la Región Control del ADNmt de *Opisthonema libertate*.

Primer	Secuencia 5'-3'	Tamaño del producto (pb)	Tm °C
Olib RCF	GTCCGTGCTTTCCCAAATA	600	60
Olib RCR	GCCGAAAAGAAAATACCAA		

Las reacciones se realizaron en volúmenes de 35 µl conteniendo una concentración final de 1X Buffer Taq, 0.2 mM de dNTP mix, 0.24 µM de cada *primer*, 2.0 mM de MgCl<sub>2</sub> y 0.025 U/µl de Taq DNA polimerasa. El volumen de la reacción final fue completado con Agua miliQ. Los parámetros del termociclador Thermal Cycler T100, Bio Rad comprendieron una desnaturalización a 94°C durante 2 min y 35 ciclos, cada uno de los cuales con tres segmentos (94°C durante 30 seg, 60°C durante 30 seg y 72°C durante 45 seg). Una extensión final fue realizada a 72° C durante 3 min. Las amplificaciones fueron confirmadas mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, teñidos con Gelgreen y visualizadas en un fotodocumentador con luz ultravioleta.

Los productos amplificados de manera exitosa fueron secuenciados en ambos sentidos (Macrogen, Inc. Seoul, Korea) utilizando los mismos *primers* empleados en la amplificación. Las secuencias obtenidas para cada individuo fueron alineadas y editadas empleando el programa ChromasPro 1.7.6 (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 ( $\pi$ ). 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). En general, se obtiene valorando el número promedio de nucleótidos diferentes por sitio entre dos secuencias, pero puede aplicarse algún modelo de evolución molecular para tratar de inferir con mayor precisión la distancia genética entre las secuencias. En el presente estudio se empleó el modelo de Tamura & Nei ( $\gamma = 0.47$ ) (Kimura, 1981) (ver siguiente sección).

## 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 genéticas, pero considera también el número de mutaciones que ocurren entre haplotipos. Emplea un análisis jerárquico para evaluar las diferencias dentro y entre individuos de una población y entre poblaciones, y estima los índices de fijación definidos por Wright (1978) en función de coeficientes de endogamia.

El estadístico  $\Phi_{ST}$  (análogo a  $F_{ST}$ ) se obtuvo también para cada par de localidades y se realizaron comparaciones pareadas con la intención de detectar aquellas que pudieran ser distintas. Cuando fueron encontradas diferencias, los valores de significancia estadística se ajustaron utilizando correcciones secuenciales de

Bonferroni (Rice, 1989). 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 jModetes 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. Basado en el criterio de información de Akaike el modelo que se ajustó a nuestros datos fue el de Tamura & Nei (gama= 0.47) (Kimura, 1981). Todas las estimaciones de diversidad y los análisis estadísticos se calcularon en el programa Arlequin 3.0 (Excoffier et al., 2005).

La estructuración genética de la sardina crinuda fue revisada también mediante un análisis de mezcla genética basado en un agrupamiento bayesiana empleando el programa BAPS 6.0 (Bayesian Analysis of Population Structure; Corander *et al.*, 2008), el cual permite subdividir las secuencias en unidades poblacionales genéticamente homogéneas mediante un método de inferencia bayesiana, donde el número de grupos está dado bajo un modelo de agrupamiento espacial. Las estimaciones se hicieron incluyendo las coordenadas geográficas por sitio de muestreo obtenidas de Google Earth™. 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). El cual permite aumentar el poder estadístico para la estimación de la estructura de la población genética.

### Análisis filogeográfico

El patrón filogeográfico de la sardina crinuda se exploró a través de una red de mínima expansión usando el método Media Joining (Bandelt *et al.*, 1999), implementado en POPART 1.7. Este método conforma un arreglo de haplotipos

basados en sus distancias genéticas y tomando en cuenta sus frecuencias y procedencia geográfica.

La hipótesis de aislamiento por distancia (por sus siglas en inglés IBD) fue probada en *The Isolation By Distance Web Service* (IBDWS) versión 3.15 (Jensen *et al.*, 2005). Éste análisis, fue basado en una prueba de Mantel empleando 30,000 permutaciones sobre matrices de distancias genéticas y distancias geográficas para probar 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  $\Phi_{ST}$  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 obtenidas de Google EarthTM (<http://earth.google.com>).

#### Historia demográfica

Finalmente, la historia demográfica fue revisada mediante el análisis de la distribución de las diferencias nucleotídicas pareadas (*mismatch distribution*) (Rogers & Harpending, 1992), a partir de las cual se estimaron los parámetros demográficos  $\tau$ ,  $\theta_0$  y  $\theta_1$ . 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  $\tau = 2ut$  (Rogers & Harpending, 1992),

en donde tau ( $\tau$ ) es el valor máximo de la distribución,  $u$  representa la tasa de mutación y  $t$  es el tiempo desde la expansión. Además, los cambios en el tamaño histórico de la población a través del tiempo fueron inferidos utilizando un modelo Bayesiano Skyline plot (por sus siglas en inglés BSP), implementado en el programa BEAST 2 (Bouckaert *et al.*, 2014). Se utilizó una tasa de sustitución de  $6 \times 10^{-8}$  sustituciones/sitio/año, basado en la diversidad nucleotídica y la divergencia considerada para otras especies de sardinas (como se explica en los resultados). Se asumió un reloj estricto con el modelo de sustitución de Tamura & Nei. Se realizó un análisis de cadenas de Markov Monte Carlo con una longitud de cadena de 100 millones de pasos y un re-muestreo cada 10,000 generaciones. Los resultados se evaluaron en Tracer v1.6 (<http://beast.bio.ed.ac.uk/tracer>). Los valores de tamaño de muestreo efectivo (por sus siglas en inglés ESS) considerados fueron  $> 300$ .

## **Evaluación de construcción de librerías para la detección de SNPs**

Para la elaboración de librerías se empleó el procedimiento de Sitios de Restricción Asociado a Secuencias de ADN Doble Digestión (“ddRADseq” por sus siglas en inglés) como a continuación se describe.

### **Extracción y cuantificación de ADN**

El ADN genómico total se aisló utilizando un kit de extracción comercial (*Wizard*) siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 2) y ~25 mg de tejido muscular de organismos procedentes de BM, GYM y MAZ. Además de continuar con la extracción se realizó un segundo lavado en el tubo original y una re suspensión en 200 µl con la intención de disponer de una reserva con mayor cantidad de ADN para posteriores análisis, sobre todo en donde se debe ajustar los valores en ng del ADN. La calidad del ADN extraído se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1%. En algunos casos en donde el ADN presentaba una fuerte banda genómica pero un barrido considerable en el gel, se les realizó una purificación con el *AgentCourt Ampure Xp* siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 3) para extracciones, con la intención de mejorar la calidad del producto extraído. Se reservaron por lo menos 5 µl del producto previo a la limpieza, para ser usados como control al momento de realizar la electroforesis de verificación (comparando antes y después de la limpieza). Posteriormente, el ADN genómico de buena calidad fue cuantificado empleando un kit de cuantificación fluorométrica (*Qubit dsDNA HS Assay Kits*) siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 4) y usando ~3 µl de ADN. Las muestras deben contar con la cantidad necesaria de ADN genómico, al menos 100-200 ng totales, de no ser así se descartan.

## **Doble digestión**

La doble digestión se llevó a cabo en un volumen total ( $V_t$ ) de 50  $\mu$ l conteniendo: 5  $\mu$ l MIX de enzimas (ECORI-HF 1  $\mu$ l, MspI 1  $\mu$ l y Buffer 10X 3  $\mu$ l (*Thermo Scientific*)), ~40 ng ADN genómico y el volumen de la reacción final fue completado con Agua miliQ. Enseguida se incubó la reacción 3 horas a 37°C y posteriormente se mantuvo a 4°C para enfriar la reacción. Después se realizó un lavado (purificación) del producto de la reacción anterior con *AgenCourt Ampure Xp* para ddRAD-seq y se re suspendió en 40  $\mu$ l de agua miliQ. La calidad del ADN digerido se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1% corriendo el producto antes y después de la limpieza. Enseguida se cuantificó con Qubit (*Qubit dsDNA HS Assay Kits*). Se reservaron ~3  $\mu$ l de la muestra, previo a la limpieza control para comparar antes y después de la purificación, y detectar cuanto ADN se estaba perdiendo en las limpiezas y así determinar si pudiera ser un factor para que en algunas muestras se redujera de manera drástica la cantidad de ADN post-limpieza (concentración ~20 ng).

## **Ligación de adaptadores**

Una vez estandarizadas las cantidades de ADN digerido para la ligación, se generaron los adaptadores P1 y P2. Se contó con 48 pares de adaptadores únicos P1 (oligos P1.1 y P1.2) y el adaptador común P2 (P2.1 y P2.2). Para generar el adaptador P1, se combinó el oligo 1.1 con su complementario 1.2 en una concentración final de 40  $\mu$ M. Los oligos fueron re suspendidos en una concentración inicial de 200  $\mu$ M, se utilizando 20  $\mu$ L del oligo 1.1, 20  $\mu$ L del oligo 1.2, 10  $\mu$ L 10X de buffer de alineamiento y 50  $\mu$ L de nuclease-free wáter. Se realizó el mismo procedimiento para crear los oligos 2.1 y 2.2 para obtener el adaptador común P2.

Cada uno de los adaptadores (*stock* de trabajo) fue incubado en un termociclador Thermal Cycler T100, Bio Rad a 97.5°C por 2.5 minutos y luego enfriado a una velocidad no mayor de 3°C por minuto hasta que la solución alcanzó una

temperatura de 21°C. Se mantuvieron en refrigeración a 4°C. El número de adaptadores únicos que se utilizó fue de 32 (De manera aleatoria debido a la pérdida de muestras). Éstos fueron seleccionados considerando un balance de bases con el propósito de determinar si el conjunto de índices o adaptadores seleccionados contiene suficiente diversidad de secuencia para secuenciar correctamente en los secuenciadores de Illumina.

La reacción de ligación se realizó en un volumen total de 40 µL. Se combinaron las cantidades de P1 2µL, Master Mix (T4 ADN ligasa 0.25µL, T4 ADN buffer 4µL y P2 2µL) 6.25MI y la cantidad necesaria de ADN digerido y se aforó el resto de la reacción con agua miliQ. Enseguida se incubaron en un termociclador Thermal Cycler T100, Bio Rad empleando el siguiente protocolo: 23°C 30 min, 65°C 10 min, 2°C 90 seg. La reacción anterior fue transferida a tubos nuevos para una limpieza con *AgentCourt Ampure Xp*. Posteriormente se realizó una PCR con el propósito de verificar el éxito de la ligación. Las reacciones de amplificación se realizaron en volúmenes de 15µL con 1.5µL de ADN genómico, 3 µl de 5X Colorless GoTaq Flexi buffer, 0.3 mM de cada dNTP, 2.25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.3 U/µl de Taq DNA polimerasa, 0.03 µM del primer PCR 1, 0.3 µM del Index 7 y se aforo el resto de la reacción con agua miliQ. Se agregaron a la PCR controles positivos y negativos. Las condiciones de la PCR fueron desnaturalización 94°C durante 3 min, 94°C 0.30 seg, alineación 67°C 30 seg, extensión de 72 °C 30 seg. El producto de la PCR fue verificado en electroforesis en gel de agarosa al 1%. Por último se realizó una cuantificación en Qubit.

### **Agrupamiento (*Pool*)**

Después de la ligación, las muestras con códigos de barras individuales con el adaptador P1 único fueron agrupadas y limpiadas con perlas *AgentCourt Ampure Xp*. El objetivo final fue agrupar a los individuos con un código de barras único en una muestra final de 30 µl; de manera que todo el grupo de los productos ya ligados se pudiera cargar en casetes Pippin Prep (*Saga Science PLO 1751*) para la

selección del tamaño. El número de individuos que puede agruparse en los 30  $\mu$ l para la selección de tamaño dependió de la cantidad de adaptadores P1 únicos que utilizaron.

### **Selección de tamaño con *Sage Science Pippin Prep***

Ya agrupados los 32 organismos con 10 Index, se procedió a realizar la selección de tamaño de los fragmentos digeridos (300 pb) mediante un *Pippin Prep Sage Science PLO 1751*) y siguiendo las especificaciones del fabricante. Es importante tener en cuenta que cuando se especifica el tamaño, se deben considerar los 76 bp adicionales del adaptador agregado en la ligadura. Una vez obtenido el producto de este análisis se realizó una electroforesis con el producto previo y post purificación con *AgentCourt Ampure Xp* al igual que una cuantificación con Qubit con el producto antes y después de la limpieza. Es importante realizar todos estos puntos de verificación pre y post limpieza en todos los pasos ya que en ellos se podrá determinar si se avanza o no al siguiente paso, e identificar las causas que evitaron obtener los resultados esperados.

### **Amplificación por PCR para generar bibliotecas de secuenciación de Illumina**

Se realizó una amplificación por PCR con un kit Phusion Polymerase. Para la PCR multiplex, se incluyó un conjunto de 10 secuencias de oligos de PCR2 indexados de manera única. Cada uno de estos oligos agregó una secuencia de índice única a todos los fragmentos en la PCR. Las reacciones se realizaron en volúmenes de 20  $\mu$ L (Buffer 5X phusion GC 4  $\mu$ L, dNTPs 10 mM 0.4  $\mu$ L, PCR1 1  $\mu$ L, PCR Index (2-12)\*1  $\mu$ L, DNA 4-5  $\mu$ L , DMSO 0.6  $\mu$ L , Phusion 0.2  $\mu$ L , H2O milQ 9.8  $\mu$ L ), las condiciones de la PCR fueron 98°C durante 30 seg, 98°C durante 10 seg, alineación 67°C 30 seg, 72 °C 30 seg, 72 °C 10 min, 4 °C 1 min por 12 ciclos. Se dejó una reacción por tubo extra para una PCR completa (34 ciclos) y corroborar esta última en electroforesis. Los productos finales de esta PCR se purificaron con *AgentCourt*



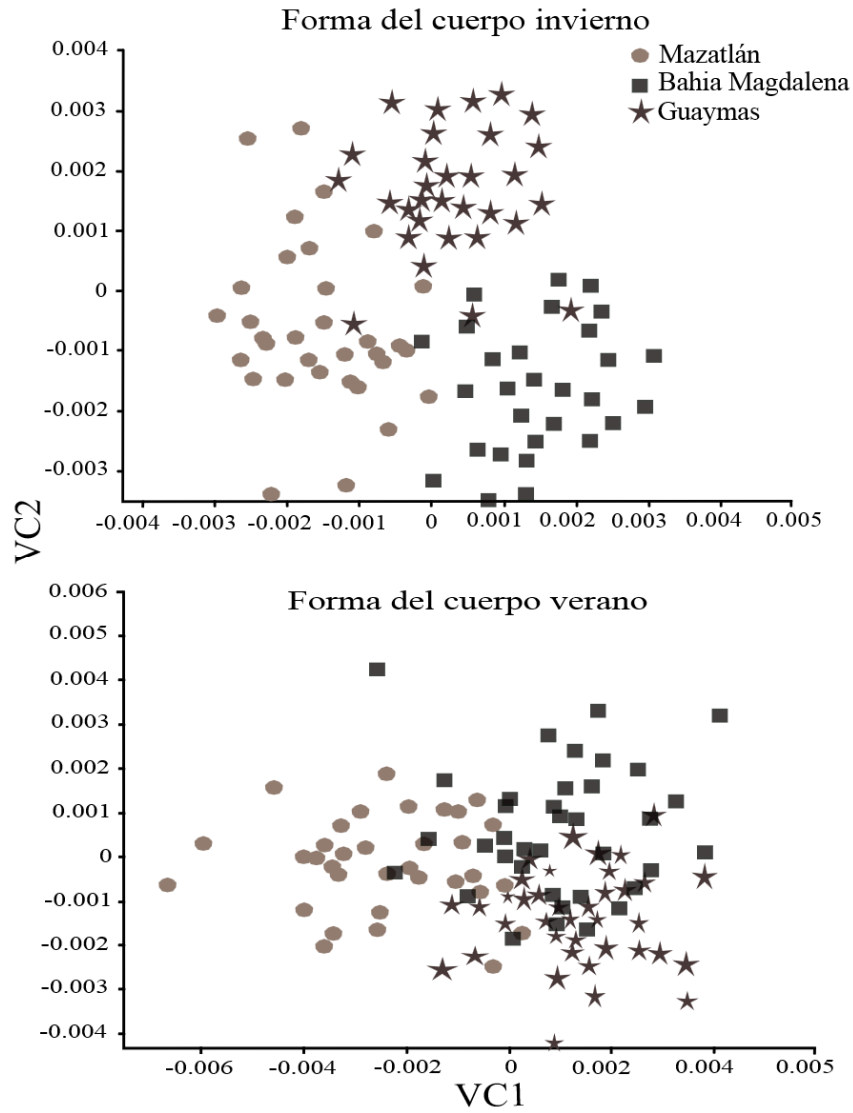
*Ampure Xp* y se re suspendieron en volúmenes de 40  $\mu$ L en 10 mM Tris pH 8.5 y se realizó una cuantificación con Qubit. El resultado final fue la creación de las librerías para secuenciado en Illumina.

## RESULTADOS

### Diferenciación morfométrica

Diferencias morfométricas basadas en la forma del cuerpo

El análisis basado en las comparaciones pareadas de la distancia Procrustes indicó diferencias significativas durante invierno entre las tres áreas de recolecta ( $F = 5.23$ ,  $P = <0.002$ ,  $DTP = 0.0218$ , para BM-GYM;  $F = 3.77$ ,  $P = <0.011$ ,  $DTP = 0.0202$ , para GYM-MAZ;  $F = 7.42$ ,  $P = <0.001$ ,  $DTP = 0.0238$ , para BM-MAZ). Las dos variables canónicas indicaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Lambda de Wilk's ( $\Lambda$ )= 0.15,  $P < 0.001$ , VC1; Lambda de Wilk's ( $\Lambda$ )= 0.50,  $P < 0.001$  VC2), dando soporte a la existencia de diferentes morfotipos de sardina crinuda en invierno (Fig. 9). El porcentaje promedio de asignación correcta (PoAsCo) fue del 72.3%. El grupo de MAZ fue quien presentó el valor más alto (76.6%), y el más bajo se obtuvo para GYM (67.7%) (Tabla 2). El error de asignación promedio más bajo ocurrió entre los individuos de BM-MAZ, y el más alto entre los individuos de GYM-MAZ y GYM-BM (Tabla 2). La figura 10 muestra la afinidad morfológica entre los tres grupos basado en las distancias de Mahalanobis, e indica que los individuos de GYM-MAZ tuvieron las diferencias morfológicas más bajas, mientras que los de BM-MAZ mostraron las mayores diferencias.



**Figura 9.** Diagrama de dispersión generado a partir de los scores de las variables canónicas para la forma del cuerpo; invierno (arriba) y verano (abajo).

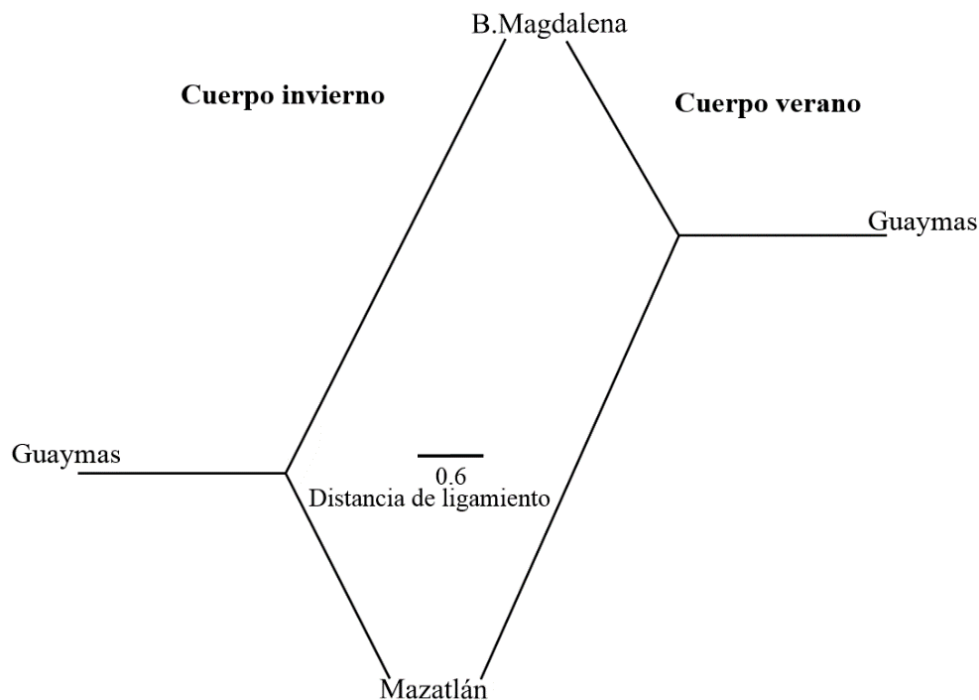
**Tabla 2.** Matriz de asignación (%) generada a partir del CVA para la forma del cuerpo. Los renglones representan los grupos originales y las columnas los grupos sugeridos por el modelo. La diagonal, representa los individuos correctamente identificados.

Zona	Mazatlán (MAZ)	Bahía Magdalena (BM)	Guaymas (GYM)	n
Mazatlán (invierno)	<b>76.6</b> (n=23)	6.66 (n=2)	16.6 (n=5)	94
Bahía Magdalena (invierno)	9.09 (n=3)	<b>72.7</b> (n=24)	18.1 (n=6)	
Guaymas (invierno)	16.1 (n=5)	16.1 (n=5)	<b>67.7</b> (n=21)	
-----				
Mazatlán (verano)	<b>67.4</b> (n=23)	14.7 (n=5)	17.6 (n=6)	110
Bahía Magdalena (verano)	12.8 (n=5)	<b>66.6</b> (n=26)	20.5 (n=8)	
Guaymas (verano)	18.9 (n=7)	27 (n=10)	<b>54</b> (n=20)	

Los valores superiores de la matriz corresponden al análisis de la forma del cuerpo de invierno (PoAsCo = 72.3%); los valores de la matriz inferior corresponden al análisis de la forma del cuerpo de verano (PoAsCo = 62.7%). Los valores en negrita en diagonal de cada matriz muestran los porcentajes de clasificación correctos por zona. Tamaño de muestra = número de individuos analizados por conjunto de datos.

Durante verano el análisis indicó diferencias significativas entre cada par DTP ( $F = 3.73$ ,  $P = <0.014$ , DTP = 0.0200, para BM-GYM;  $F = 2.91$ ,  $P = <0.024$ , DTP = 0.0196, para GYM-MAZ;  $F = 6.96$ ,  $P = <0.001$ , DTP = 0.0223, para BM-MAZ). Las dos variables canónicas indicaron también diferencias estadísticamente significativas

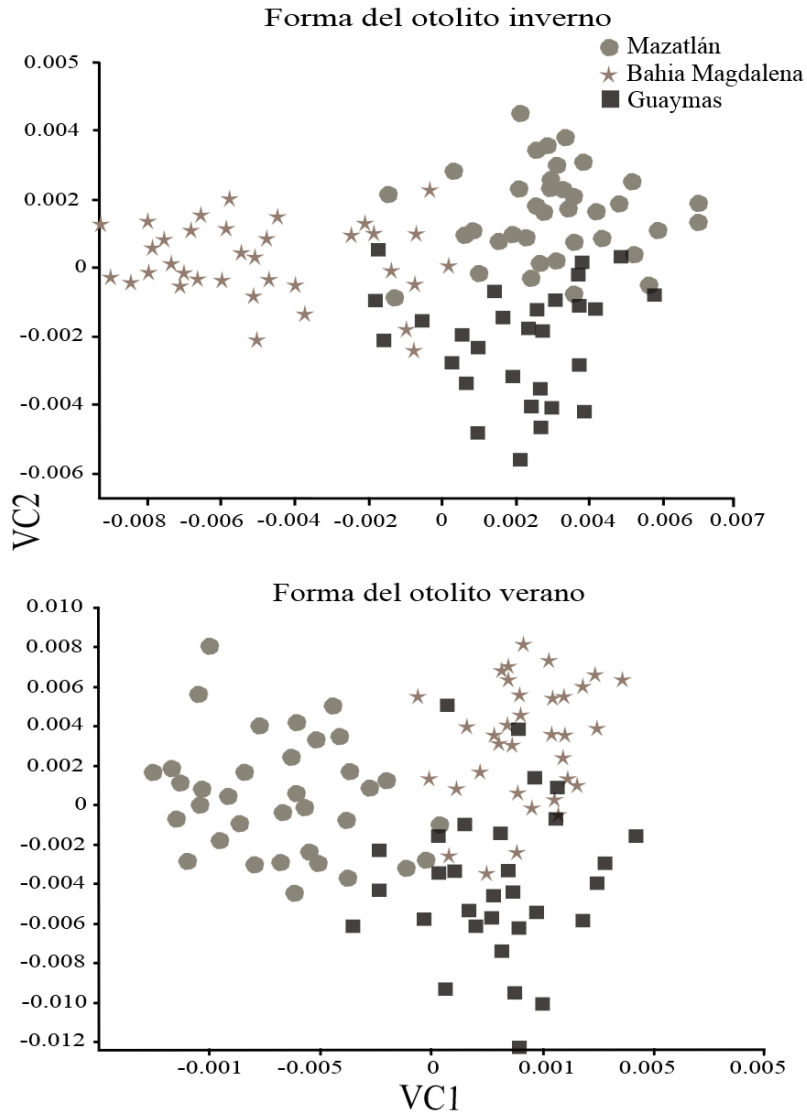
entre los grupos (Lambda de Wilk's ( $\Lambda$ )= 0.23,  $P < 0.001$  VC1; Lambda de Wilk's ( $\Lambda$ )= 0.52,  $P < 0.001$  VC2), sugiriendo la existencia de diferentes morfotipos de sardina crinuda en verano (Fig. 9). El PoAsCo fue en promedio de 62.7%. El grupo de MAZ fue quien presentó el valor más alto (67.4%), y el más bajo se obtuvo para GYM (54.0%). De forma similar a lo que ocurrió en invierno, hubo un error de asignación promedio menor entre los individuos de BM-MAZ y un error mayor entre los peces de GYM-MAZ y GYM-BM (Tabla 2). Tomando en cuenta las distancias de Mahalanobis, los individuos capturados durante verano en GYM mostraron una relación morfológica más fuerte con los de BM. Las mayores diferencias ocurrieron entre BM y MAZ durante ambas temporadas (Fig. 10). De acuerdo con la prueba de Mantel, no hubo correlación entre la matriz en función de la forma del cuerpo en invierno y verano ( $P = >0.677$ ).



**Figura 10.** Dendrogramas generados para cada temporada con el algoritmo UPGMA, usando la matriz de distancia Mahalanobis de la forma del cuerpo.

## Diferencias morfométricas basadas en la forma del otolito *sagitta*

Los resultados obtenidos usando otolitos fueron relativamente similares a los encontrados a partir de la forma del cuerpo. En invierno, los resultados de la prueba de F indicaron diferencias significativas en la DTP entre los individuos de BM–GYM ( $F = 7.52$ ,  $P = <0.001$ ,  $DTP = 0.0640$ ) y BM-MAZ ( $F = 12.48$ ,  $P = <0.001$ ,  $DTP = 0.721$ ), pero no entre los individuos de GYM-MAZ ( $F = 1.98$ ,  $P = >0.062$ ,  $DTP = 0.0188$ ). Sin embargo, con base en las diferencias significativas encontradas al usar la forma del cuerpo, consideramos estos grupos (GYM-MAZ) diferentes; y en consecuencia, realizamos un CVA para otolitos teniendo en cuenta los tres grupos con la intención de maximizar las posibles diferencias morfométricas. El resultado del CVA mostró que las dos variables canónicas indicaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Lambda de Wilk's ( $\Lambda$ )= 0.12,  $P < 0.001$  VC1; Lambda de Wilk's ( $\Lambda$ )= 0.43,  $P < 0.001$  VC2), soportando la idea de la existencia de diferentes morfotipos de acuerdo a las características del otolito (Fig. 11). El PoAsCo fue en promedio de 67.3%, menor que el encontrado basado en la forma del cuerpo. Los valores más altos fueron obtenidos en los individuos de MAZ (78.3%), y los valores más bajos en los de BM (57.1%) (Tabla 3). El error de asignación promedio más bajo se produjo entre los individuos de BM-MAZ, y los más altos entre los individuos de GYM-MAZ y GYM-BM (Tabla 3). Con base en las distancias de Mahalanobis, los peces de GYM y MAZ tuvieron las diferencias morfológicas más bajas, y los peces de BM y MAZ mostraron las diferencias más grandes (Fig. 12).



**Figura 11.** Diagrama de dispersión generado a partir de los scores de las variables canónicas para la forma del otolito; invierno (arriba) y verano (abajo).

**Tabla 3.** Matriz de asignación (%) generada a partir del CVA para la forma del otolito. Los renglones representan los grupos originales y las columnas los grupos sugeridos por el modelo. La diagonal, representa los individuos correctamente identificados.

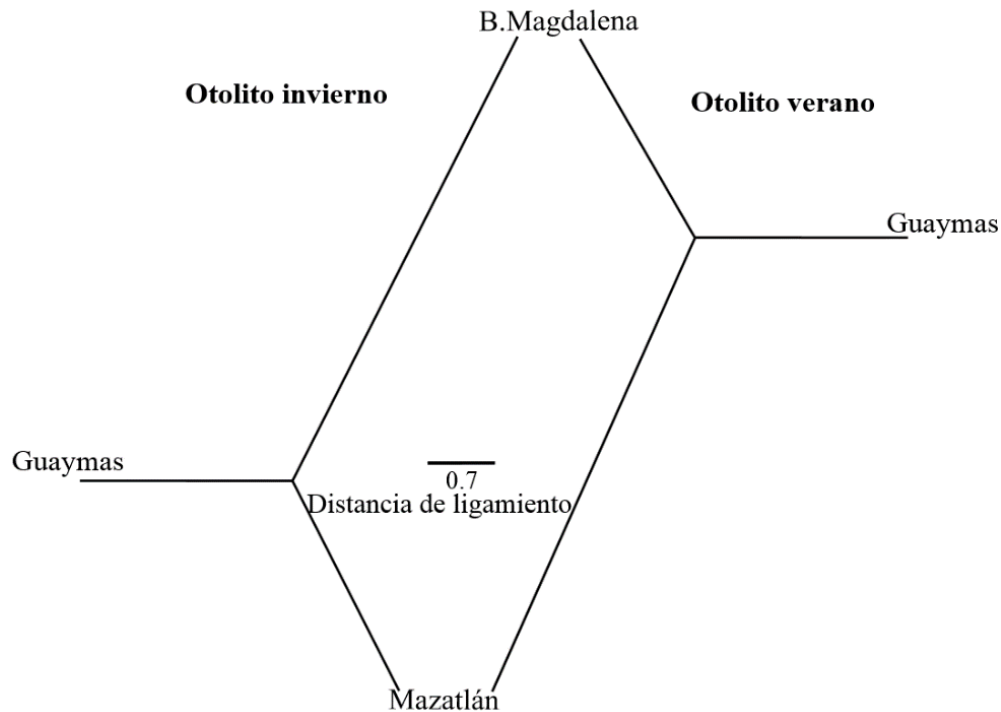
Zona	Mazatlán (MAZ)	Bahía Magdalena (BM)	Guaymas (GYM)	n
Mazatlán (invierno)	<b>78.3</b> (n=29)	5.40 (n=2)	16.2 (n=6)	102
Bahía Magdalena (invierno)	22.8 (n=8)	<b>57.1</b> (n=20)	20 (n=7)	
Guaymas (invierno)	20 (n=6)	13.3 (n=4)	<b>66.6</b> (n=20)	
Mazatlán (verano)	<b>77.1</b> (n=27)	8.5 (n=3)	14.2 (n=5)	102
Bahía Magdalena (verano)	11.1 (n=4)	<b>41.6</b> (n=15)	47.2 (n=17)	
Guaymas (verano)	9.67 (n=13)	38.7 (n=12)	<b>51.6</b> (n=16)	

Los valores superiores de la matriz corresponden al análisis de la forma del otolito de invierno (PoAsCo = 67.6%); los valores de la matriz inferior corresponden al análisis de la forma del cuerpo de verano (PoAsCo = 56.8%). Los valores en negrita en diagonal de cada matriz muestran los porcentajes de clasificación correctos por zona. Tamaño de muestra = número de individuos analizados por conjunto de datos.

Para los datos correspondientes a verano, el análisis basado en la prueba F indicó diferencias significativas entre cada par de DTP ( $F = 6.29$ ,  $P = <0.001$ , DTP = 0.0601, para BM–GYM;  $F = 25.86$ ,  $P = <0.001$ , DTP = 0.1212, para GYM-MAZ;  $F = 12.10$ ,  $P = <0.001$ , DTP = 0.0853, para BM-MAZ). Hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos solo para la primera variable canónica (Lambda de Wilk's ( $\Lambda$ )= 0.14,  $P < 0.001$ ), dando soporte a la existencia de diferentes morfotipos tomando en cuenta las características del otolito (Fig. 11). El PoAsCo fue en promedio de 56.8%, más bajo que el encontrado en invierno y el



encontrado para la misma temporada basado en la forma del cuerpo. Los valores más altos fueron encontrados en los peces de MAZ (77.1%), y los más bajos en los peces de BM (41.6%) (Tabla 3). De manera similar a lo que ocurrió en invierno, y a lo que se encontró para ambas estaciones considerando la forma del cuerpo, el error de asignación promedio más bajo ocurrió entre los peces de BM-MAZ, y el más alto entre los peces de GYM-MAZ y los de GYM-BM (Tabla 3). Con base en las distancias de Mahalanobis, los peces de GYM-BM presentaron las diferencias morfológicas más bajas, y similar a lo ocurrido en invierno, los peces de BM-MAZ presentaron las diferencias más altas (Fig. 12). La prueba de Mantel mostro que no existe correlación significativa entre la matriz basada en la forma del otolito en invierno y verano ( $P = 0.985$ ).



**Figura 12.** Dendrogramas generados para cada temporada con el algoritmo UPGMA, usando la matriz de distancia Mahalanobis de la forma del otolito.

## Diferenciación genética basada en el ADNmt

### Diversidad genética

Se obtuvo un fragmento de 569 pb correspondiente a la región control de 125 individuos de *O. libertate*. Las secuencias fueron depositadas en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) con números de acceso Genbank MG192179-MG192303.

Se identificaron 117 haplotipos y 83 sitios polimórficos. Los valores de diversidad haplotípica fueron altos en todas las localidades (Tabla 4). ES presentó los valores más bajos ( $0.961 \pm 0.049$ ) y BM presentó los valores más altos ( $0.997 \pm 0.009$ ). La diversidad nucleotídica global fue de  $0.030 (\pm 0.016)$ , con valores que oscilaron entre los  $0.025 (\pm 0.013)$  en ES y  $0.035 (\pm 0.017)$  en GYM. En el anexo 5 se presentan las frecuencias haplotípicas para cada uno de los sitios de muestreo.

**Tabla 4.** Medidas de la diversidad genética de *O. libertate* en el Pacífico Oriental, incluyendo el número de individuos ( $n$ ), número de haplotipos mitocondriales ( $nh$ ), diversidad haplotípica ( $h$ ), diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), y desviación estándar (DE).

Sitio	$n$	$nh$	Diversidad haplotípica ( $h$ ) $\pm$ DE	Diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) $\pm$ DE
Bahía Magdalena	30	29	$0.997 \pm 0.009$	$0.033 \pm 0.016$
Guaymas	33	31	$0.996 \pm 0.008$	$0.035 \pm 0.017$
Mazatlán	35	32	$0.995 \pm 0.008$	$0.030 \pm 0.015$
El Salvador	13	11	$0.961 \pm 0.049$	$0.025 \pm 0.013$
Costa Rica	14	14	$0.990 \pm 0.027$	$0.030 \pm 0.016$

## Diferenciación y estructura genética

El AMOVA soportó la existencia de diferencias genéticas entre las poblaciones estudiadas ( $\Phi_{ST} = 0.0177$ ,  $P = 0.0088$ ). Las comparaciones pareadas de los valores de  $\Phi_{ST}$  indicaron que la principal diferenciación fue atribuible a los individuos de ES con BM y GYM (Tabla 5). Después de ajustar el nivel de significancia ( $\alpha$ ) mediante una corrección de Bonferroni, se detectaron diferencias significativas solo entre los individuos de ES y BM.

**Tabla 5.** Matriz de valores pareados de  $\Phi_{ST}$  de las secuencias de ADNmt de *O. libertate* en el Pacífico Oriental.

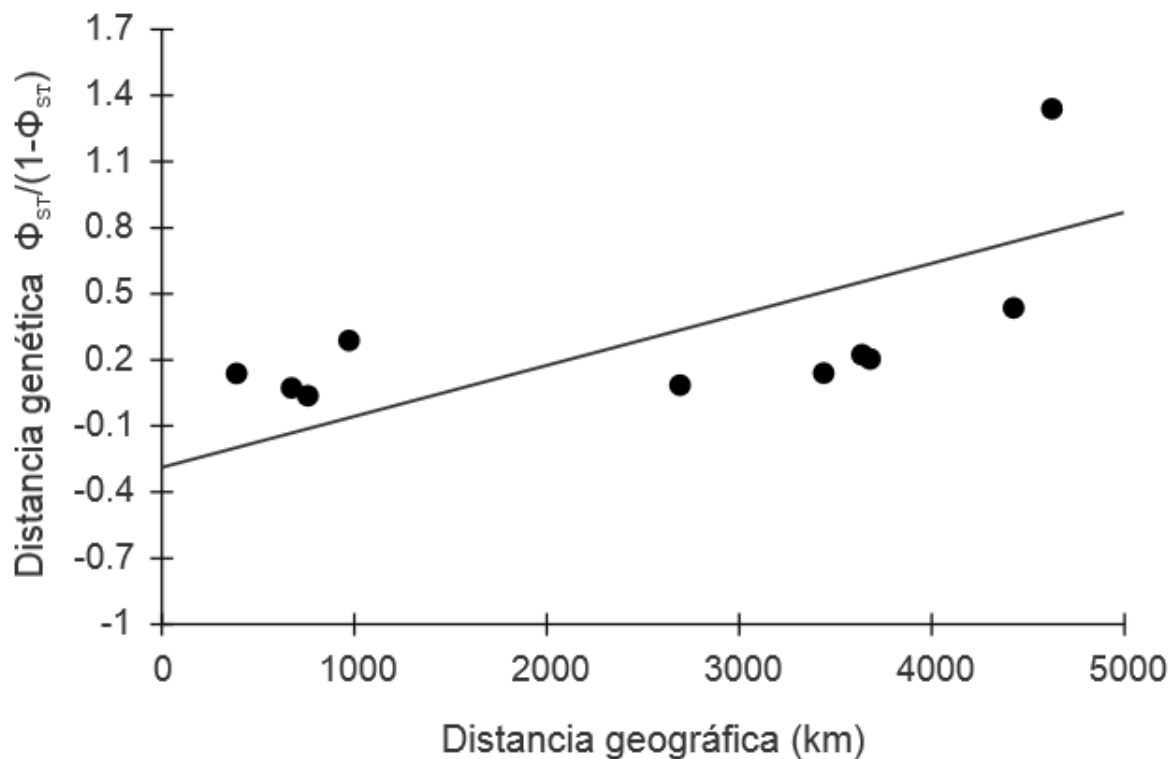
Sitios	Bahía Magdalena	Guaymas	Mazatlán	El Salvador	Costa Rica
Bahía Magdalena	0.00000				
Guaymas	0.01613	0.00000			
Mazatlán	0.01788	0.00980	0.00000		
El Salvador	*0.07318	*0.04652	0.03863	0.00000	
Costa Rica	0.0082	-0.01160	-0.02061	0.02953	0.00000

\* Los valores estadísticamente significativos a  $\alpha = 0.005$

Las comparaciones pareadas entre las distancias genéticas y distancias geográficas indicaron una correlación positiva sugiriendo aislamiento por distancia ( $r = 0.574$ ) (Fig. 13). La prueba de Mantel confirmó que la asociación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas fue estadísticamente significativa ( $P = 0.0070$ ). Sin embargo, el coeficiente de correlación fue relativamente bajo aparentemente debido a la relación entre BM y CR (distancia geográfica  $\sim 4.626$  km, distancia genética = 1.34;  $r = 0.6297$ ,  $P = 0.03$ ), el cual podría representar un dato

extremo en la correlación y predisponer la importancia de la prueba. Esto sugiere que el modelo de aislamiento por distancia no es lo suficientemente robusto para explicar la relación genética entre los sitios de muestreo.

El análisis bayesiano realizado en BAPS mostró que para las muestras incluidas en este estudio, la partición con el mayor valor de probabilidad fue  $K=1$  (log (ml) promedio de -4807.43). El resultado de la agrupación jerárquica de hierBAPS, detectó dos grupos; pero estos integraron una mezcla de especímenes de diferentes sitios.



**Figura 13.** Relación entre la distancia genética ( $\Phi_{ST}/(1-\Phi_{ST})$ ) y la distancia geográfica (km) de los cinco sitios de muestreo de *O. libertate* en el Pacífico Oriental ( $r = 0.574$ ,  $P = 0.0070$ ).

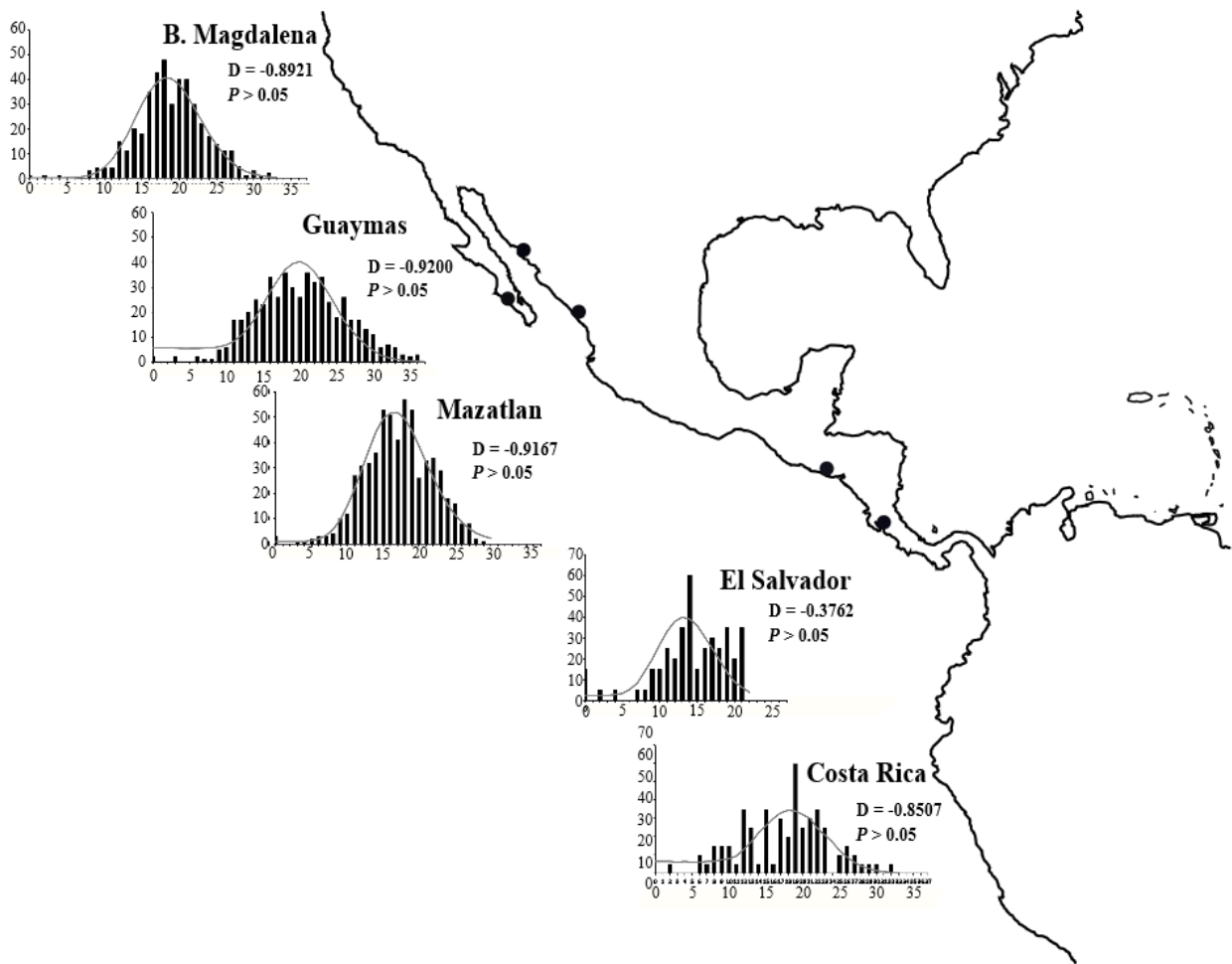
## Demografía histórica

La distribución de diferencias pareadas (mismatch distribution) mostró un patrón unimodal para las cinco zonas de muestreo, soportando un clinal, el cual refleja un gradiente latitudinal de norte a sur, con poblaciones ligeramente más estables al sur, congruente con el modelo de expansión repentina de Rogers & Harpending (1992) (Fig. 14). Las pruebas de bondad de ajuste para modelo de expansión (SSD y Hri) dieron valores pequeños y no fueron estadísticamente significativos de los valores esperados (Tabla 6), por lo que no se rechaza la hipótesis nula de expansión poblacional.

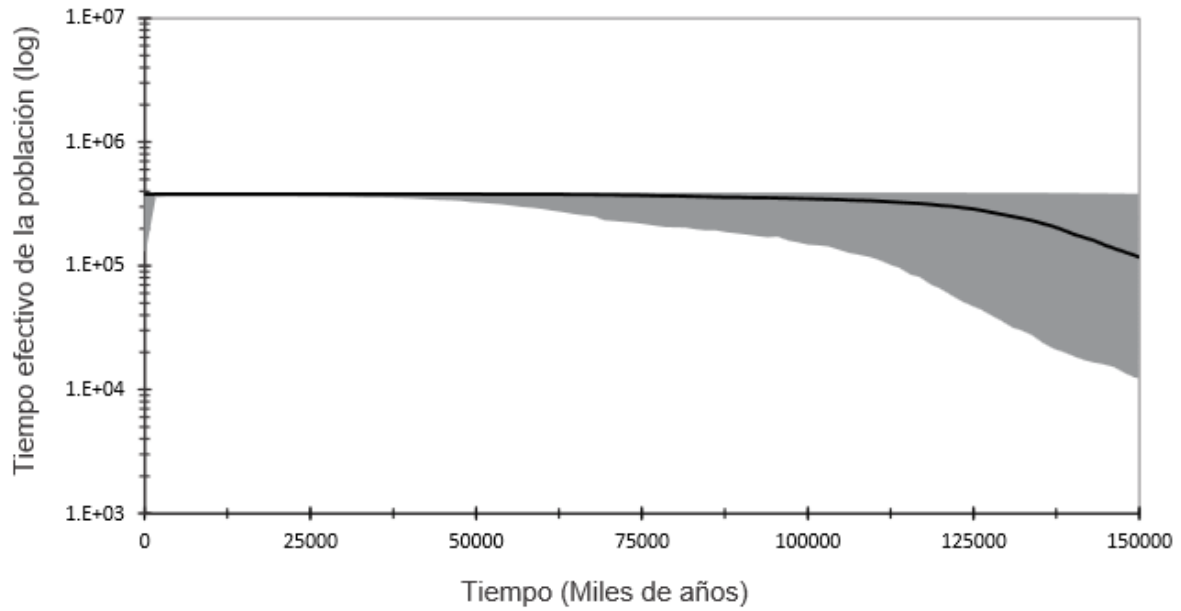
Los valores  $D$  de la prueba de Tajima fueron negativos y altamente significativos, indicando desviaciones de neutralidad en las cinco zonas (Fig. 14). Para la estimación de la fecha aproximada de expansión poblacional se utilizó el valor de  $\tau$  del total de los datos, un tiempo generacional de 1.5 años, el tamaño de secuencia de 569 pb y debido a la carencia de una tasa de mutación reportada para la región control de la crinuda se empleó el valor de 7%, considerado para la región control de la sardina monterrey (García-Rodríguez et al., 2011). Los tiempos estimados de expansión poblacional ocurrieron aproximadamente hace 261,365 años (95% IC entre 184,000 y 314,000). El análisis bayesiano Sky Plot basado en la teoría de coalescencia, mostro un tiempo de expansión de alrededor de 150,000 años atrás (Fig. 15).

**Tabla 6.** Valores de la distribución de diferencias pareadas entre secuencias de *O. libertate* en el Pacífico Oriental.

Sitios	Parámetros de expansión de poblacional			Pruebas de Bondad de ajuste			
	$\tau$	$\theta_0$	$\theta_1$	Hri	Valor $P$	SSD	Valor $P$
Bahía Magdalena	19.169	0.007	10715.0	0.0069	0.4000	0.0022	0.5670
Guaymas	20.169	0.000	91.132	0.0035	0.9480	0.0038	0.5990
Mazatlán	15.435	2.327	584.375	0.0056	0.4600	0.0019	0.5580
El Salvador	14.173	0.000	169.375	0.0353	0.2960	0.0188	0.2240
Costa Rica	19.542	0.000	68.367	0.0393	0.2370	0.0159	0.4630
Promedio	17.846	0.000	2325.69	0.0181	0.4682	0.0085	0.4822



**Figura 14.** Distribución de diferencias pareadas y valores de la prueba D de Tajima para cada una de las cinco áreas de muestreo de *O. libertate* en el Pacífico Oriental.

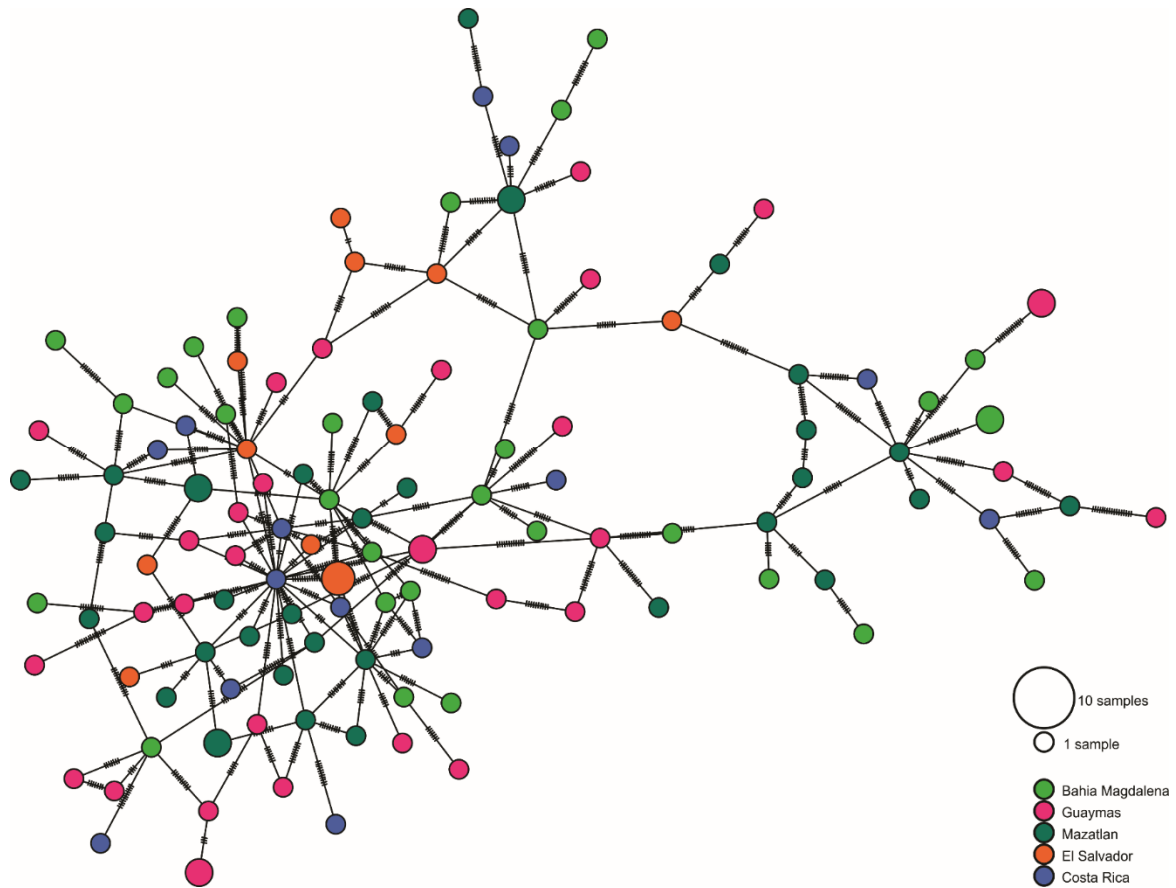


**Figura 15.** Demografía histórica de la sardina *O. libertate* estimada utilizando el análisis Bayesiano Skyline a partir de secuencias de la región control del ADNmt. El tiempo de expansión de la sardina crinuda es indicada por la terminación de la línea negra (Skyline) alrededor de 150, 000 años.



## Análisis filogeográfico

La frecuencia haplotípica fue relativamente similar en todas las localidades, y la red de mínima expansión no reflejó un claro patrón filogeográfico (Fig. 16), soportando la falta de diferenciación genética.

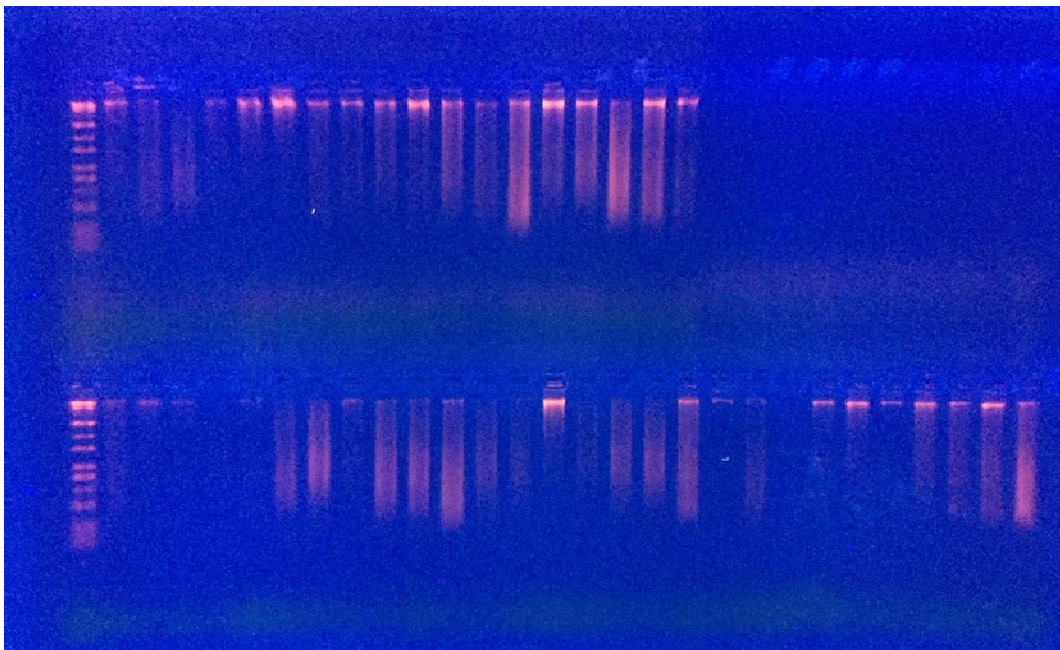


**Figura 16.** Red de mínima expansión (MJ Network) de todos los datos de sardina crinuda en el Pacífico Oriental. Cada círculo representa un haplotipo observado, el tamaño del círculo es proporcional a la frecuencia del haplotipo y el color indica cada sitio de muestreo. Bahía Magdalena (verde), Guaymas (rosa), Mazatlán (verde oscuro), El Salvador (naranja) y Costa Rica (azul marino).

## Desarrollo de librería para la detección de SNPs

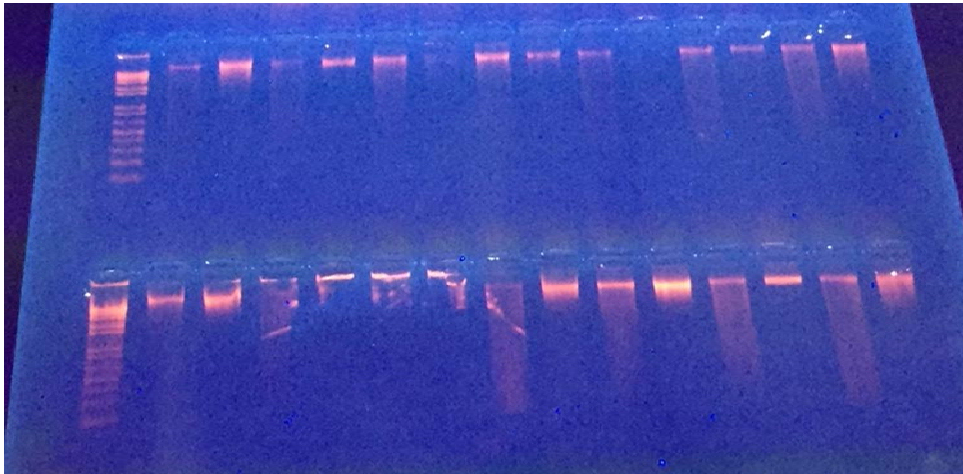
### Extracciones de ADN para detección de SNPs

Los resultados obtenidos de las extracciones de ADN a partir de electroforesis fueron distintos tipos de corridas con diferente calidad del ADN en lo que respecta a su integridad. En la figura 17 se muestra los resultados de esta electroforesis, en la cual se pudieron observar los distintos tipos de calidad de ADN: (ADN genómico, ADN degradado o una combinación de ambos). En el caso donde se obtuvo ADN genómico con alto peso molecular pero cierto barrido se aplicó una purificación con *AgenCourt Ampure Xp* a .4x para eliminar los fragmentos por debajo de 1000 pb y así se pudo mejorar la calidad del producto de la extracción. Las muestras donde solo se presentó ADN degradado no se tomaron en cuenta para posteriores análisis.



**Figura 17.** Electroforesis en gel de agarosa 1%. En cada pozo se sembraron 5 $\mu$ l de ADN extraído de la sardina crinuda más 1.5  $\mu$ l de buffer de siembra y gel red. Donde se puede observar la calidad de ADN. El marcador de peso molecular indica un rango de entre 100 y 15,000 pares de bases sembrado siempre en el primer carril en los pozos superiores e inferiores.

Posterior a la limpieza con .4x, se corrió otra electroforesis para nuevamente determinar la calidad del ADN. A partir de este punto, en todas las electroforesis se sembraron controles (+) y (-) para contrastar con los resultados obtenidos del producto directo del análisis. En la figura 18 se muestran los resultados obtenidos de este paso, evidenciando una mejora en la calidad del producto de extracción. Las muestras que presentaron buena calidad en la última electroforesis, se les realizó una cuantificación para determinar la cantidad de ADN expresada en ng/ul y así poder definir las muestras que cumplieran con los requisitos (calidad y cantidad) de ADN para el siguiente paso. La Tabla 7 indica la cuantificación de un set de la muestra total, donde se puede observar que en la columna de ng totales todos están por encima de 100 ng, que es la cantidad mínima necesaria para iniciar la digestión.



**Figura 18.** Electroforesis en gel de agarosa 1%. En cada pozo se sembraron 5µl de ADN extraído pre y post limpieza con perlas, más 1.5 µl de buffer de siembra y gel red. El cual permite observar la mejora en la calidad del producto de extracción. El marcador de peso molecular indica un rango de entre 50 y 10,000 pares de bases sembrado siempre en el primer carril en los pozos superiores e inferiores.

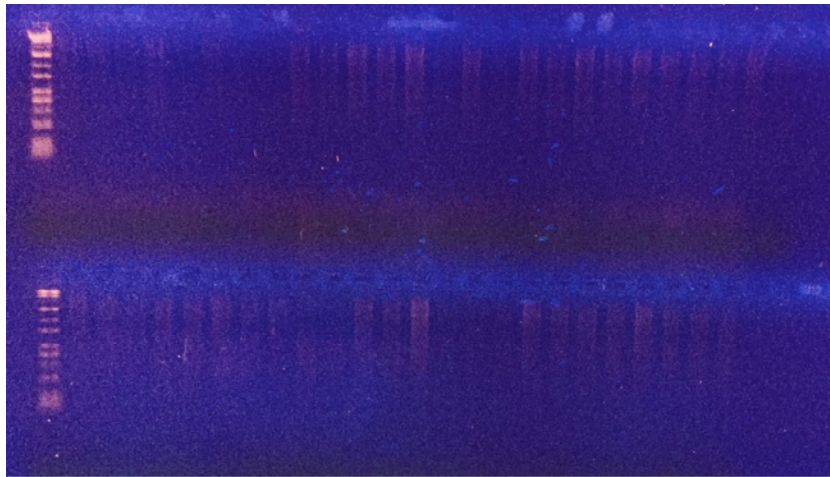
**Tabla 7.** Valores de la cuantificación con Qubit del producto de la extracción post limpieza

ID tubo	Concentración ng/ul	Volumen total muestra	ng totales	ul para digerir
1	21.6	43	928.8	9.26
2	4.42	43	190.06	45.25
3	2.87	43	123.41	69.69
4	2.69	43	115.67	74.35
5	15.9	43	683.7	12.58
6	20.3	43	872.9	9.85
7	10.5	43	451.5	19.05
8	16.6	43	713.8	12.05
9	18.5	43	795.5	10.81
10	42.6	43	1831.8	4.69
11	11.1	43	477.3	18.02
12	17.8	43	765.4	11.24
13	19.4	43	834.2	10.31
14	7.25	43	311.75	27.59
15	5.33	43	229.19	37.52
16	7.85	43	337.55	25.48
17	37	43	1591	5.41
18	43.8	43	1883.4	4.57
19	13.7	43	589.1	14.60
20	17.2	43	739.6	11.63
21	2.97	43	127.71	67.34
22	13.8	43	593.4	14.49
23	9.43	43	405.49	21.21
24	20.4	43	877.2	9.80
25	21.1	43	907.3	9.48

El número de muestras final para su posible digestión quedo de la siguiente manera 80 organismos (BM  $n= 41$ , GYM  $n= 30$ , MAZ  $n= 9$ ).

## Digestiones ddRADseq

Los resultados obtenidos de la digestión del ADN fueron los siguientes: la Figura 19 indica la corrida de las digestiones, obteniéndose un barrido (300 – 6,000 pb) en cada uno de los pozos sembrados en el gel, lo cual es indicativo de una digestión exitosa en todas las muestras. El producto de esta digestión se cuantificó para poder discernir cuales muestras cumplieran con los valores necesarios (30-50 ng) para su posterior análisis. En la Tabla 8 se incluyen como ejemplo algunos de los resultados obtenidos de esta cuantificación, donde se puede observar que la mayoría de la muestras, a excepción de las muestras (ID tubo) 22 y 23, contaron con la cantidad en ng/ul necesaria.



**Figura 19.** Electroforesis en gel de agarosa 1%. En cada pozo se sembraron 5 $\mu$ l de ADN digerido de la sardina crinuda más 2 $\mu$ l de buffer de siembra y gel red. El marcador de peso molecular indica un rango de entre 50 y 10,000 pares de bases sembrado siempre en el primer carril en los pozos superiores e inferiores.

**Tabla 8.** Valores de la cuantificación con Qubit del producto de la digestión

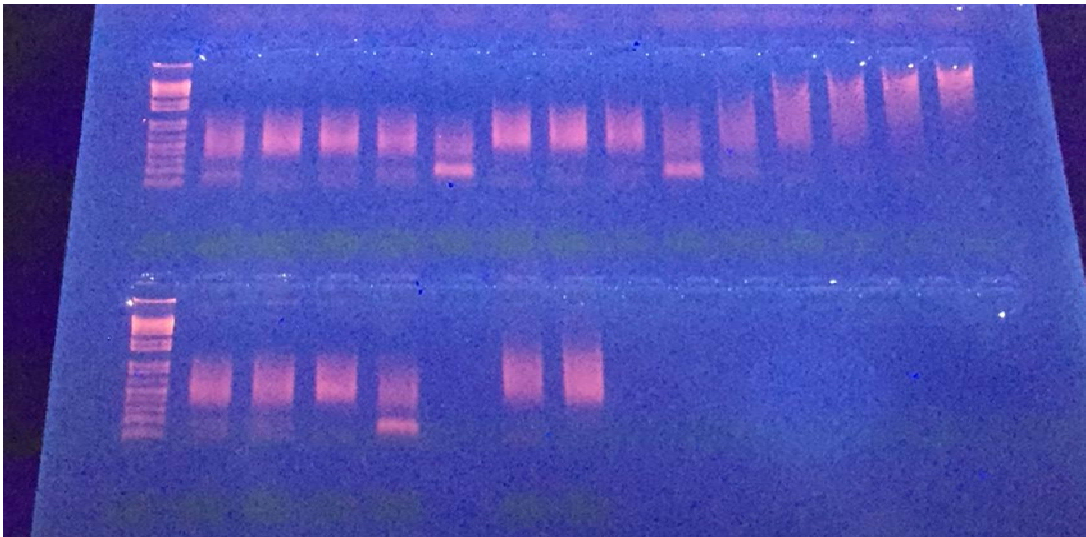
ID tubo	Concentración ng/ul	Volumen total muestra	ng totales	ul para digerir
1	2.7	43.0	115.67	18.59
2	1.5	48.0	72	33.33
3	1.0	48.0	46.176	51.98
5	2.2	43.0	96.32	22.32
6	2.4	43.0	104.92	20.49
7	1.7	43.0	70.95	30.30
8	2.8	43.0	121.69	17.67
9	2.3	43.0	97.61	22.03
10	2.5	43.0	108.36	19.84
11	1.3	43.0	55.04	39.06
12	1.4	43.0	61.06	35.21
13	2.0	43.0	87.72	24.51
14	1.3	48.0	64.3	37.31
16	1.7	48.0	81.1	29.59
17	2.6	43.0	110.51	19.46
18	1.2	43.0	50.74	42.37
19	2.3	43.0	98.04	21.93
20	2.0	43.0	86	25.00
<b>22</b>	<b>0.6</b>	<b>43.0</b>	<b>26.23</b>	<b>81.97</b>
<b>23</b>	<b>0.5</b>	<b>43.0</b>	<b>21.285</b>	<b>101.01</b>
24	2.8	43.0	122.12	17.61
25	2.5	43.0	105.35	20.41

Los valores en negro señalan los organismos que no cumplieron con la cantidad mínima necesaria (30 ng) en ng totales para sus posteriores análisis.



## Ligación de adaptadores

Como resultado de la cuantificación anterior el número de muestra disminuyó a 60 individuos debido a que 20 de ellos no lograron contar con la cantidad de ADN necesario (~30 ng) para la ligación (BM n = 32, GYM n = 20, MAZ n = 8). En la figura 20 se observa la electroforesis de las ligaciones, el barrido (300 – 2,000 pb) en cada uno de los carriles es indicativo de una ligación exitosa. Posteriormente a este producto ligado se le realizó una limpieza (1.8x) y una cuantificación. En la Tabla 9 se muestra algunos de los resultados de esta cuantificación, que permitieron proseguir con el agrupamiento (pool).



**Figura 20.** Electroforesis en gel de agarosa 1%. En cada pozo se sembraron 5 $\mu$ l de ADN ligado más 2 $\mu$ l de buffer de siembra y gel red. Los carriles 8 y 9 de los carriles inferiores son los controles + y -. El marcador de peso molecular indica un rango de entre 50 y 10,000 pares de bases sembrado siempre en el primer carril en los pozos superiores e inferiores.

**Tabla 9.** Valores de la cuantificación con Qubit del producto de la ligación

<b>ID tubo</b>	<b>Volumen total</b>	<b>Concentración ng/ul</b>	<b>ng totales</b>	<b>Mínimo</b>	<b>ul para pool</b>
1	43	0.226	11.3	2.33	10.31
2	43	0.444	22.2	2.33	5.25
3	43	0.199	9.95	2.33	11.71
5	43	0.434	21.7	2.33	5.37
6	43	0.327	16.35	2.33	7.13
7	43	0.134	6.7	2.33	17.39
8	43	0.403	20.15	2.33	5.78
9	43	0.753	37.65	2.33	3.09
10	43	0.66	33	2.33	3.53
11	43	0.409	20.45	2.33	5.70
12	43	0.466	23.3	2.33	5.00
13	43	0.493	24.65	2.33	4.73
14	43	0.484	24.2	2.33	4.81
16	43	0.478	23.9	2.33	4.87
17	43	0.246	12.3	2.33	9.47
18	43	0.802	40.1	2.33	2.91
19	43	0.434	21.7	2.33	5.37
20	43	0.43	21.5	2.33	5.42
22	43	0.934	46.7	2.33	2.49
23	43	0.995	49.75	2.33	2.34
24	43	0.337	16.85	2.33	6.91



## Agrupamiento (*Pool*)

Como resultado de la última cuantificación necesaria para realizar el agrupamiento el número de muestras se redujo a 32 individuos (BM=8, GYM= 14, MAZ=10), ya que del resto de las muestras no fue posible obtener la cantidad suficiente de ADN necesaria para su posterior análisis. De 12 Index disponibles, solo se utilizaron 10 Index (Index 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12) agrupados como se muestra en la Tabla 10. Después de realizar el pool se realizó una cuantificación virtual, es decir, se cuantificó la suma del volumen final por Index y en el caso donde el volumen final estuvo por encima de los 30  $\mu$ l se les realizó una limpieza para homogeneizar las muestras a 30  $\mu$ l. En la Tabla 11 se muestra que los pool 2, 4, 5, 6, 7 son a los que se les tuvo que aplicar esta limpieza ya que superaron los 30  $\mu$ l necesarios para el siguiente paso; el resto de las muestras fue posible cargarlo directo al casete del Pippin prep.

**Tabla 10.** Distribución del agrupamiento (pool)

<b>INDEX</b>	<b>No de organismos</b>
2	3
4	4
5	4
6	3
7	3
8	3
9	3
10	3
11	3
12	3
<b>TOTAL</b>	<b>32</b>

**Tabla 11.** Valores de la cuantificación con Qubit del producto del agrupamiento

<b>INDEX</b>	<b>Concentración ng/ul</b>	<b>Vol. Total</b>	<b>ng totales</b>
<b>2</b>	<b>0.405</b>	<b>38.48</b>	<b>15.59</b>
<b>4</b>	<b>0.461</b>	<b>44.64</b>	<b>20.58</b>
<b>5</b>	<b>0.425</b>	<b>50.47</b>	<b>21.45</b>
<b>6</b>	<b>0.522</b>	<b>35.61</b>	<b>18.59</b>
<b>7</b>	<b>0.53</b>	<b>39.07</b>	<b>20.71</b>
8	0.893	18.56	16.58
9	0.643	23.81	15.31
10	0.588	30.30	17.82
11	0.457	20.80	9.51
12	0.74	17.42	12.89

Los valores en negro fueron a los que se les realizo una limpieza posterior al agrupamiento

#### Selección de tamaño

Una vez realizada la selección de tamaños en Pippin Prep, se realizó una cuantificación pre y post limpieza de este producto, donde se obtuvieron valores muy bajos y el equipo Qubit no pudo dar la lectura.

## DISCUSIÓN

La sardina crinuda se distribuye en la franja 30°N a 30°S en el Pacífico Oriental, sustentando pesquerías importantes, particularmente en las costas de México (Jacob-Cervantes & Aguirre-Villaseñor, 2014), Costa Rica (Vega-Corrales, 2010) y Ecuador (Gonzales & Solís, 2010). La importancia que ha adquirido la sardina crinuda a nivel internacional ha captado el interés científico para llevar a cabo estudios relativos a su biología y pesquería (Jacob-Cervantes, 2010). En el presente estudio se aporta información sobre la detección de grupos fenotípicos y genéticos, con la intención de inferir la estructura poblacional de la especie *O. libertate* a lo largo de su distribución geográfica. En consecuencia, se espera aportar información que pueda ser tomada en consideración para un manejo multinacional del recurso.

### **Análisis de grupos fenotípicos**

Mediante el uso de morfometría geométrica fue posible identificar diferencias en la forma del cuerpo y el otolito de la sardina crinuda *O. libertate*, soportando la existencia de al menos tres diferentes morfotipos o *stocks* fenotípicos en el noroeste del Pacífico mexicano.

Las variaciones en la forma de estructuras anatómicas están asociadas a la edad de los individuos con crecimiento individual y tendencia a la alometría (Gould, 1966; Alberch *et al.*, 1979; Klingenberg, 1998). En el presente estudio todos los individuos analizados fueron adultos ( $\geq 120$  mm SL) (Berry and Barret 1963; Jacob-Cervantes & Aguirre-Villaseñor, 2014; Pérez-Quiñonez *et al.*, 2017), por lo tanto, las diferencias encontradas no estuvieron relacionadas con efectos alométricos (Félix-Uraga *et al.*, 2005; Ramírez-Pérez *et al.*, 2010).

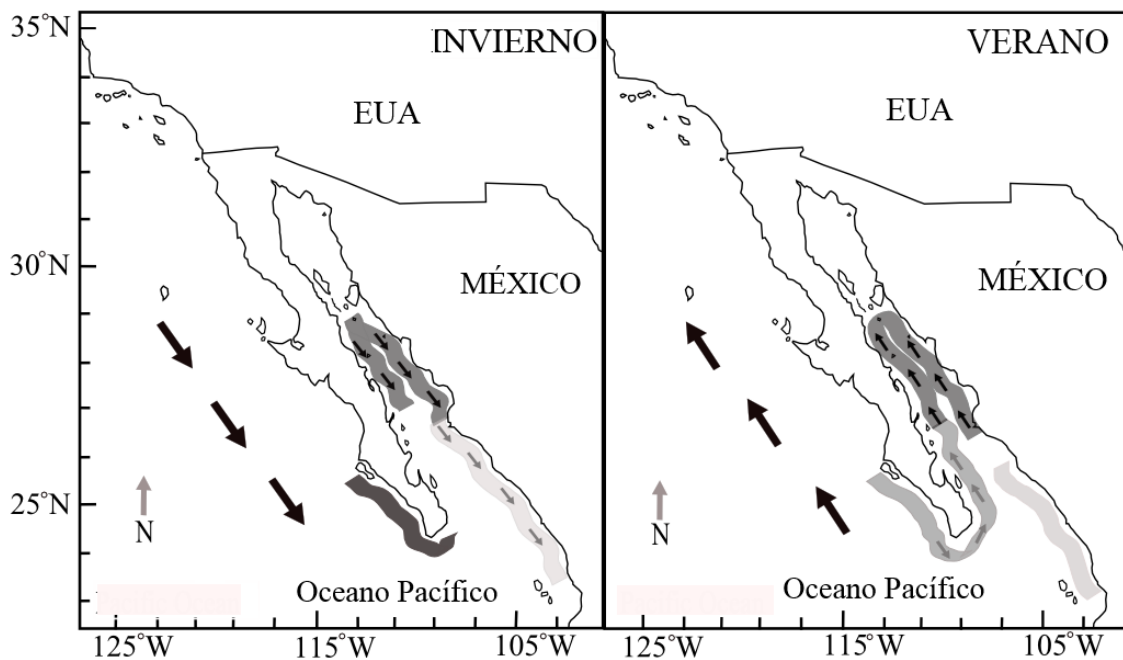
La forma del cuerpo tuvo un mayor poder discriminante que la forma del otolito. En todos los casos, para los análisis basados en la forma del cuerpo la Distancia Total Procrustes (DTP) y las dos variables canónicas obtenidas fueron significativas, mientras que para los análisis basados en la forma del otolito las diferencias entre

las sardinas crinudas obtenidas en GYM y MAZ fueron no significativas (aunque marginal  $P = 0.06$ ) en invierno. En verano solo una variable canónica fue estadísticamente significativa. Los resultados obtenidos a partir de la matriz de asignación *a posteriori* (basada en las distancias de Mahalanobis) también expresan las observaciones previas (Vergara-Solana *et al.*, 2013). Una posible explicación para las diferencias encontradas a partir de la forma de cuerpo y de los otolitos podría estar relacionada con la cantidad de cobertura empleada en cada estructura por las *landmarks* y *semi-landmarks*, debido a que el morfo-espacio puede verse afectado por el aumento en el número de marcas, y la diferenciación entre grupos puede ser más clara (Farré *et al.*, 2016). Sin embargo, debido a que un mayor número de marcas fue usado para el análisis de los otolitos, se considera que la forma del otolito no estuvo sobre representada. En todos los casos, se consideró un número mayor de especímenes que *landmarks*, tomando en cuenta que en estadística multivariada, es deseable tener tamaños de muestra varias veces mayores que el número de variables para evitar el sobreajuste (Tabachnick & Fidell 1989; Elliot *et al.*, 1995). Por lo tanto, se soporta que los resultados obtenidos no son indicativos de algún efecto metodológico, si no que se deben a que los otolitos son estructuras menos variables que la forma del cuerpo, como se ha observado en otras especies (Vergara-Solana *et al.*, 2013).

A pesar de relativamente menor resolución en la detección de diferencias entre grupos cuando se utilizan otolitos, ambas estructuras proporcionaron resultados congruentes entre sí, indicando que la forma del cuerpo y otolito de la sardina *O. libertate* permiten la detección de diferentes morfotipos en las áreas muestreadas del noroeste del Pacífico mexicano. Ambas estructuras indicaron que las sardinas de GYM comparten la mayor afinidad morfológica con las sardinas de BM en verano y con las de MAZ en invierno, y que las sardinas de estos dos últimos sitios presentan las mayores diferencias entre ellas en ambas estaciones del año.

La explicación de las diferencias fenotípicas detectadas entre los tres grupos podrían estar relacionados con los patrones de migración latitudinal y longitudinal de los individuos, asociados a los requerimientos alimentarios y al desove (Sokolov,

1974; Lluch-Belda *et al.*, 1986). Basado en esto, se sugiere el siguiente modelo conceptual (Fig. 21) sobre los desplazamientos espaciales de la sardina crinuda para explicar las similitudes y diferencias en la forma de las estructuras de los peces en las tres zonas de pesca. El modelo es congruente con la variación del promedio mensual de la TSM (Fig. 6), y con el sistema de corrientes que se da en la región.



**Figura 21.** Modelo de distribución espacio-temporal de la hipótesis de tres *stocks* de sardina crinuda (*O. libertate*). La línea gruesa negra representa el *stock* de B = Bahía de Magdalena, la gruesa línea gris representa el *stock* de G = Guaymas; y la línea gruesa gris pálida representa el *stock* de M = Mazatlán. Los tamaños de las flechas no representan las intensidades de la corriente, ni los movimientos de las poblaciones, solo son indicativos de la dirección principal.

Durante el invierno los tres *stocks* iniciarían un desplazamiento hacia el sur, coincidiendo con la intensificación de la CC Fig. 21 flechas hacia el sur) (Pavlova *et al.*, 1986; Gonzales-Ruelas, 1995), la cual presenta una mayor influencia hacia la boca del Golfo de California (Bernal *et al.*, 2001) y facilitaría el desplazamiento del *stock* de BM hacia la boca del Golfo. El patrón de vientos (norte-sur) (e.g., Carbajal, 1993; Beier, 1997; Tanahara-Romero, 1997; Palacios-Hernández, 2001; Marinone, 2003), incidiendo en la circulación marina, permitiría que los organismos dentro del Golfo de California, alcanzaran en primavera su distribución más sureña obteniendo como resultado la mezcla del *stock* de GYM con el *stock* de MAZ. En verano se inicia el desplazamiento hacia el norte de los tres *stocks* coincidiendo con el debilitamiento de la CC, intensificación del flujo de la CCE Fig. 21 flechas hacia el norte) y el cambio en el patrón de vientos (sur-norte) (e.g., Carbajal, 1993; Beier, 1997; Tanahara-Romero, 1997; Palacios-Hernández, 2001; Marinone, 2003). Este escenario permitiría a los organismos alcanzar en otoño su distribución más norteña y la mezcla de una fracción del *stock* de BM con el *stock* de GYM.

Los cambios estacionales en los patrones de viento juegan un papel dominante en la formación de grupos de peces (Sokolov, 1974) y su relación con el aprovechamiento de zonas de alta productividad. Los vientos soplan de norte a sur en invierno, y la CC es más fuerte en esta época. Durante este periodo la influencia de la CCE sobre la costa de la Península de Baja California disminuye (Pavlova, 1966; Hickey, 1979; Parés-Sierra *et al.*, 1997; Talley, 1993; Pérez-Brunius *et al.*, 2007). Esto favorece el afloramiento de aguas sub-superficiales frías ricas en nutrientes, resultando en la formación de áreas con alta productividad biológica frente a la costa occidental de la Península de Baja California y la costa este del Golfo de California. En consecuencia, se crean las condiciones favorables para la alimentación de especies pelágicas como arenque, sardinas y anchovetas (Sokolov, 1974). Estas condiciones físico-biológicas podrían permitir la migración de organismos de BM hacia el sur, a lo largo de la costa occidental de la península, limitando su desplazamiento hacia la boca del Golfo de California. Al mismo tiempo, los organismos GYM se desplazarían hacia el sur, a lo largo de la costa este del golfo, permitiendo la mezcla de peces de GYM y MAZ. (Fig. 21).

En verano la CC se debilita, y se fortalecen los vientos del sur al igual que el flujo de la CCE (Pavlova, 1966; Hickey, 1979; Talley, 1993; Parés-Sierra *et al.*, 1997; Pérez-Brunius *et al.*, 2007). Las áreas costeras con alta productividad biológica aparecen en la parte occidental del Golfo de California, creando las condiciones favorables para que las sardinas de BM, las cuales iniciaron su desplazamiento hacia el sur en invierno, continúen su desplazamiento en dirección a la parte central del golfo a través de la costa occidental del mismo. Los organismos que se concentraron en el área de MAZ se desplazan hacia el norte a lo largo de la costa este del golfo hasta que alcanzar la parte media del golfo, y al mismo tiempo en esta época y bajo estas condiciones las sardinas presentan su pico máximo de reproducción. Saldierna-Martínez *et al.*, (1995) señalan que las mayores tasas de desove en la especie ocurren en verano, con el máximo de desove en la parte central del golfo, en el área entre GYM y Punta Lobos. Esto podría explicar la mayor similitud morfológica en los peces de BM y GYM en verano. Un mecanismo de migración (direccional y estacional) similar ha sido observado en la sardina del Pacífico *Sardinops sagax* (Sokolov, 1974; Félix-Uraga *et al.*, 2004; 2005) y en el calamar gigante *Dosidicus gigas* (migración estacional) en el Golfo de California (Ehrhardt *et al.*, 1983), con movimientos a lo largo de ambas costas del golfo y a lo largo de la costa occidental de la península, dependiendo de las condiciones en el ambiente marino.

Los resultados encontrados a partir del análisis de la forma del cuerpo y otolito tienen considerables efectos potenciales en la detección de grupos fenotípicos de sardina crinuda. El uso de otolitos ha sido de gran utilidad para la determinación de la edad y en detección de *stocks* (Blood, 2003; Edwards *et al.*, 2005; Polat *et al.*, 2005; Vergara-Solana *et al.*, 2013). La forma del cuerpo, también ha demostrado ser útil para la discriminación de especies (De La Cruz-Agüero *et al.*, 2015; Pérez-Quñonez *et al.*, 2017) y la delimitación de *stocks* (Ramírez-Pérez *et al.* 2010; García-Rodríguez *et al.*, 2011; Vergara-Solana *et al.*, 2013). Los resultados encontrados en este estudio sugieren que por lo menos tres morfotipos de sardina crinuda están distribuidos en el noroeste del Pacífico mexicano, y que el morfotipo de GYM presenta las más altas similitudes con los otros dos grupos (BM y MAZ),

dependiendo la época del año. En cualquiera de las temporadas y bajo el análisis de cualquiera de las estructuras (cuerpo u otolito) el grupo de BM y MAZ siempre presentaron entre ellos los fenotipos más distantes.

El análisis de la estructura poblacional de una especie, es de gran importancia en el desarrollo de una estrategia óptima para su eficiente explotación. Si los administradores pesqueros incluyeran variaciones intra-específicas en sus consideraciones, podrían necesitar información sobre las diferencias biológicas entre los grupos de especies locales y comprender los procesos tanto genéticos como ecológicos que estén influenciando en la separación (MacLean & Evans, 1981). Por lo tanto, la identificación y delimitación de *stocks* debe ser considerado como requisito previo a la evaluación de alguna pesquería (Cadrin *et al.*, 2005).

### **Análisis de grupos genéticos**

A pesar de la importancia comercial que ha adquirido la sardina crinuda, hasta la fecha no existen trabajos publicados en donde se haya inferido la estructura genética poblacional de *O. libertate* en ninguna región a lo largo de su distribución geográfica. El único trabajo realizado ha sido empleando alozimas con individuos procedentes de BM para abordar la problemática de la identificación taxonómica del complejo *Opisthonema* (Hegecock *et al.*, 1988).

### **Diversidad genética**

El análisis poblacional de *O. libertate* realizado con el ADNmt mostró niveles relativamente altos de variabilidad genética, lo cual puede observarse a partir del número de haplotipos y los valores promedio estimados de diversidad haplotípica y diversidad nucleotídica. Dichos niveles de variabilidad concuerdan con los valores reportados para diversas especies de peces marinos basados en secuencias de la región control (Tabla 12), los cuales se caracterizan por ser especies con poblaciones grandes y elevado flujo genético. Una alta diversidad genética es



característica de poblaciones grandes con tamaño constante en escalas de tiempo evolutivo (Kimura, 1983). Algunas características biológicas de los pelágicos menores, podrían contrarrestar la pérdida de variabilidad genética debida a colapsos demográficos. Warner & Chesson (1985) sugieren que largos periodos reproductivos y alta fecundidad generan amplia contribución de las clases adultas al pool genético de la siguiente generación, creando un “efecto de almacenamiento” genotípico. Esto incrementa la probabilidad de que alguna clase de edad que no se haya reproducido en cierto año por condiciones desfavorables, lo haga exitosamente al siguiente. Gaggiotti y Vetter (1999) sugirieron un fuerte efecto de almacenamiento en la sardina, ya que se reproduce a partir de su primer año de edad y libera hasta 200,000 huevos por estación (Butler *et al.*, 1996). Suponiendo que la sardina crinuda presente características reproductivas similares a la sardina monterrey del “stock templado y cálido” (Felix-Uraga *et al.*, 2004), este efecto de almacenamiento permita que la sardina sea resistente a la disminución en su variabilidad genética en respuesta a los colapsos en el reclutamiento o en abundancia, inducidos por condiciones desfavorables. Por otro lado, la baja variabilidad se encuentra generalmente en poblaciones donde el tamaño efectivo de la población es pequeño (Avice 2000, Grant *et al.*, 1998). Particularmente para *O. libertate* la inferencia de un gran tamaño poblacional es congruente con los altos de diversidad haplotípica y nucleotídica, sugiriendo que las reducciones que han ocurrido en el tamaño poblacional por condiciones desfavorables no han tenido un efecto importante sobre el tamaño efectivo poblacional.

**Tabla 12.** Diversidades haplotípicas y nucleotídicas registradas en cupleidos

<b>Especie</b>	<b><i>h</i></b>	<b><math>\pi</math></b>	<b>Área geográfica</b>	<b>Autor (es)</b>
<i>Sardinops sagax</i>	0.99	0.01	Noroeste de México	García-Rodríguez <i>et al.</i> (2011)
<i>Scomberomorus sierra</i>	0.16	0.02	Pacífico mexicano	Ramírez-Pérez (2010)
<i>Istiophorus platypterus</i>	0.96	0.007	Pacífico Oriental	Rubio-Castro <i>et al.</i> (2015)
<i>Opisthonema libertate</i>	0.98	0.09	Pacífico Oriental	Presente estudio

## Diferenciación genética

Los resultados obtenidos del AMOVA indicaron baja diferencia genética entre localidades. Las comparaciones pareadas ( $\Phi_{ST}$ ) indicaron que las diferencias podrían ser atribuidas a las sardinas de ES. Sin embargo, estos resultados no fueron soportados por los análisis Bayesianos o por el patrón filogeográfico inferido por la red de mínima expansión (Fig. 16).

Una de las causas de las diferencias genéticas encontradas en las sardinas de ES podría deberse al limitado número de muestras; lo cual podría haber influido en el hallazgo aleatorio de haplotipos poco comunes, dando lugar a diferencias poblacionales. Relacionado con esto, las muestras de ES fueron los únicos especímenes obtenidos de la pesca artesanal costera con métodos más selectivos, es decir, los métodos, materiales y filosofías difieren en comparación con las prácticas de pesca pelágica de base amplia de las pesquerías comerciales en todas las demás localidades de muestreo. En consecuencia, los especímenes podrían pertenecer a cohortes similares y presentar una diversidad genética relativamente baja (Tabla 4), y mayores diferencias genéticas. Otra causa podría ser la conectividad de la población (Cowen & Sponaugle, 2009; Lowe & Allendorf, 2010) concepto que surge cuando la dispersión de los individuos en el medio marino se combina con factores que conducen a su supervivencia (e.g. factores biológicos, físicos y biofísicos). Implícito en esta definición es el nivel de intercambio que debe ser suficiente para impactar las tasas demográficas de la (s) población (s) local (es) (Cowen & Sponaugle, 2009). Para la mayoría de las especies marinas costeras como la sardina crinuda, la fase larval es la etapa de dispersión dominante; con una duración de 48 días en su etapa larval la sardina crinuda podría incluirse en este contexto. Alternativamente las diferencias podrían ser relacionadas al parcheo caótico genético el cual está relacionado con la aparición de una estructura poblacional local leve o microgeográfica pero significativa a pesar del gran potencial de flujo de genes entre las subpoblaciones (García-Rodríguez *et al.*, 2011). Ocurre cuando hay supervivencia diferencial de individuos con un genotipo particular. Por lo tanto, es posible que las diferencias poblacionales encontradas pudieran deberse

a la variación en la composición genética de los reclutas (Hedgecock, 1994). Una diferencia mayor en el éxito reproductivo puede dar lugar a una heterogeneidad en los pre-reclutas, y la selección natural a lo largo de un gradiente ambiental puede conducir diferencias posteriores al reclutamiento (Johnson & Black 1984; Hedgecock, 1994). La heterogeneidad genética caótica también se ha sugerido para otras especies de pelágicos del Pacífico Oriental, específicamente para la anchoveta de California *Engraulis mordax* (Hedgecock, 1994). Procesos similares podrían ocurrir en la sardina crinuda considerando que ambas especies muestran una dinámica poblacional relativamente similar, asociada con cambios en la abundancia en respuesta al cambio climático.

La ausencia de estructura poblacional en *O. libertate* coincide con lo reportado para otros peces pelágicos distribuidos en la región (Ramírez-Pérez *et al.*, 2010; García-Rodríguez *et al.*, 2011; Rubio-Castro *et al.*, 2016). El tamaño efectivo poblacional, la capacidad migratoria, la amplia distribución geográfica y el transporte pasivo de huevos y larvas son mecanismos importantes para la existencia de un alto flujo genético en organismos pelágicos tales como la sardina crinuda. Especies pelágicas con larvas planctónicas son transportadas de manera pasiva por las corrientes marinas y sumada al movimiento activo de los adultos crea niveles adicionales de conectividad a escalas espaciales superiores a las de las especies costeras o bentónicas (Bowen & Grant, 1997). Los patrones de movimiento de peces pelágicos están asociados con la naturaleza abierta y la falta de límites físicos del medio ambiente marino, lo que está en oposición a la idea de poblaciones geográficamente estructuradas con niveles limitados de flujo genético. *Opisthonema libertate* se caracteriza por ser ovoposidores parciales de huevos con variación en los períodos de deposición según la región. En la región de CR, *O. libertate* deposita huevos durante todo el año (Peterson, 1956), en el Golfo de California de junio a agosto (Páez-Barrera, 1976) y a lo largo de la costa del Pacífico de Baja California Sur la deposición ocurre en septiembre y octubre. (Torres Villegas *et al.*, 1985). En consecuencia, la larva puede encontrarse durante la mayor parte del año expuesta a las circulaciones dominantes de agua en distintas zonas del Pacífico oriental. Las circulaciones marinas tales como la CC, CCE y la corriente costera de América

Central son factores en la variación de la distribución temporal-espacial. Además, el movimiento activo de los adultos es un factor que podría explicar la homogeneidad genética espacial inferida en el estudio actual.

Varios estudios revelan diferentes patrones en los que las especies oceánicas tienden a ser genéticamente homogéneas a escalas geográficas regionales, y con frecuencia mucho más amplias, mostrando diferenciación solo entre poblaciones extremas o entre cuencas oceánicas (e.g., Alvarado-Bremer *et al.*, 1998; Reeb *et al.*, 2000; Broughton, 2002; Pujolar *et al.*, 2003; Rubio-Castro *et al.*, 2016). El Pacífico mexicano podría representar un área geográfica relativamente grande en la cual es posible detectar diferencias espaciales en peces con desplazamiento relativamente limitado; sin embargo, para algunas especies pelágicas esta área podría ser relativamente pequeña para detectar fuertes procesos micro-evolutivos, como podría ser el caso de las especies pelágicas que habitan en la región.

### **Historia demográfica**

Los altos niveles de diversidad haplotípica detectados y asociados a la existencia de una gran cantidad de linajes, podrían ser consecuencia de un proceso histórico de expansión repentina de la población, que promovió la aparición de un elevado número de mutaciones y variantes genéticas (Grant & Bowen, 1998). La red de mínima expansión (Fig. 16) y la distribución unimodal de las diferencias pareadas (Fig. 14) encontradas en este estudio son características de procesos de expansión iniciando de un relativo pequeño número de organismos (Grant & Bowen 1998).

Los tiempos de expansión estimados para *O. libertate* en el Pacífico Oriental fueron aproximadamente de 261,365 años atrás (IC 95% entre 184,000 y 314,000). La tasa de divergencia empleada en este estudio supone una tasa de divergencia similar a la estimada en otras especies; por lo que los tiempos inferidos de expansión poblacional son especulativos. El análisis Skyline también es congruente con la aparición de una expansión demográfica que comenzó hace 150,000 años. Las estimaciones concuerdan con la fecha en que ocurren las glaciaciones durante la

época del Pleistoceno, como se describe para otras especies distribuidas en el noroeste de México (Lecomte *et al.*, 2004; Domínguez-López *et al.*, 2010; García-Rodríguez *et al.*, 2011; Rubio-Castro *et al.*, 2016). La glaciación en la que concuerdan los tiempos de expansión de la sardina crinuda conocida como El Mindel-Riss (inicio hace 390, 000 años y termino hace 200, 000 años) (Penck & Bruckner, 1909). Los períodos glaciales se caracterizaron por un enfriamiento del océano y el descenso en el nivel del mar. La disponibilidad de hábitat pudo haberse reducido para la sardina crinuda, una especie de aguas cálidas, afectando el tamaño efectivo poblacional y propiciando su desplazamiento hacia regiones ecuatoriales. La distribución de las diferencias apareadas soporta un clinal, el cual refleja un gradiente latitudinal de norte a sur, con poblaciones levemente más estables al sur. Resultados similares también se observaron para el pez vela (Rubio-Castro *et al.*, 2016). Durante periodos interglaciares los eventos de expansión permiten que las poblaciones tiendan a recuperarse (Bowen *et al.*, 1998).

Los resultados encontrados en el presente estudio proveen un nuevo entendimiento en la dinámica poblacional de la sardina crinuda *O. libertate*. Debido a que no se encontraron diferencias que indiquen una estructura genética espacial congruente, no es posible soportar con nuestros datos la existencia de un limitado flujo genético a lo largo del área de distribución de la especie. Sin embargo, el análisis morfológico soportó la existencia de distintos stocks fenotípicos. Un análisis combinado a partir de los resultados encontrados de estos dos enfoques permite plantear una hipótesis:

- La sardina crinuda *Opisthonema libertate* carece de una estructura genética poblacional pero de haberla, esta podría ser notada mediante el empleo de marcadores moleculares más polimórficos y con una mayor cobertura de la información genética proveniente no solo del ADNmt sino del genoma nuclear. La detección de distintos morfotipos encontrados debe ser preponderantemente consecuencia de las distintas condiciones ambientales existentes a lo largo del Pacífico Oriental, al margen del mantenimiento de una elevada conectividad genética.

Las interrogantes ante tales resultados encontrados hasta ahora, giran en torno a evaluar si las condiciones ambientales a lo largo del rango de distribución de la especie que influyen en la formación de grupos poblacionales (e.g. el forzamiento del Océano Pacífico (frecuencias bajas y mareas), (b) vientos sobre la superficie del mar (Ripa, 1997; Marinone, 2003) y (c) flujos de calor y agua también en la superficie (Jiménez *et al.*, 2005), corrientes marinas, vórtices), pudiesen ser tan fuertes como para ser una barrera al flujo genético y si esas diferencias pudiesen reflejarse en sus parámetros de vida. Esto podría proporcionar una mejor comprensión de la biología de esta especie y reforzar la gestión de su pesquería.

Por el momento y en tanto no exista mayor información genética, se sugiere que la sardina crinuda debería ser considerada como una metapoblación total con un elevado flujo genético y en consecuencia considerar un potencial manejo compartido a lo largo de su área de distribución. La detección de distintos morfotipos debe ser considerada para futuros análisis debido a que cada uno de ellos podría mantener atributos biológicos distintos y en consecuencia requerir de estrategias de manejo particulares que incidan en una adecuada sustentabilidad del recurso.

Futuras comparaciones genéticas deberían incluir un mayor número de muestras desde la porción sur de distribución, así como marcadores moleculares más polimórficos, tales como SNPs, que pueden detectar sutiles diferencias sobre escalas geográficas relativamente pequeñas y soportar si los fenotipos detectados son productos de una plasticidad o el reflejo de poblaciones distintas

### **Evaluación del diseño de librería**

Durante la construcción de la librería genómica para la detección de SNPs empleando el protocolo descrito por Peterson *et al.* (2012), se presentaron algunos problemas metodológicos, los cuales afectaron los resultados esperados. A continuación se indican los pasos en donde se presentaron los principales inconvenientes.

No fue posible trabajar con la extracción “pura” de la primera extracción de ADN, por lo que se tuvo que hacer una modificación en el protocolo de purificación empleando perlas magnéticas. El protocolo original para la limpieza con perlas en ddRADseq sugiere limpiezas en un radio de 1.8x para eliminar tamaños pequeños de ADN, pero para mejorar la calidad de las extracciones se optó por modificar dicho protocolo seleccionando un radio de 0.4x, en el cual se pudieron eliminar fragmentos por encima de 1000 pb, y dio como resultado una extracción de ADN genómico de buena calidad (Fig. 18).

Otro inconveniente fue el número de muestras ( $n$ ) empleado para iniciar el protocolo de ddRAD seq. El  $n$  de partida en el presente trabajo fue de 80 organismos considerando las tres localidades evaluadas (BM, GYM y MAZ) y a pesar de mejorar la calidad del ADN mediante la limpieza con perlas en un radio de 0.4x, fueron muy pocos los organismos que después de este paso contaron con la cantidad adecuada de ADN para iniciar la digestión. Fumagali (2013) sugiere que se debe partir de un gran número de individuos ( $n= 500$ ).

El protocolo de Peterson *et al.* (2012) indica que la digestión puede iniciarse hasta con 100 ng de ADN como mínimo pero recomiendan sea de 200-500 ng de ADN. En nuestro trabajo iniciamos la digestión con el mínimo (100 ng) debido a que no se obtuvo de todos los organismos la concentración sugerida como ideal en el protocolo. Trabajos como el de Wang *et al.* (2013) señalan que deben considerarse 500 ng de ADN genómico, debido a que debe tomarse en cuenta la pérdida que se presenta en las futuras limpiezas requeridas en cada uno de los pasos siguientes.

Durante el proceso de digestión, se dejó un volumen de 8 ul del producto de la digestión sin limpiar, para ser utilizado como testigo en la comparación de la concentración del ADN previo y posterior a la limpieza. El resto del ADN digerido fue limpiado con perlas. El empleo de testigos en este y en los pasos subsiguientes permitió identificar el momento en donde podría ocurrir algún error. Una vez realizada la cuantificación del producto digerido previo y posterior a la limpieza se observó una pérdida promedio de alrededor del 50% del producto inicial, indicando que la limpieza en este paso es crucial y puede incidir en la disminución del número

de muestras. Vázquez-Rojas, (2018) señala que a causa de esta reducción en la cantidad de ADN en cada uno de los pasos, se tiene una concentración media de 0.57 ng/ul por individuo antes de hacer los pool.

El estado de los reactivos también fue relevante en los resultados. El almacenamiento de los reactivos del Qubit a diferentes temperaturas puede incidir en su eficacia y tener un efecto directo en los resultados de lectura, al igual que la calibración de los equipos antes de la corrida de la muestra total. Se realizaron pruebas en dos laboratorios con diferentes temperaturas ambientales y distintas fechas de calibración del equipo con los *standars* 1 y 2, y se obtuvieron valores distintos. La lectura no fue constante y en algunos casos la diferencia fue de 1.5 a 15 ng entre un laboratorio y otro, determinando la importancia de la temperatura de almacenamiento. Una vez hecha esta prueba con 5 organismos, los reactivos se dejaron siempre en el mismo tiempo de enfriamiento a temperatura ambiente en el mismo laboratorio, y así se obtuvieron lecturas constantes en cada paso posterior.

Otro inconveniente importante ocurrió durante el proceso de ligación. El protocolo original sugiere tener un *stock* de trabajo de los adaptadores P1 y P2 resuspendido en 100 ul. Pero cuando este stock fue dejado de usar por un tiempo considerable (2-3 meses) fue necesario volverlo a preparar, ya que perdía efectividad y no se realizaba la ligación. En consecuencia se sugiere preparar la cantidad necesaria del stock de trabajo en función del número de muestras que se proceda a ligar.

Durante el último paso, al intentar realizar el pool final para la selección de tamaño final se perdió el ADN que se había cuantificado y que se tenía contemplado para ser cargado en el equipo *Pippin prep*. Por tal motivo, no fue posible avanzar con el proceso.

Considerando lo anterior, es importante tener en cuenta desde un principio y durante el proceso de la generación de librerías, un tamaño de muestra considerable, una concentración de ADN adecuada, una buena calibración de los equipos y una revisión de la efectividad de los reactivos. De esta manera será posible evitar que todos estos factores influyan negativamente en la generación de librerías.



## **Recomendaciones al manejo de la pesquería de sardina crinuda *O. libertate* en el Pacífico Oriental.**

En la Carta Nacional Pesquera, documento con el cual se regulan las pesquerías en México (DOF-2017), se recomienda actualizar la norma oficial mexicana *NOM-003-PESC-1993* la cual regula la pesca de pelágicos menores incluyendo la sardina crinuda, además los temas de regionalización, tallas mínimas, calado de las redes, y áreas de pesca.

La búsqueda de indicadores biológicos útiles para el manejo de la pesquería ha sido limitada, debido a que los estudios se han centrado en la región donde se concentra el mayor esfuerzo pesquero, por ejemplo en la región noroeste del Pacífico mexicano, y en mayor medida dirigidos a la sardina monterrey. A pesar de la importancia de la sardina crinuda como recurso pesquero, la información disponible para evaluar el estado poblacional de las especies del género *Opisthonema* en el noroeste mexicano es limitada lo que podría llevar a malas estrategias de extracción del recurso.

Los resultados del presente trabajo demuestran diferencias importantes en la identificación de morfotipos en la población de sardina crinuda en el noroeste del Pacífico mexicano a distintos niveles de resolución. El análisis genético no demostró la ausencia de intercambio genético, lo cual resulta altamente informativo para sugerir la importancia de llevar a cabo un manejo compartido de la sardina crinuda a lo largo de su área de distribución.

Con base en los valores combinados de diversidad haplotípica ( $h$ ) y diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) de acuerdo con Grant y Bowen (1998) sugieren que la especie presenta una larga historia evolutiva y una población estable. Por otro lado, para cuestiones de manejo pesquero, es necesario considerar, a otro nivel, las variaciones en el fenotipo (Booke, 1981), debido a que es el reflejo del ambiente donde residen las especies y por lo tanto, resulta imprescindible evaluar los parámetros de historia de vida de la especie así como sus parámetros

demográficos. Respecto a la resolución aportada por el análisis morfométrico en el presente estudio se demostró la existencia de distintos morfotipos utilizando las características del cuerpo y otolitos. Dichos morfotipos podrían representar grupos con características biológicas distintas y consecuentemente permitir definir stocks idóneos para un manejo adecuado.

Por último de acuerdo a los criterios de manejo del MSC la sardina crinuda debe ser evaluada como una metapoblación con altos niveles de conectividad a lo largo de su área de distribución para así poder tener un mejor aprovechamiento del recurso.

## CONCLUSIONES

### Grupos fenotípicos

- La forma del cuerpo y otolitos representan estructuras importantes que permiten la identificación de *stocks* fenotípicos de sardina crinuda *O. libertate*.
- La forma del cuerpo y otolitos sugieren la presencia de al menos tres *stocks* de *O. libertate* en el noroeste del Pacífico mexicano: Bahía Magdalena, Guaymas y Mazatlán.

### Estructura genética poblacional

- Los niveles de diversidad genética expresados en número de haplotipos, diversidad haplotípica y diversidad nucleotídica encontrados en la sardina crinuda *Opisthonema libertate* a lo largo de su área de distribución fueron elevados y similares a los reportados para otras especies de peces pelágicos de importancia comercial, con tamaños poblacionales grandes.
- No se detectó evidencia de estructura genética poblacional.
- Se detectó un clinal, el cual refleja un gradiente latitudinal de norte a sur, con poblaciones levemente más estables al sur.

### Diseño de librería

- Fue posible detectar los pasos críticos para la realización de una librería genómica con ddRAD-seq para la sardina crinuda.

## Conclusión general

Los resultados obtenidos en el presente estudio soportan la existencia de una población panmítica con distintos morfotipos en la región más norteña de su distribución. Considerando lo anterior, y hasta no tener más elementos disponibles, la administración de recurso debería considerar un manejo compartido a lo largo de su área de distribución. Marcadores moleculares más polimórficos, tales como SNPs, que pueden detectar diferencias sobre escalas geográficas relativamente pequeñas y soportar si los fenotipos detectados son productos de una plasticidad fenotípica o el reflejo de poblaciones distintas, deberían ser empleados en futuros estudios.

## RECOMENDACIONES

- Analizar los parámetros demográficos de los tres *stocks* fenotípicos encontrados en este estudio por separado de tal manera que puedan ser determinados *stocks* pesqueros.
- Identificar un criterio morfológico para distinguir entre individuos de acuerdo a los morfotipos encontrados.
- Para futuros trabajos de genética poblacional en *O. libertate* se recomienda incrementar el número de sitios de muestreo, donde se incluyan los países de Sur América (Ecuador, Perú). Además, incrementar el número de individuos muestreados para mejorar el poder estadístico de los análisis.
- Concluir el desarrollo de SNPs e implementar su uso en estudios poblacionales de la sardina crinuda.
- Abordar estudios con enfoques similares para el estudio poblacional de las otras especies de sardina crinuda.

## BIBLIOGRAFIA

Abaunza, P., A. G. Murta, N. Campbell, R. Cimmaruta, A. S. Comesaña, G. Dahle & M. T. García-Santamaría. 2008. Stock identity of Horse Mackerel (*Trachurus trachurus*) in the Northeast Atlantic and Mediterranean Sea: integrating the results from different stock identification approaches. *Fish Res.* 89: 196–209.

Acal, D. E. 1990. Biomass and potential yield of the thread herring (*Opisthonema* spp.) off the coasts of Sinaloa and Nayarit. *Cien Mar.* 16, 61–73.

Alberch, P., S.J. Gould, G.F. Oster & D.B. Wake. 1979. Size and shape in ontogeny and phylogeny. *Paleobiology.* 5: 296-317.

Alvarado Bremer, R.J., B. Stequert, W.N. Robertson & B. Ely. 1998. Genetic evidence for inter-oceanic subdivision of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) populations. *Mar Biol.* 132: 547-557.

Alvarado-Bremer, J. R., J. Mejuto , J.Gómez-Márquez, F. Boán, P. Carpintero, J. M. Rodríguez , J. Viñas , T. W. Greig, & B. Ely. 2005. Hierarchical analyses of genetic variation of samples from breeding and feeding grounds confirm the genetic partitioning of northwest Atlantic and South Atlantic populations of swordfish (*Xiphias gladius* L.). *J Exp Mar Biol Ecol.* 327: 167-182.

Als, T. D., M. M. Hansen, G. E. Maes, M. Castonguay, L. Riemann, K. Aarestrup & P. Munk. 2011. All roads lead to home: panmixia of European eel in the Sargasso Sea. *Mol Ecol.* 20:1333–1346.

Ames, E. P., & J. Lichter. 2013. Gadids and Alewives: Structure within complexity in the Gulf of Maine. *Fish Res.* 141: 70–78.

Arbogast, B.S. & G.J. Kenagy. 2001. Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. *J Biogeogr.* 28: 819-825.

Avise, J.C. 2000. Phylogeography: The History and Formation of Species. Harvard 69 University Press, Cambridge Ma. 447 pp.

- Baird, N.A. Etter, P.D., Atwood, T.S., Currey, M.C., Shiver, A.L., Lewis, Z.A., Selker, E.U., Cresko, W.A. & Johnson, E.A.. 2008. Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers. *PLoS One* 3, e3376.
- Balloux, F. & N. Lugon-Moulin. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Mol. Ecol.* 11: 155-165.
- Bandelt, H.J., P. Forster & A. Röhl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol.* 16(1): 37-48.
- Beddington, J.R., D. J. Agnew & W. Clark. 2007. Current problems in the management of marine fisheries. *Science.* 316, 1713–1716. DOI: 10.1126/science.1137362.
- Begg, G. & J.R. Waldman. 1999. An holistic approach to fish stock identification. *Fish Res.* 43: 35–44.
- Beier, E. 1997. A numerical investigation of the annual variability in the Gulf of California. *J. Phys. Oceanogr.*, 27(5): 597–848.
- Bernal, G., P. Ripa & J. C. Herguera. 2001. Oceanographic and climatic variability in the lower gulf of California: links with the tropics and north Pacific. *Cien Mar* 27(4): 595–617. [dx.doi.org/10.7773/cm.v27i4.498](https://doi.org/10.7773/cm.v27i4.498).
- Berry, D. H. & I. Barrett. 1963. Análisis de las branquiespinas y denominación del arenque de hebra *Opisthonema*. *Inter-Amer. Atun Trop. Bol.* 7(2): pp 137-190.
- Blood, C.L. 2003. Age validation of Pacific halibut. II. Comparison of surface and break-and-burn otoliths methods of ageing Pacific halibut. *IPHC Tech. Rep.* 47, 32 pp.
- Booke, H. E. 1981. The conundrum of the stock concept—are nature or nurture definable in fishery science?. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 38:1479-1506.
- Borja, A., M. Elliott, J. H. Andersen, T. Berg, J. Carstensen, B. S. Halpern, A. S. Heiskanen, S. Korpinen, J. S. S. Lowndes, G. Martin & N. Rodriguez-Ezpeleta. 2016.

Overview of integrative assessment of marine systems: the Ecosystem Approach in practice. *Front. Mar. Sci.*, 3. <http://dx.doi.org/10.3389/fmars.2016.00020>

Bouckaert R, J. Heled, D. Kühnert, T. Vaughan, Wu C-H, D. Xie, M. A. Suchard, A. Rambaut & A. J. Drummond. 2014. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLoS Comput Biol.* doi:10.1371/journal.pcbi.1003537.

Bowen, B.W., W.S. Grant. 1997. Phylogeography of the sardines (*Sardinops spp.*) assessing biogeographic models and population histories in temperate upwelling zones. *Evolution* 51: 1601-1610.

Broughton, J. M. 2002. Prey spatial structure and behavior affect archaeological tests of optimal foraging models: Examples from the Emeryville Shellmound vertebrate fauna. *World Archaeol*, 34: 60–83

Brown, G.G., G. Gadaleta, G. Pepe & C. Saccone. 1986. Structural conservation and variation in the D-loop-containing region of vertebrate mitochondrial DNA. *J Mol Biol.* 192: 503-511.

Butler, J. L., Granados, M. L., Barnes, J. T. y Macewicz, B. J. 1996. Age composition, growth, and maturation of the pacific sardine (*Sardinops sagax*) during 1994. *CalCOFI*. 37: 152-159p.

Cadrin, S.X. 2000. Advances in morphometric identification of fishery stocks. *Rev. Fish Biol. Fish.* 10: 91–112.

Cadrin, S.X., K.D. Friedland & J.R. Waldman. 2005. Stock identification methods—an overview. In: S. X. Cadrin, K. D. Friedland, & J. R. Waldman, eds. Amsterdam Stock identification methods applications in fishery science. *Elsevier Academic Press*, pp. 3-8.

Cadrin, S., M. Bernreuther, A. K. Daníelsdóttir, E. Hjörleifsson, T. Johansen, L. Kerr & K. Kristinsson. 2010. Population structure of beaked redfish, *Sebastes mentella*: evidence of divergence associated with different habitats. *ICES J Mar Sci.* 67: 1617–1630.

- Campana, S.E. & J.M. Casselman. 1993. Stock discrimination using otolith shape analysis. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 50: 1062–1083.
- Carbajal, N. 1993. Modeling of the circulation in the Gulf of California. Ph.D. thesis, Institute fur Meereskunde, Hamburg, 186 pp.
- Carmona, R. & F. Alexandres. 1994. Determinación del crecimiento de *O. libertate* (Clupeiformes: Clupeidae) mediante lectura de otolitos. *Rev biol trop*, 42(1/2):233-233.
- Castro-González, J. J., H. M. Lizárraga-Rodríguez & O. Chapa-Morales. 1997. Fecundidad de la sardina crinuda *O. bulleri* (Pisces: Clupeidae) entre las costas de Sinaloa y Nayarit, México. *Rev Biol Trop*, 44(3)/45(1): 659-661.
- Checa-Caratachea, M.A. 2007. Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* Vol 20. (3): 213-221.
- Cheng, L., T.R. Connor, J. Sirén, D.M. Aanensen & J. Corander. 2013. Hierarchical and spatially explicit clustering of DNA sequences with BAPS software. *Mol Biol Evol.* 30(5): 1224-1228.
- Chow, S. & H. Takeyana. 2000. Nuclear and mitochondrial DNA analysis reveal four genetically separated breeding units of the swordfish. *J Fish Biol.* 56: 1087-1098.
- Ciannelli, L., J. A. D. Fisher, M. Skern-Mauritzen, M. E. Hunsicker, M. Hidalgo, K.T. Frank & K. M. Bailey. 2013. Theory, consequences and evidence of eroding population spatial structure in harvested marine fishes: a review. *Mar Ecol- Prog Ser.* 480: 227–243.
- Clark, F. N. & J. F. Janssen Jr. 1945. Movements and abundance of the sardine as measured by tag returns. Calif. Dep. Fish Game, *Fish. Bull.* 61: 7-12.
- Cope, J. M., & A. E. Punt. 2011. Reconciling stock assessment and management scales under conditions of spatially varying catch histories. *Fish Res*, 107: 22–38.



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.

Corander, J., Majander, K. K., Cheng, L. & Meril, J. 2013. High degree of cryptic population differentiation in the Baltic Sea herring *Clupea harengus*. *Mol. Ecol.* 22, 2931–2940. doi: 10.1111/mec.12174.

Côté, C. L., P. A. Gagnaire, V. Bourret, G. Verreault, M. Castonguay & L. Bernatchez. 2013. Population genetics of the American eel (*Anguilla rostrata*):  $F_{st} = 0$  and North Atlantic Oscillation effects on demographic fluctuations of a panmictic species. *Mol Ecol.* 22: 1763–1776.

Cowen, R. K. & S. Sponaugle. 2009. Larval Dispersal and Marine Population Connectivity. *Annu. Rev. Marine. Sci.* 1:443–66. doi: 10.1146/annurev.marine.010908.163757

Cury, P., A. Bakun, R. J. M. Crawford, A. Jarre, R. A. Quiñones, L. J. Shannon & H. M. Verheye. 2000. Small pelagics in upwelling systems: patterns of interaction and structural changes in “wasp-waist” ecosystems. *ICES J. Mar. Sci.* 57, 603-618.

Csirke, J. 1980. Introducción a la dinámica de poblaciones de peces. FAO Doc. Téc. Pesca 203, 82 pp.

Davey, J.W. & Blaxter, M.B. 2010. RADseq: next-generation population genetics. *Brief Funct Genomics*. Vol 9. No. 5. 416-423. doi:10.1093/bfgp/elq031.

Davey, J.W. Hohenlohe, P.A. Etter, P.D. Boone, J.Q. Catchen, J.M. & Blaxter, M. L. 2011. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nat Rev Genet*. Vol 12: 7. 499-510.

De La Cruz-Agüero, J. & F.J. García-Rodríguez. 2004. Morphometric *stock* structure of the Pacific sardine *Sardinops sagax* (Jenyns, 1842) off Baja California, Mexico. In *Morphometrics applications in biology and paleontology*, A. M. T. Elewa (ed.). New York: *Springer-Verlag*, pp. 115–127.

De La Cruz-Agüero, J., F.J. Vergara-Solana & F.J. García-Rodríguez. 2015. Geometric morphometrics supports the proposed molecular taxonomy for three *Eucinostomus* species (Perciformes: Gerridae) along the coasts of Mexico. *Zoomorphology*, 134: 125-134.

DeVries, D.A., C.B. Grimes & M.H. Prager. 2002. Using otolith shape analysis to distinguish eastern Gulf of Mexico and Atlantic Ocean *stocks* of king mackerel. *Fish. Res.*, 57: 51-62. Doadrio I, J. Carmona, C. Fernández-Delgado. 2002. Morphometric study of the Iberian *Aphanis* (Actinopterygii, Cyprinodontiformes), with description of a new species. *Folia Zool*, 51(1): 67-79.

De Wit, P., H. M. Pespeni, J. T. Ladner, D. J. Barshis, F. Seneca, H. Jaris, N. O. Therkildsen, M. Morikawa & S. R. Palumbi. 2012. The simple fool's guide to population genomics via RNA-seq: an introduction to high-throughput sequencing data analysis. *Mol. Ecol. Resc.* 12, 1058-1067. doi: 10.1111/1755-0998.12003.

DOF. 1993. Diario Oficial de la Federación. Acuerdo mediante el cual se da a conocer la actualización de la Carta Nacional Pesquera. México.

Domínguez-López M, Uribe-Alcocer M & Píndaro-Jaimes D. 2010. Phylogeography and historical demography of the Pacific Sierra mackerel (*Scomberomorus sierra*) in the Eastern Pacific. *Turk. J. Fish. Aquatic. SC.* 15: 205-214. DOI: 10.4194/1303-2712-v15\_2\_02.

Edwards, K.R., Q.E. Phelps, J.L. Shepherd & D.W. Wills. 2005. Comparison of scale and otolith age estimates for two South Dakota bluegill populations. *Proc. South Dakota Acad. Sci.*, 84: 181-186.

Ehrhardt, N.M., P.S. Jacquemin, B.F. García, D.G. González, B.J.M. López, C.J. Ortiz & N.A. Solís. 1983. On the fishery and biology of the giant squid *Dosidicus gigas* in the Gulf of California, Mexico. In: J.F. Caddy (ed.). Advances in assessment of world cephalopod resources. *FAO Fish. Tech. Pap.*, 231: 306–340.

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.

Farré, M., J. Narayan, G.T. Slavov, J. Damas, L. Auvil, C. Li, E.D. Jarvis, D.W. Burt, D.K. Griffin & D.M. Larkin. 2016. Novel insights into chromosome evolution in birds, archosaurs, and reptiles. *Genome Biol. Evol.*, 8: 2442-2451.

Félix-Uraga, R., R.M. Alvarado-Castillo & R. Carmona-Piña. 1996. The sardine fishery along the western coast of Baja California, 1981 to 1994. *CalCOFI Rep.* 37: 188-192.

Félix-Uraga, R., V.M. Gómez-Muñoz, C. Quiñonez-Velázquez, F.N. Melo-Barrera, W. García-Franco. 2004. On the existence of Pacific sardine groups off the west coast of Baja California and Southern California. *CalCOFI Rep.*, 45: 146-151.

Félix-Uraga, R., V.M. Gómez-Muñoz, C. Quiñonez-Velázquez, F.N. Melo-Barrera, K.T. Hill & W. García-Franco. 2005. Pacific sardine (*Sardinops sagax*) stock discrimination off the west coast of Baja California and southern California using otolith morphometry. *CalCOFI Rep.*, 46: 113–121.

Felsenstein, J. 1989. PHYLIP – Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics*.5:164.

Fumagalli, M. 2013. Assessing the Effect of Sequencing Depth and Sample Size in Population Genetics Inferences. *PLoS ONE* 8(11): e79667. doi:10.1371/journal.pone.0079667.

Fusco, G. & A. Minelli. 2010. Phenotypic plasticity in development and evolution: facts and concepts. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 365, 547–556 doi:10.1098/rstb.2009.0267.

Gaggiotti, O. E. y Vetter, R. D. 1999. Effect of life history strategy, environmental variability, and overexploitation on the genetic diversity of pelagic fish populations. *Can J Fish Aquatic Sci.* 56(8): 1376-1388p.

Gallardo-Cabello, M., M. Jacob-Cervantes & X. Chiappa-Carrara. 1991. Análisis de los hábitos alimentarios y del aporte del carbono de las presas a la dieta de la sardina crinuda, *Opisthonema libertate* (Gunther, 1866) (Pisces: Cupleidae) en el Golfo de California. (Sin. Publ.).

Gallardo-Cabello, M., A. Laguarda-Figueras & R. Corrales-Urrea. 1993. Análisis de la edad, crecimiento y mortalidad natural de la sardina crinuda *O. libertate* (Gunther, 1868) de las aguas del Sur del Golfo de California. *Cien Pes.* (9):137-146.

García-Alberto, G. 2010. Reproducción de la sardina del pacífico *Sardinops sagax* (Jenyns, 1842) en la región sur de la corriente de California. Tesis Maestría. CICIMAR-IPN, 77p.

García-Gómez, C. M. & D. Molina. 1986. Edad y crecimiento de la sardina crinuda de la zona de Guaymas. *Cien Pes.* (5):17-31.

García-Rodríguez, F. J. 2006. Genética Poblacional de la langostas espinosas *Panulirus* spp. De importancia comercial del Pacífico mexicano. Tesis de Doctorado. CIBNOR, 148 p.

García-Rodríguez, F.J., S.A. García-Gasca, J. De La Cruz-Agüero & V.M. Cota-Gómez. 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.

Gauldie, R. W. 1999. Taking stock of genetics concepts in fisheries management. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48: 722-731.

Geffen, A. J., R. D. M. Nash & M. Dickey-Collas. 2011. Characterization of herring populations west of the British Isles: an investigation of mixing based on otolith microchemistry. *ICES J Mar Sci*, 68: 1447–1458.

Gizaw, S., Van-Arendonk, J.A.M., Komen, H., Windig, J.J. & Hanotte, O. 2007. Population structure, genetic variation and morphological diversity in indigenous sheep of Ethiopia. *Anim Genet.* 38, 621-8.

Goethel, D. R., L. A. Kerr & S. X. Cadrin. 2016. Incorporating spatial population structure into the assessment-management interface of marine resources. In *Management Science in Fisheries: An Introduction to Simulation-based Methods*, pp. 319–347. Ed. by C. T. T. Edwards, and D. J. Dankel. Routledge, New York. 460 pp.

González-Ruelas, M. E. 1995. Circulación de las aguas y masas de agua en el Océano Pacífico colindante a las costas de México. Tesis de Maestría. OGMI. Odessa, Ucrania. 100 p.

González, N. & Solís, E. 2010. Fishery and biological characteristics and process canned elaboration of pinchagua (*Ophistonema* spp.) in Ecuador. Boletín Científico y Técnico. 20 (7): 19-46.

Gould, S.J. 1966. Allometry and size in ontogeny and phylogeny. *Biol. Rev.*, 41: 587-638.

Gould, S. J., D. S. Woodruff & J. P. Martin. 1974. Genetics and Morphometrics of *Cerion* at Pongo Carpet: a new systematic approach to this enigmatic land snail. *Syst Zool.* 23 (4): 518-533.

Gulland, J.A. 1971. Manual de métodos para la evaluación de poblaciones de peces. FAO, *Manuales en Ciencia Pesquera*, Madrid, 164 p.

Grant, W.S., A.M. Clark & B.M. Bowen. 1998. Why restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA failed to resolve sardine (*Sardinops*) biogeography: insights from mitochondrial DNA cytochrome *b* sequences. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55: 2539-2547.

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 Fish Manage*. Fishing News Books, Blackwell Science, Oxford, UK.

Graves, J. E. 1996. Conservation genetics of fishes in the pelagic marine realm. 335-366, *En*: Avise J.C. (Ed). *Conser Gene: Case Histories from Nature*. Chapman & Hall, New York, pp.

Graves, J.E. & J.R. McDowell. 1995. Inter-ocean genetic divergence of istiophorid billfishes. *Mar Biol*, 122: 193-203.

Harpending, H. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Hum Biol*, 66: 591-600.

- Hastein, T., B. J. Hill, F. Berthe & D. V. Lighter. 2001. Traceability of aquatic animals. *Rev. Sci. Tech.*, 20 (2): 564-583.
- Hatfield, E. M. C., R. D. M. Nash, C. Zimmermann, P. J. Schön, C. Kelly, M. Dickey-Collas & K. MacKenzie. 2007. The scientific implications of the EU Project WESTHER (Q5RS - 2002 – 01056) to the assessment and management of the herring *stocks* to the west of the British Isles. ICES C.M. 2007/L 11: 24. pp.
- Hauser, L. & Carvalho, G.R. 2008. Paradigm shifts in marine fisheries genetics: ugly hypotheses slain by beautiful facts. *Fish. Fish.* 9, 333–362.
- Hedgecock, D.; Nelson, K. & Lopez-Lemus, L. G. 1988. Biochemical genetic and morphological divergence among three species of thread. *CalCOFI* 29, 110–128.
- Hedgecock, D., E.S. Hutchinson, G. Li, F.L. Sly & K. Nelson. 1989. Genetic and morphometric variation in the Pacific sardine, *Sardinops sagax caerulea*: Comparisons and contrasts with historical data and with variability in the northern anchovy, *Engraulis mordax*. *Fish. Bull.* US, 87: 653–671.
- Hedgecock, D. 1994. Temporal and spatial genetic structure of marine animal populations in the California Current. *CalCOFI* Rep. 35: 73-81.
- Hickey, B.M. 1979. The California Current System. Hypotheses and facts. *Prog. Oceanogr.* 8: 191-279.
- Hintum, T.J.L.V. 1994. Drowning in the genepool: managing genetic diversity in genebank collections. In: Dept. Plant Breeding Research. Univ. Agric. Sciences, Ultuna.
- 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. *Mar Biol*, 145:465-475.
- Ibáñez-Aguirre, A.L., E. Cabral-Solís, M. Gallardo-Cabello & E. Espino-Barr. 2006. Comparative morphometrics of two populations of *Mugil curema* (Pisces: Mugilidae) on the Atlantic and Mexican Pacific coasts. *Sci. Mar.*, 70: 139-145.

Jacob-Cervantes, M., M. Gallardo, X. Chiappa & A. Ruiz. 1992. Régimen alimentario de la sardina crinuda *Opisthonema libertate*(Pisces: Clupeidae) en el Golfo de California. *Rev. Biol. Trop.* 40:233-238.

Jacob-Cervantes, M. L., M. A. Valdez-Ornelas, O. Chapa-Morales, R. E. Gastelum-Villareal, I. López-Nuño & P. Valdez-Ledón. 2007. La Variabilidad de las capturas en la pesquería de peces pelágicos menores en Sinaloa, Nayarit y Jalisco durante el 2006. CRIP-Mazatlán, INP, SAGARPA. Documento Interno. 23 p.

Jacob-Cervantes, M. L. 2010. La pesquería de peces pelágicos menores en el sur del Golfo de California. Análisis de la temporada de pesca 2008. *Ciencia pesquera*, 2(18):47-58.

Jacob-Cervantes, M. L., R. Vallarta-Zárate, J. Payán-Alejo, D. Becerra-Arroyo, R. de León-Herrera & A. Verde-Hernández. 2014. Análisis integral de la pesquería de pelágicos menores en el sur del Golfo de California, durante 2013. *Resúmenes del XXI Taller de Pelágicos Menores*. Ensenada, Baja California. Centro Regional de Investigaciones Pesqueras Ensenada. 11 al 13 de junio de 2014.

Jensen, J.L., A.J. Bohonak & S.T. Kelley. 2005. Isolation by distance, web service. *BMC Genetics* 6: 13. v.3.23 [u](#).

Jiménez, A., S.G. Marinone & A. Parés-Sierra. 2005. Effect of the spatial and temporal variability of winds on the circulation in the Gulf of California. *Cien Mar.* 31(2): 357–368.

Johnson, M.S., R. Black. 1984. Pattern beneath the chaos: the effect of recruitment on genetic patchiness in an intertidal limpet. *Evolution* 38: 1371-1383.

Kaneda, H., Jun-Ichi H., Sumiyo, T., Choji, T., Kirsten-Fischer L. & Hiromichi, Y. 1995. Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 92, pp. 4542-4546. *Evolution*.

- Kell, L. T., M. Dickey-Collas, N. T. Hintzen, R. D. M. Nash, G. M. Pilling & B. A. Roel. 2009. Lumpers or splitters? Evaluating recovery and management plans for metapopulations of herring. *ICES J Mar Scien*, 66: 1776–1783.
- Kelly, J. E., K. T. Frank & W. C. Leggett. 2009. Degraded recruitment synchrony in Northwest Atlantic cod *stocks*. *Mar Ecol- Pro Ser*, 393: 131–146.
- Kenchington, T.J. 2001. The effects of fishing on species and genetic diversity. Conference on responsible fisheries in the marine ecosystems. Reykjavik, 75 Iceland, 1-4.
- Kendall, D. 1977. The diffusion of shape. *Adv. Appl. Probab.*, 9; 428-430.
- Kerr, L. A., S. X. Cadrin & A. Kovach. 2014. Consequences of a mismatch between biological and management units of Atlantic cod off New England. *ICES J Mar Scien*, 71: 1366–1381.
- Kerr, L. A., & D. R. Goethel. 2014. Simulation modeling as a tool for synthesis of *stock* identification information. In *Stock Identification Methods: Applications in Fishery Science*, 2nd edn, pp. 501–534. Ed. by S. Cadrin, L. Kerr, and S. Mariani. Elsevier Academic Press, Burlington. 566 pp.
- Kerr, L. A., T. H. Niels, X. C. Steven, L. W. Clausen, M. Dickey-Collas, D. R. Goethel, E. M. C. Hatfield, J. P. Kritzer & R. D. M. Nash. 2017. Lessons learned from practical approaches to reconcile mismatches between biological population structure and *stock* units of marine fish. *ICES J. Mar. Sci.* 74(6), 1708–1722. doi:10.1093/icesjms/fsw188
- Klingenberg, C.P. 1998. Heterochrony and allometry: the analysis of evolutionary change in ontogeny. *Biol. Rev.*, 73: 79-123.
- Kimura, M. 1981. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 78: 454-458.
- Kimura, M. 1983. *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge University Press. Cambridge, UK.pp.



- Lagúñez-Moreno, L.M. 1989. Identificación de razas geográficas de *Opisthonema sp* en las costas de Baja California Sur. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. 46 pp.
- Lam, P. K. S. & P. Calow. 1988. Differences in the shell shape of *Lymnaea peregra* (Muller) (Gastropoda: Pulmonata) from lotic and lentic habitats: environmental or genetic variance: *J Mollus Stud.* 54: 197–207.
- Lee, M. 2004. The molecularization of taxonomy. *Invertebr Syst.* 18: 1-6.
- Lecomte, F., W.S. Grant, J.J. Dodson, R. Rodríguez-Sanchez & B.W. Bowen. 2004. Living with uncertainty: genetic imprints of climate shifts in east Pacific anchovy (*Engraulis mordax*) and sardine (*Sardinops sagax*). *Mol. Ecol.* 13: 2169-2182.
- Librado, P. & J. Rozas. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451-1452.
- Lin, H.C. & W.A. Dunson. 1999. Phenotypic plasticity in the growth of the self-fertilizing hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus*. *J. Fish. Biol.* 54:250-266.
- Lluch-Belda, D., F.J. Magallon & R.A. Schwartzlose. 1986. Large fluctuations in the sardine fishery in the Gulf of California: Possible causes. *CalCOFI* 27:136-140.
- López-Lemus, L. G. 1986. Genetic relationships of the different morphotypes of the clupeid *Opisthonema* spp. In the west coast of California and Gulf of California. Annual Conference *CalCOFI*, program y Abstracts.
- Luikart, G., Phillip R. England, David Tallmon, Steve Jordan & Pierre Taberlet. 2003. The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. *Genetics*. Vol 4. 984-994.
- Maclean, J. A. & D. O. Evans. 1981. The *stock* concept, discreteness of fish *stocks*, and fisheries management. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 38: 1889-1897.
- 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. *Can J Fish Aquat Sci.* 65: 1307-1320.

Mackie, I. M., S. E. Pryde, C. Gonzales-Sotelo, I. Medina, R. Pérez-Martin, J. Quintero, M. Rey-Mendez & H. Rehbein. 1999. Challenges in the identification of species of canned fish. *Trends. Food Sci. Technol.*, 10: 9-14.

Matus-Nivon, E. 1994. Primeras fases de vida de la sardina crinuda *Opisthonema libertate* (Günther) (CLUPEIDAE). Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN, 53 p

Marinone, S.G. 2003. A three dimensional model of the mean and seasonal circulation of the Gulf of California. *J. Geophys. Res.*, 108(C10), 3325, doi: 10.1029/2002 JC 001720.

Martínez-Pecero, R. E. 2003. Validación de la edad en larvas de tres especies de sardina de las costas de Baja California Sur *Sardinops caeruleus*, *Opisthonema libertate* y *Harengula thrissina* (Pisces: CLUPEIDAE). Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN, 89 p.

Miller, M.R., Dunham, J.P., Amores, A., Cresko, W.A., Johnson, E.A. 2007. Rapid and cost-effective polymorphism identification and genotyping using restriction site associated DNA (RAD) markers. *Genome Res.* 17(2):240–248.

Munguía-Vega, A., A. Sáenz-Arroyo, A. P. Greenley, J. A. Espinoza-Montes, S. R. Palumbi, M. Rossetto & F. Micheli. 2015. Marine reserves help preserve genetic diversity after impacts derived from climate variability: lessons from the pink abalone in Baja California. *Global Ecol Conserv*; 4: 264–276. doi: 10.1016/j.gecco.2015.07.005.

MSC. 2014. Marine Stewardship Council “MSC Fisheries Certification Requirements”.

Myers, R.A. 2001. *Stock and recruitment: generalizations about maximum reproductive rate, density dependence, and variability using meta-analytic approaches.* ICES J. Mar. Sci. 58, 937–951. Nei, M. 1987. *Mol Evol Genet.* Columbia University Press. New York. E.U.A. 512 pp.

Nevárez-Martínez, M.O., M.A. Martínez-Zavala, C.E. Coterro-Altamirano, M.L. Jacob-Cervantes, Y.Green-Ruiz, G. Gluyas-Millán, A. Cota-Villavicencio & J.P.

Santos Molina. 2006. La pesquería de pelágicos menores. En: F. Arreguín-Sanchez, L. Beléndez-Moreno, I. Méndez Gómez-Humaran, R. Solana Sansores y C. Rangel-Dávalos (eds.). *Sustentabilidad y pesca responsable en México: evaluación y manejo*. Instituto Nacional de la Pesca, SAGARPA. México, pp: 263-295.

Nikolsky, G.V. 1963. *The ecology of fishes*. Academic Press, London. 352p.

Osio GC, A. Orio & C. P. Millar. 2015. Assessing the vulnerability of Mediterranean demersal *stocks* and predicting exploitation status of un-assessed *stocks*. *Fish Res* 171: 110–121. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2015.02.005>.

Ovenden, J. R., B. Oliver, J. W. David, C. B. Rik & M. D. Catherine. 2013. Ocean's eleven: a critical evaluation of the role of population, evolutionary and molecular genetics in the management of wild fisheries. *Fish. Fish.* DOI: 10.1111/faf.12052

Palacios-Hernández, E. 2001. Circulación de la región norte del Golfo de California: Estacional y anomalías. Tesis de doctorado, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, 117 pp.

Parés–Sierra, A., M. López & E.G. Pavia. 1997. Oceanografía física del océano Pacífico Nororiental. *In* Contribuciones a la oceanografía física en México, M. F. Lavín, ed. Unión Geofísica Mexicana. Monografía No. 3:1-24.

Pavlova, Y.V. 1966. Seasonal variations of the California Current. *Oceanology*. 6:806-814.

Pavlova, I. U. B. 1986. Fluctuación temporal de la Corriente de California. *Okeanología*. Vuip. 6: 1003-1013.

Páez-Barrera, F. 1976. Desarrollo gonadal, desove y fecundidad de sardina crinuda (Günther) de la zona de Mazatlán basados en el análisis histológico de la gónada. Memorias del Simposium nacional de recursos pesqueros masivos de México. Ensenada, Baja California. México. SEP.

Penck, A. and Bruckner, E. (1901/1909) *Die Alpen im Eiszeitalter*, 3 Vols. Tauchnitz, Leipzig, 1199 p.

Pérez-Brunius, P., M. Lopez, A. Pares-Sierra & J. Pineda. 2007. Comparison of upwelling indices off Baja California derived from three different wind data sources. *CalCOFI Rep.* 48:204–214.

Pérez-Quiñonez, C. I. 2014. Discriminación de las especies del género *Opisthonema* Gill, 1861 en el Sur del Golfo de California usando análisis morfométricos y genéticos. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN, 74 p.

Pérez-Quiñonez, C. I., Quiñonez-Velázquez, C., Ramírez-Pérez, J. S., Vergara-Solana, F. J. & García-Rodríguez, F. J. 2017. Combining geometric morphometrics and genetic analysis to identify species of *Opisthonema* Gill 1861 in the eastern Mexican Pacific. *J. Appl. Ichthyol.* 33: 84-92.

Petersen, L. C. 1956. Observations of the taxonomy, biology, and ecology of Engraulid and Clupeid fishes in the Gulf of Nicoya, Costa Rica, *Inter-Amer. Trop. Tuna Comm. Bull* 1 (5).

Peterson, B.K., Weber, J.N., Kay, E.H., Fisher, H.S. & Hoekstra, H.E. 2012. Double Digest RADseq: An Inexpensive Method for De Novo SNP Discovery and Genotyping in Model and Non-Model Species. *PLoS ONE* 7(5): e37135. doi:10.1371/journal.pone.0037135.

Petit, E., Balloux, F. & Goudet J. 2001. Sex-biased dispersal in a migratory bat: a characterization using sexspecific demographic parameters. *Evolution* 55, 635-40.

Polat, N., D. Bostanci & S. Yilmaz. 2005. Differences between whole otolith and broken-burnt otolith ages of red mullet (*Mullus barbatus ponticus* Essipov, 1927) Sampled from the black sea (Samsun Turkey). *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 29:429-433.

Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol Biol Evol*, 25(7): 1253-1256.

Pujolar, J.M., M.I. Roldán & C. Pla. 2003. Genetic analysis of tuna populations, *Thunnus thynnus thynnus* and *T. alalunga*. *Mar Biol.* 143: 613–621

Utter, F.M. 1991. Biochemical genetics and fishery management: an historical perspective. *J. Fish Biol.* 39, 1–20

- Ramírez-Pérez, J.S., C. Quiñonez-Velázquez, F.J. García-Rodríguez, R. Félix-Uraga & F.N. Melo-Barrera. 2010. Using the body shape of *Sagitta* otoliths in the discrimination of phenotypic stocks in *Scomberomorus sierra* (Jordan and Starks, 1895). *J. Fish. Aquat. Sci.* 5 (2):82-93.
- Reeb, C.A., L. Acangeli & B.A. Block. 2000. Structure and migration corridors in Pacific populations of the Swordfish *Xiphius* [sic] *gladius*, as inferred through analyses of mitochondrial DNA. *Mar. Biol.* 136: 1123–1131.
- Reiss, H., G. Hoarau, M. Dickey-Collas & W. J. Wolff. 2009. Genetic population structure of marine fish: mismatch between biological and fisheries management units. *Fish Fish.* 10: 361–395.
- 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.
- Ripa, P. 1997. Towards a physical explanation of the seasonal dynamics and thermodynamics of the Gulf of California. *J. Phys. Oceanogr.*, 27: 597–614.
- Risch, N.J. 2000. Review article searching for genetic determinants in the new millenium. *Nature* 405, 847-856. doi:10.1038/35015718.
- Rocha-Olivares, A., & J.R. Sandoval-Castillo. 2003. Diversidad mitocondrial y estructura genética en poblaciones alopátricas del huachinango del Pacífico *Lutjanus peru*. *Cien Mar*, 29(2): 197- 209.
- Rocha-Olivares, A., M. Bobadilla-Jiménez, S. Ortega-García, N. Saavedra-Sotelo & J. R. Sandoval-Castillo. 2006. Mitochondrial variability of dolphinfish *Coryphaena hippurus* populations in the Pacific Ocean. *Cien Mar*. 32 (3): 569-578.
- Rodríguez-Domínguez G. 1987. Caracterización bioecológica de las tres especies de sardina crinuda (*Opisthonema libertate*, *O. bulleri* y *O. medirastre*) del Pacífico mexicano (Tesis de Maestría). Ensenada, Baja California. México: CICESE.

- Rogers, A.R. & H. Harpending. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol Biol Evol*, 9: 552-569.
- Rogers, A.R. 2002. The theoretical mismatch distribution. *Lecture Notes on Gene Genealogies*, 7: 30-46.
- Rohlf, F.J. & L.F. Marcus. 1993. A revolution in morphometrics. *Trends Ecol Evol* 8:129-132.
- 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.
- Rubio-Castro, G. G., C. Quiñonez-Velázquez & F. J. García-Rodríguez. 2015. Genetic diversity and population structure of Indo-Pacific sailfin *Istiophorus platypterus* in the eastern Pacific. *Fish. Sci.* doi: 10.1007/s12562-015-0952-x.
- Rubio-Castro, G. G. 2016. Estructura Genética Poblacional del pez vela *Istiophorus platypterus* (Shaw In Shaw & Nodder, 1792). Tesis de Doctorado. CICIMAR-IPN, 120 p.
- Ruiz, L.A. & L. Lyle F. 1992. Fluctuaciones periódicas de la captura de sardina crinuda (*Opisthonema* spp.) en el Golfo de California, 1972-1990. *CalCOFI Rep.* 33:124-129.
- Ruzzante, D. E., S. Mariani, D. Bekkevold, C. André, H. Mosegaard, L. A. Clausen & T. G. Dahlgren. 2006. Biocomplexity in a highly migratory pelagic marine fish, Atlantic herring. *Proc R Soci, B*, 273: 1459–1464.
- SAGARPA. 2013. Anuario estadístico de acuacultura y pesca 2010. México: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
- Saldierna-Martínez, R.J., G. Vera-Alejandro, F. Lachica-Bonilla & M.E. Hernández-Rivas. 1995. Estrategias reproductivas de *Sardinops caeruleus* y *Opisthonema*

*libertate* (Pisces: Clupeidae) en el Golfo de California, México. Memorias del Talleres de Pelágicos Menores, La Paz, B.C.S., noviembre 1995

Sánchez, R., R. D. Sepúlveda, A. Brante y L. Cárdenas. 2011. Spatial pattern of genetic and morphological diversity in the direct developer *Acanthina monodon* (Gastropoda: Mollusca). *Mar Ecol Prog Ser.* 434: 121-131.

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.

Sheets, H. D. 2004. IMP: Integrated Morphometrics Package. Canisius College. N. Y. <http://www3.Canisius.edu/sheets/morphsoft.html>.

Shuai, Y., C. Gaetano, L. B. Christopher, W. Ming, Y. Chaopin & Y. Tingbao. 2015. Phylogeographic study on the chub mackerel (*Scomber japonicus*) in the Northwestern Pacific indicates the late Pleistocene population isolation. *Mar Ecol.* 1-13. doi: 10.1111/maec.12267

Silva, A. 2003. Morphometric variation among sardine (*Sardina pilchardus*) populations from the northeastern Atlantic and the western Mediterranean. *ICES J. Mar. Sci.* 60: 1352-1360.

Sokolov, V. A. & Wong, M. 1972. Informe científico de las investigaciones sobre peces pelágicos del Golfo de California (Sardina, Crinuda y Anchoveta) en 1970. México/PNUD/FAO. *Inf. Cient.* (1): 31 pp.

Sotelo, C. G., C. Piñeiro, J. M. Gallardo & R. I Pérez Martin. 1993. Fish species identification in seafoods products. *Trends. Food Sci. Technol.*, 4: 395-401.

Sparre, P., E. Ursin & S. C. Venema. 1989. Introduction to tropical fish stock Assessment—Part 1: Manual, FAO-Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Stevenson, D.K. & F. Carranza. 1981. Maximum yield estimates for the Pacific thread herring, *Opisthonema* spp., fishery in Costa Rica. *Fish. Bull.* 79:689-703.

- Stransky, C., A.G. Murta & C. Zimmermann. 2008. Otolith shape analysis as a tool for stock separation of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) in the Northeast Atlantic and Mediterranean. *Fish. Res.* 89:159–166.
- Tajima, F. 1989. The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 597–601.
- Talley, L.D. 1993. Distribution and formation of the North Pacific Intermediate Water. *J. Phys. Oceanogr.* 23: 517-537.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski & S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*, 30: 2725-2729.
- Tanahara-Romero, S.A. 1997. Estudio de la circulación debida al forzamiento por viento en la zona norte del Golfo de California durante invierno. Tesis de maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, 61 pp.
- 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 Res*, 24: 4876- 4882.
- Toro-Ibache, M. V., S. Germán-Manríquez & I. Suazo-Galdames. 2010. Morfometría geométrica y el estudio de las formas biológicas: de la morfología descriptiva a la morfología cuantitativa. *Int. J. Morphol.*, 28(4):977-990.
- Torres-Ramírez. 2004. Nueva clave de identificación para la sardina crinuda del género *Opisthonema* Gill 1861 en el pacifico mexicano. Tesis de licenciatura. FACIMAR-UAS. 18 pp.
- Torres-Villegas, J. R., C. G. García-Helgar, R. I. Ochoa-Báez & V.A. Levy-Pérez. 1985. Parámetros reproductivos de las poblaciones de *Opisthonema libertate* (Gunther) (Pisces: Clupeidae) y discusión sobre su evaluación por producción de huevos, en Bahía Magdalena, B.C.S. México. *Inv. Mar. CICIMAR.* 2(2): 45-58.
- 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 80 de



Ciencias de la Atmósfera, Universidad Nacional Autónoma de México, Secretaría de Gobernación. México, 229 pp.

Tripp-Valdez, M. A. 2009. Análisis de la Estructura Genética Poblacional del dorado (*Coryphaena hippurus*; Linnaeus, 1758) en el noroeste del Pacífico mexicano y Golfo de California mediante el uso de microsatélites. Tesis de Maestría. CIBNOR, 124 p.

Tripp-Valdez, M. A., F. Galván-Magaña & S. Ortega-García. 2010. Feeding habits of dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) in the southeastern Gulf of California. Mexico. *J. Appl. Ichthyol.* 26: 578–582. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01483.x>

Tzeng, T.D. 2004. Morphological variation between populations of spotted mackerel (*Scomber australasicus*) off Taiwan. *Fish. Res.*, 68: 45-55.

Utter, F.M. 1991. Biochemical genetics and fishery management: An historical perspective. *Journal of Fish Biology*, 39: 1-20.

Vallarta-Zárate, J.R. 2012. Distribución y abundancia de la sardina crinuda (*Opisthonema* spp) en el sur del Golfo de California asociada a la variabilidad ambiental durante el periodo 1996-2010. Tesis de Maestría. ICML-UNAM. 119 pp.

Vázquez-Rojas, K.A. 2018. Estructura genética mediante SNPs en bancos de almeja generosa (*Panopea globosa*; Dall 1898) del alto golfo de California. Tesis de maestría. CIBNOR, 80 p.

Vega-Corrales, L. A. 2010. Evaluación poblacional del *stock* explotable del complejo *Opisthonema* (Pisces: Cupleidae) en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. *Rev. Ma. Cost.* 2, 83-94.

Vergara-Solana, F.J., F.J. García-Rodríguez & J. De la Cruz-Agüero. 2013. Comparing body and otolith shape for *stock* discrimination of Pacific sardine, *Sardinops sagax* Jenyns, 1842. *J. Appl. Ichthyol.*, 29: 1241-1246.

Waldman, J.R. 2005. Definition of *stocks*: an evolving concept. In: S.X. Cadrin, K.D. Friedl, & J.R. Waldman (eds.). *Stock* identification methods applications in fishery science. *Elsevier Academic Press*, Amsterdam, pp. 7-16.

Wang, Y.H., Upadhyaya, H.D., Millie-Burrell, A., Ebrahim- Sahraeian, S.M., Klein, R. & Klein, P.E. 2013. Genetic Structure and Linkage Disequilibrium in a Diverse, Representative Collection of the C4 Model Plant, Sorghum bicolor. *G3*. doi: 10.1534/g3.112.004861.

Waples, R. S., & O. E. Gaggiotti. 2006. What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Mol Ecol*. 15: 1419–1439.

Waples, R.S., A. E. Punt & J. M. Cope. 2008. Integrating genetic data into management of marine resources: how can we do it better? *Fish. Fish.* 9, 423–449. doi.org/10.1111/j.1467-2979.2008.00303.x

Waples, R.S. & K.A. Naish. 2009. Genetic and evolutionary considerations in fishery management: Research needs for the future. Pp. 427-451 *In: The future of fisheries science in North America*. R. J. Beamish and B. J. Rothschild, editors. Springer, Dordrecht

Ward, R. D. 2000. Genetics in fisheries management, *Hydrobiology*. 420: 191-201.

Ward, R. D. 2006. The importance of identify spatial population structure in restocking and stock enhancement programmes. *Fish. Res.* 80: 9-18.

Warner, R. R. y Chesson, P. L. 1985. Coexistence mediated by recruitment fluctuations: a field guide to the storage effect. *Am Nat.* 125: 769-787p.

Westgaard, J. I., Staby, A., Godiksen, J. A., Geffen, A. J., Svensson, A., Charrier, G., Svedäng, H. & Andre, C. 2017. Large and fine scale population structure in European hake (*Merluccius merluccius*) in the Northeast Atlantic. *ICES J. Mar. Sci.* 74(5): 1300–1310. doi:10.1093/icesjms/fsw249.

Winsor, H. L. & F. W. Allendorf. 2010. What can genetics tell us about population connectivity?. *Mol. Ecol.* 19, 3038–3051 doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04688.x

Woodruff, D. S. & S. J. Gould. 1980. Geographic differentiation and speciation in *Cerion* a preliminary discussion of patterns and processes. *Biol J Linn Soc.* 14: 389:416.

Worm, B., R. Hilborn, J. K. Baum, T. A. Branch, J. E. Collie, C. Christopher, M. J. Fogarty, E. A. Fulton, J. A. Hutchings, S. Jennings, O. P. Jensen, H. K. Lotze, P. M. Mace, T. R. McClanahan, C. Minton, S. R. Palumbi, A. M. Parma, D. Ricard, A. A. Rosenberg, R. Watson & D. Zeller. 2009. Rebuilding global fisheries. *Science* 325, 578–585. DOI: 10.1126/science.1173146 Wright, S. 1978. *Evolution and the genetics of populations*: vol. 4. Variability within and among natural populations. University of Chicago Press, Chicago, 590 pp.

Yañez, J. M., S. Newman & R. D. Houston. 2015. Genomics in aquaculture to better understand species biology and accelerate genetic progress. *Genet.* 6, <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00128>

Ying, Y., Y. Chen, L. Lin & T. Gao. 2011. Risks of ignoring fish population spatial structure in fisheries management. *Can J Fishs Aqua Scien*, 68: 2101–2120.

Zelditch, M.L., D.L. Swiderski, H.D. Sheets & W.L. Fink. 2004. *Geometric Morphometrics for biologists: a primer*. Elsevier Academic Press, London 443 pp.

# **ANEXOS**

**Anexo 1.** Protocolo de extracción de ADN con el kit e 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 µl de ATL y 20 µl de proteinasa K. (Extraer antes la cantidad total a utilizar para evitar contaminar el reactivo de los tubos, para 18 muestras son 3600 µl de ATL y 400 µl de proteinasa K.
5. Colocar en incubadora a 56 °C durante 24 hrs.
6. Colocar en el vortex cada tubo durante 15 segundos.
7. Hacer una mezcla de 200 µl de AL y 200 µl de etanol (96-100%) para cada tubo. Por lo tanto, si son 18 muestras se mezclan 4000 µl de cada reactivo (200\*18 + 1%).
8. Agregar 400 µl 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 µl 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 µl 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  $\mu$ 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 extracción de ADN con el kit Wizard

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 200 µl de Nuclei lysis solution, 50 µl de 0.5M EDTA (pH 8.0), 20 µl de proteinasa K y 5 µl de RNase A solution. (Extraer antes la cantidad total a utilizar para evitar contaminar el reactivo de los tubos).
5. Colocar en incubadora a 56 °C durante 24 hrs.
6. Agregar 250 µl de Buffer de Lysis Wizard en cada tubo y mezclar el contenido mediante pipeteo. NOTA la reacción debe de estar caliente durante este paso.
7. Prepare el colector de vacío. Coloque la placa de unión en la base del colector de vacío. Oriente la placa de unión en el colector de vacío con los encabezados de columnas numéricas hacia el puerto de vacío. Conecte la línea de vacío al puerto de vacío en la Base del colector.
8. Transfiera los lisados tisulares a los pocillos de la placa de unión. Aplique vacío hasta que todo el lisado haya pasado a través de la placa de unión 9 (Para mantener un fuerte vacío a través de los pozos, cubra los pozos para reducir la fuga de vacío).
9. Agregue 1 ml de solución de lavado de columna (CWA) a cada pocillo de la placa de unión.
10. Aplique vacío hasta que la solución de lavado de columna (CWA) pase a través de la placa de unión.
11. Repita los pasos 9 y 10 dos veces más para obtener un total de 3 lavados con la Solución de lavado de columna (CWA).
12. Después de que los pozos se hayan vaciado, continúe aplicando vacío durante 6 minutos adicionales para permitir que la matriz de unión se seque.

13. Apaga la máquina de vacío. Suelte la línea de vacío de la base del colector y presiónela en el puerto de vacío en el cuello del colector de vacío. Retire la placa de unión de la base del colector. Seque con un toque suave sobre una toalla de papel limpia para eliminar el etanol residual; repita si es necesario para eliminar todo el etanol residual.

14. Coloque la placa de pocillos profundos de 96 pozos en la cama del colector y coloque el collar del colector de vacío en la parte superior. Oriente la placa con los encabezados de columna numérica hacia el puerto de vacío (Las puntas de la placa de unión deben estar centradas en los pocillos de la placa del pozo profundo y ambas placas deben estar en la misma orientación).

15. Agregue 250µl de agua libre de nucleasas a temperatura ambiente a cada pocillo de la placa de unión e incube durante 2 minutos a temperatura ambiente. Opcional: Para mejorar el rendimiento de ADN, caliente el agua a 65 ° C antes de agregarla a la columna para la elución.

16. Aplique vacío hasta que el agua libre de nucleasas pase a través de la placa de unión.

17. Pasar el ADN que se colectó en los pozos de la placa de 96 pocillos profundos a tubos de 1.5µl. Las muestras se pueden almacenar a -20 o -70 ° C cubriendo la placa firmemente con un sellador de placas.



### **Anexo 3.** Protocolo purificación de PCR AgentCourt AMPure Xp

1. Agite la botella AgentCourt Ampure Xp para resuspender cualquier partícula magnética que pueda haberse asentado.
2. A continuación, agregue AgentCourt Ampure Xp según el volumen de reacción de muestra que se muestra en la Tabla siguiente:

Tabla AMPure XP de volúmenes de reacción de la muestra

<b>Volumen de reacción (µl)</b>	<b>Volumen AMPure XP (µl)</b>
10	18
20	36
50	90
100	180

El volumen de AgentCourt Ampure Xp para una reacción dada se puede derivar de la siguiente ecuación:

(Volumen de AgentCourt Ampure Xp por reacción) = 1,8 x (Volumen de reacción) para purificar todos los pasos de ddRAD-seq

(Volumen de AgentCourt Ampure Xp por reacción) = .4 x (Volumen de reacción) para purificar ADN directo de la extracción

3. Este paso une fragmentos de ADN de 100 pb y mayores a las perlas magnéticas. La mezcla con pipeta es preferible a la agitación con vórtex ya que tiende a ser más reproducible. El color de la mezcla debe aparecer homogéneo después de la mezcla:

- Mezcle bien el reactivo y la muestra con una pipeta mezclando 10 veces. Deje que las muestras mezcladas se incuben durante 5 minutos a temperatura ambiente para una recuperación máxima.

4. Coloque la placa de reacción en una placa Agencourt SPRIPlate 96 Super Magnet durante 2 minutos para separar las perlas de la solución.

IMPORTANTE Espere a que la solución este totalmente clara antes de continuar con el siguiente paso.

5. Este paso debe realizarse mientras la placa de reacción está situada en Agencourt SPRIPlate 96vSuper Magnet Plate:

- aspire el sobrenadante de la placa de reacción y deséchela. Deje 5  $\mu$ L de sobrenadante atrás, de lo contrario, las perlas se extraen con el sobrenadante.

IMPORTANTE Realice el siguiente paso con la placa de reacción situada en una placa Agencourt SPRIPlate 96 Super Magnet. No agitar las perlas magnéticas separadas. Además, asegúrese de eliminar todo el etanol del fondo del pozo.

6. Dispense 200  $\mu$ L de etanol al 70% en cada pocillo de la placa de reacción e incube durante 30 segundos a temperatura ambiente. Aspirar el etanol y desecharlo.

NOTA Si el volumen total de la muestra más el reactivo excede los 200  $\mu$ l, entonces use un volumen de lavado de al menos el volumen de la muestra más el reactivo.

Repita para un total de dos lavados.

Las perlas no se extraen fácilmente cuando están en alcohol, por lo que no es necesario dejar ningún sobrenadante detrás.

7. Retire la placa de reacción de la placa de imán y luego agregue 40  $\mu$ L de buffer de elución a cada pocillo de la placa de reacción y pipetee la mezcla 10 veces. Incubar durante 2 minutos.

El nivel del líquido será lo suficientemente alto como para entrar en contacto con las perlas magnéticas a un volumen de elución de 40  $\mu$ L.

8. Coloque la placa de reacción en una placa Agencourt SPRIPlate 96 Super Magnet durante 1 minuto para separar las perlas de la solución.

9. Transfiera el sobrenadante a tubos nuevos previamente etiquet

**Anexo 4.** Protocolo para cuantificar fluorimetría (*Qubit dsDNA HS Assay Kits*)

1. NOTA. Qubit dsDNA HS ofrece un rendimiento óptimo cuando todas las soluciones se encuentran a temperatura ambiente (22-28°C).

2. NOTA. Para permitir que el Qubit alcance una fluorescencia óptima, incube los tubos para los ensayos de ADN y ARN durante 2 minutos después de mezclar la muestra o el estándar con la solución de trabajo.

3. NOTA. Para cada ensayo, tiene la opción de ejecutar una nueva calibración o utilizar los valores de la calibración anterior.

4. Configure la cantidad requerida de tubos de 0.5 mL para estándares y muestras. El Qubit dsDNA HS Assay requiere 2 estándares.

Nota: Use solo tubos de PCR de pared delgada, transparentes, de 0,5 ml. Los tubos aceptables incluyen los tubos de ensayo Qubit (n.º de catálogo Q32856) o los tubos Axygen® PCR-05-C (nº de pieza 10011-830).

5. Etiqueta las tapas de los tubos.

Nota: No etiquete el lado del tubo, ya que podría interferir con la lectura de la muestra.

6. Prepare la solución de trabajo Qubit diluyendo el Qubit dsDNA HS Reagent 1:200 en Qubit dsDNA HS Buffer. Use un tubo de plástico limpio cada vez que prepare la solución de trabajo Qubit. No mezcle la solución de trabajo en un recipiente de vidrio.

Nota: El volumen final en cada tubo debe ser de 200 µL. Cada tubo estándar requiere 190 µL de solución de trabajo Qubit, y cada tubo de muestra requiere entre 180-199 µL. Prepare suficiente solución de trabajo Qubit para acomodar todos los estándares y muestras.

7. Agregue 190 µL de solución de trabajo Qubit a cada uno de los tubos utilizados para los estándares.

8. Agregue 10  $\mu\text{L}$  de cada estándar Qubit al tubo apropiado, luego mezcle agitando en vórtex 2-3 segundos. Tenga cuidado de no crear burbujas.

Nota: El pipeteo es crítico para garantizar que se agreguen exactamente 10  $\mu\text{L}$  de cada estándar Qubit a 190  $\mu\text{L}$  de solución de trabajo Qubit.

9. Agregue la solución de trabajo Qubit a los tubos de ensayo individuales para que el volumen final en cada tubo después de agregar la muestra sea de 200  $\mu\text{L}$ .

Nota: Su muestra puede estar entre 1-20  $\mu\text{L}$ . Agregue un volumen correspondiente de solución de trabajo Qubit para cada tubo de ensayo: entre 180 y 199  $\mu\text{L}$ .

10. Agregue cada muestra a los tubos de ensayo que contienen el volumen correcto de solución de trabajo Qubit, luego mezcle agitando en vórtex 2-3 segundos. El volumen final en cada tubo debe ser de 200  $\mu\text{L}$ .

11. Permita que todos los tubos incuben a temperatura ambiente durante 2 minutos.

Proceda a "Leer estándares y muestras"; siga el procedimiento apropiado para su instrumento:

12. En la pantalla de inicio del fluoómetro Qubit 3.0, presione DNA, luego seleccione dsDNA High Sensitivity como tipo de ensayo. Se muestra la pantalla "Leer estándares". Presione Leer estándares para continuar.

Nota: Si ya ha realizado una calibración para el ensayo seleccionado, el instrumento le pedirá que elija entre leer nuevos estándares y ejecutar muestras usando la calibración anterior.

13. Presione Run Samples.

En la pantalla de análisis, seleccione el volumen y las unidades de muestra:

14. Presione los botones + o - en la rueda para seleccionar el volumen de muestra agregado al tubo de ensayo (de 1-20  $\mu\text{L}$ ).

En el menú desplegable, seleccione las unidades para la concentración de muestra de salida.

15. Inserte un tubo de muestra en la cámara de muestra, cierre la tapa, luego presione el tubo de lectura. Cuando la lectura esté completa (~ 3 segundos), retire el tubo de muestra.

El instrumento muestra los resultados en la pantalla del ensayo. El valor superior (en letra grande) es la concentración de la muestra original. El valor inferior es la concentración de dilución. Para obtener información sobre la interpretación de los resultados de la muestra, consulte la Guía del usuario del Fluorómetro Qubit 3.0.

16. Repita el paso 15 hasta que todas las muestras hayan sido leídas.

**Anexo 5.** Frecuencias haplotípicas de *O. libertate* en los cinco sitios de muestreo del Pacífico Oriental.

Haplotipo	Bahía Magdalena	Guaymas	Mazatlán	Costa Rica	El Salvador
Hap_1	0.0667	0	0	0	0
Hap_2	0.0333	0	0	0	0
Hap_3	0.0333	0	0	0	0
Hap_4	0.0333	0	0	0	0
Hap_5	0.0333	0	0	0	0
Hap_6	0.0333	0	0	0	0
Hap_7	0.0333	0	0	0	0
Hap_8	0.0333	0	0	0	0
Hap_9	0.0333	0	0	0	0
Hap_10	0.0333	0	0	0	0
Hap_11	0.0333	0	0	0	0
Hap_12	0.0333	0	0	0	0
Hap_13	0.0333	0	0	0	0
Hap_14	0.0333	0	0	0	0
Hap_15	0.0333	0	0	0	0
Hap_16	0.0333	0	0	0	0
Hap_17	0.0333	0	0	0	0
Hap_18	0.0333	0	0	0	0
Hap_19	0.0333	0	0	0	0
Hap_20	0.0333	0	0	0	0

---

Hap_21	0.0333	0	0	0	0
Hap_22	0.0333	0	0	0	0
Hap_23	0.0333	0	0	0	0
Hap_24	0.0333	0	0	0	0
Hap_25	0.0333	0	0	0	0
Hap_26	0.0333	0	0	0	0
Hap_27	0.0333	0	0	0	0
Hap_28	0.0333	0	0	0	0
Hap_29	0.0333	0	0	0	0
Hap_30	0	0.0303	0	0	0
Hap_31	0	0.0303	0	0	0
Hap_32	0	0.0303	0	0	0
Hap_33	0	0.0303	0	0	0
Hap_34	0	0.0303	0	0	0
Hap_35	0	0.0303	0	0	0
Hap_36	0	0.0303	0	0	0
Hap_37	0	0.0303	0	0	0
Hap_38	0	0.0303	0	0	0
Hap_39	0	0.0303	0	0	0
Hap_40	0	0.0303	0	0	0
Hap_41	0	0.0303	0	0	0
Hap_42	0	0.0303	0	0	0

---

---

Hap_43	0	0.0303	0	0	0
Hap_44	0	0.0303	0	0	0
Hap_45	0	0.0303	0	0	0
Hap_46	0	0.0303	0	0	0
Hap_47	0	0.0303	0	0	0
Hap_48	0	0.0303	0	0	0
Hap_49	0	0.0303	0	0	0
Hap_50	0	0.0606	0	0	0
Hap_51	0	0.0303	0	0	0
Hap_52	0	0.0303	0	0	0
Hap_53	0	0.0303	0	0	0
Hap_54	0	0.0606	0	0	0
Hap_55	0	0.0303	0	0	0
Hap_56	0	0.0303	0	0	0
Hap_57	0	0.0303	0	0	0
Hap_58	0	0.0303	0	0	0
Hap_59	0	0.0303	0	0	0
Hap_60	0	0.0303	0	0	0
Hap_61	0	0	0.0286	0	0
Hap_62	0	0	0.0286	0	0
Hap_63	0	0	0.0286	0	0
Hap_64	0	0	0.0286	0	0

---



---

Hap_65	0	0	0.0286	0	0
Hap_66	0	0	0.0286	0	0
Hap_67	0	0	0.0286	0	0
Hap_68	0	0	0.0286	0	0
Hap_69	0	0	0.0286	0	0
Hap_70	0	0	0.0286	0	0
Hap_71	0	0	0.0286	0	0
Hap_72	0	0	0.0286	0	0
Hap_73	0	0	0.0571	0	0
Hap_74	0	0	0.0286	0	0
Hap_75	0	0	0.0571	0	0
Hap_76	0	0	0.0286	0	0
Hap_77	0	0	0.0286	0	0
Hap_78	0	0	0.0286	0	0
Hap_79	0	0	0.0286	0	0
Hap_80	0	0	0.0286	0	0
Hap_81	0	0	0.0286	0	0
Hap_82	0	0	0.0286	0	0
Hap_83	0	0	0.0286	0	0
Hap_84	0	0	0.0286	0	0
Hap_85	0	0	0.0286	0	0
Hap_86	0	0	0.0286	0	0

---

---

Hap_87	0	0	0.0286	0	0
Hap_88	0	0	0.0286	0	0
Hap_89	0	0	0.0286	0	0
Hap_90	0	0	0.0286	0	0
Hap_91	0	0	0.0286	0	0
Hap_92	0	0	0.0286	0	0
Hap_93	0	0	0	0.0769	0
Hap_94	0	0	0	0.0769	0
Hap_95	0	0	0	0.231	0
Hap_96	0	0	0	0.0769	0
Hap_97	0	0	0	0.0769	0
Hap_98	0	0	0	0.0769	0
Hap_99	0	0	0	0.0769	0
Hap_100	0	0	0	0.0769	0
Hap_101	0	0	0	0.0769	0
Hap_102	0	0	0	0.0769	0
Hap_103	0	0	0	0.0769	0
Hap_104	0	0	0	0	0.0714
Hap_105	0	0	0	0	0.0714
Hap_106	0	0	0	0	0.0714
Hap_107	0	0	0	0	0.0714
Hap_108	0	0	0	0	0.0714

Hap_109	0	0	0	0	0.0714
Hap_110	0	0	0	0	0.0714
Hap_111	0	0	0	0	0.0714
Hap_112	0	0	0	0	0.0714
Hap_113	0	0	0	0	0.0714
Hap_114	0	0	0	0	0.0714
Hap_115	0	0	0	0	0.0714
Hap_116	0	0	0	0	0.0714
Hap_117	0	0	0	0	0.0714

---

## **Anexo 6.** Productos de investigación

### Publicaciones científicas

Pérez-Quiñonez, C. I., Quiñonez-Velázquez, C., Ramírez-Pérez, J. S., Vergara-Solana, F. J. & García-Rodríguez, F. J. 2017. Combining geometric morphometrics and genetic analysis to identify species of *Opisthonema* Gill 1861 in the eastern Mexican Pacific. *J. Appl. Ichthyol.* 33: 84-92.

Pérez-Quiñonez, C.I., C. Quiñonez-Velázquez & F.J. García-Rodríguez. 2018. Detecting *Opisthonema libertate* (Günther, 1867) phenotypic stocks in northwestern coast Mexico using geometric morphometrics based on body and otolith shape. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 46(4).DOI: 10.3856/vol46-issue4-fulltext-x.

C. I. Pérez-Quiñonez, C. Quiñonez-Velázquez and F. J. García-Rodríguez. Genetic homogeneity of the Pacific thread herring *Opisthonema libertate* (Günther, 1867) in the Eastern Pacific, inferred from mtDNA sequences. (Sometido, junio 2018).



## Combining geometric morphometrics and genetic analysis to identify species of *Opisthonema* Gill, 1861 in the eastern Mexican Pacific

By C. I. Pérez-Quiñónez<sup>1</sup>, C. Quiñónez-Velázquez<sup>1</sup>, J. S. Ramírez-Pérez<sup>2</sup>, F. J. Vergara-Solana<sup>1</sup> and F. J. García-Rodríguez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Instituto Politécnico Nacional, La Paz, Baja California Sur, Mexico; <sup>2</sup>Facultad de Ciencias del Mar-Universidad Autónoma de Sinaloa, Mazatlán, Sinaloa, Mexico

### Summary

Studies focusing on the specific identification of the taxonomic cast within the genus *Opisthonema* are scarce and contradictory, in spite of this species commercial importance and of the potential ecological impact that fisheries may have on the pelagic ecosystem. In this study, the specific composition of thread herrings *Opisthonema* (*O. bulleri*, *O. medirastre*, and *O. libertate*) in the southeastern region of the Gulf of California was identified using meristic characters, morphometric data, and mtDNA sequences. In this paper we supported the hypothesis that the commercial catch comprises three evolutionary entities with meristic and morphometric differences. The results were based on the number of ceratobranchial gill rakers, the presence of spicules on the gill rakers, the form of insertion of the gill rakers base onto the ceratobranchial segment, the geometric morphometrics of body shape, and the genetic distances from a fragment of Cytochrome Oxidase Subunit I gene (COI) of mtDNA. Specimens of Pacific thread herring were obtained from landings of the small pelagic fleet at Mazatlán, Sinaloa during 2011–2012. Taxonomic categories were assigned to 1060 individuals according to the measurement of meristic characters. A total of 228 thread herrings *O. bulleri*, (n = 76), *O. medirastre* (n = 76), and *O. libertate* (n = 76) were used in the morphometric analysis, and 25 specimens (*O. bulleri* n = 8, *O. medirastre* n = 7, and *O. libertate* n = 10) were used for genetic comparisons. The morphometric results showed differences among the three groups that had been previously identified using meristic characters, giving support to the existence of three discrete morphotypes. The percentage of sequence divergence of the COI gene supports the existence of three clades. Genetic distances were considerably lower within each clade than between clades. The results of this study provide sufficient evidence for the existence of three Pacific thread herring species in the southern Gulf of California.

### Introduction

Pacific thread herring is the common name for species of *Opisthonema* Gill, 1861. These are marine fish with ampho-American distribution, limited to coastal areas in tropical and subtropical waters. The main diagnostic character is a

filamentous prolongation of the last ray of the dorsal fin (Berry and Barrett, 1963). Some authors recognize the existence of three species inhabiting the Mexican Pacific coast: *O. bulleri* (Regan, 1904), *O. medirastre* (Berry and Barrett, 1963), and *O. libertate* (Günther, 1867). They are distributed from the western coast of the Baja California Peninsula, including the Gulf of California, Mexico, to the north of Peru (Berry and Barrett, 1963).

Between the years 2006 and 2012, catches of these fishes along the western coast of Mexico totaled 1 062 272 tonnes (SAGARPA-CONAPESCA, 2013), which were consumed directly by humans or transformed into fishmeal and fish oil (Nevárez-Martínez et al., 2006; Jacob-Cervantes, 2010).

Fisheries statistics of thread herrings to date do not reflect population or species statuses because fisheries evaluations still consider catches as the '*Opisthonema* complex' (Acal, 1990; Ruiz and Lyle, 1992; Jacob-Cervantes, 2010) because it is difficult to identify species of this sympatric group (Berry and Barrett, 1963). This represents an important problem for resource evaluation, as errors can be introduced into the models in parameters such as fecundity, sex ratio, growth rates, and mortality, which are estimated from mixed species and can give rise to errors in species biomass (Acal, 1990). The problem is compounded because the determination of species is unclear.

Berry and Barrett (1963) recognized three species and proposed a method for identification based on the number of gill rakers of the ceratobranchial bone of the first gill arch: 28–35 *O. bulleri*; 50–68 *O. medirastre*, and 71–107 *O. libertate*. Based on an analysis of allozyme polymorphism, López-Lemus (1986) proposed that there was only one species with three morphotypes. Rodríguez-Domínguez (1987) and Hedgecock et al. (1988) analyzed bio-ecological and biochemical information, and supported the importance of the meristic characters proposed by Berry and Barrett (1963) for identifying the three species. Torres-Ramírez (2004) proposed complementary criteria for identification, considering the shape of the insertion of the gill rakers at the base of the ceratobranchial segment and the quantity of spicules within the gill raker's body. An analysis including morphologic information coupled with approaches that combine other tools such as the use of geometric morphometrics and DNA sequences has not yet been carried out to confirm the

number of taxonomic units captured in Mexico. Taking into consideration the extant information, central to this paper was the testing and support of the hypothesis that the commercial catch is integrated by three evolutionary entities that maintain meristic and morphometric differences.

Traditionally, identification has been carried out using morphological and meristic data (Cadrin and Friedland, 1999; Cadrin, 2000; De La Cruz-Agüero and García-Rodríguez, 2004; Ibáñez-Aguirre et al., 2006). Data from epigenetic and genetic analyses in addition to geometric morphometrics (shape analysis) have been increasingly used in defining taxonomic entities in the field of fisheries (Cadrin, 2000; Ramírez-Pérez et al., 2010; García-Rodríguez et al., 2011; Vergara-Solana et al., 2013; Vilizzi and Kováč, 2014). Shape analyses assume that individuals with high similarity will have a narrow biological and ecological relationship (Cadrin, 2005), given that morphometric variability results from growth, and that shape changes based on genetic (Lombarte and Leonart, 1993; Cardinale et al., 2004; Vignon and Morat, 2010), epigenetic (Komers, 1997; Schlichting and Pigliucci, 1998; Vilizzi and Kováč, 2014) and environmental regulation, as well as on depth, water temperature, and type of substrate (Lombarte and Leonart, 1993; Gagliano and McCormick, 2004; Mérigot et al., 2007).

The aim of this study was to confirm whether genetic data support the existence of three species of the genus *Opisthonema* distributed in Mexico, and to explore their differences in body shape using geometric morphometrics.

## Materials and methods

### Sampling and meristic identification of species

Pacific thread herring *Opisthonema* spp. were obtained approximately once a month between September 2011 and December 2012 (January = 214, March = 139, April = 30, May = 100, June = 62, July = 298, August = 279, September = 190, November = 92 and December = 194) from landings of the small pelagic fleet in Mazatlán that fishes from the north of Sinaloa to the north of Jalisco (Fig. 1). It was not possible to obtain samples in February and October due to logistical difficulties and to the seasonal fishery closure, respectively. All administrative zones were represented in the sampling (I = 229, II = 119, III = 626, IV = 281, V = 41, unknown = 302). A total of 1598 herring were obtained, ranging from 120 to 240 mm standard length (SL). All fleets use gear of 25 mm mesh size.

Fish were digitally photographed and the first gill arch (Fig. 2a) of each fish was extracted, washed under running water, dried at room temperature for 24 h, and photographed with a digital camera mounted on a fixed base. A metric scale was placed on the background surface. Identification was based on a count of the number of ceratobranchial gill rakers with respect to standard length according to the criteria reported by Berry and Barrett (1963), and on the presence or absence of spicules on the gill rakers, as well as on the form of the insertion at the base of the gill rakers on the ceratobranchial segment according to the criteria reported by Torres-Ramírez (2004). The number of gill rakers and presence of spicules were obtained from

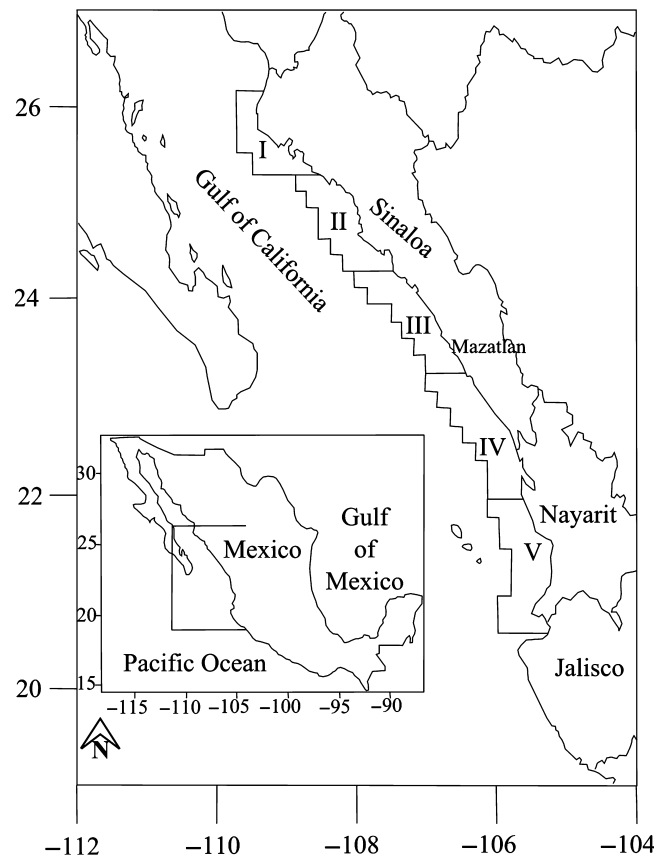


Fig. 1. Administrative zones of the small pelagic fishing fleet, southern Gulf of California (I–V)

digital images, using TPSDIG VER. 1.4 software (Rohlf, 2004) (Fig. 2b).

### Morphometric analysis

Geometric morphometrics were performed on 228 selected thread herring. Each species was represented by 76 individuals, based on the sample size of *O. bulleri*, the least-represented species among our specimens. We did not take into consideration the gender or maturity stage of individuals in our analyses. We assumed that gender and maturity stage did not affect comparisons, because Hedgecock et al. (1988) found that differences between and among the body shapes of species were not related to sex or maturity stage in specimens collected in the Gulf of California.

A configuration of 13 landmarks was defined from the digital image of each specimen (Fig. 3). All of the landmarks were digitized using TPSDIG VER. 1.4 software (Rohlf, 2004). Differences attributed to location, scale, and rotation, were removed using the Generalized Procrustes Analysis, with COORDGEN6 software (Sheets, 2004). The Procrustes distance was compared between each pair of species to determine differences among them. The significance of the test was based on the comparison of the F value (variance ratio) obtained from the observed values, with the F values obtained by 1000 re-samplings made with the TWOGROUP6H software

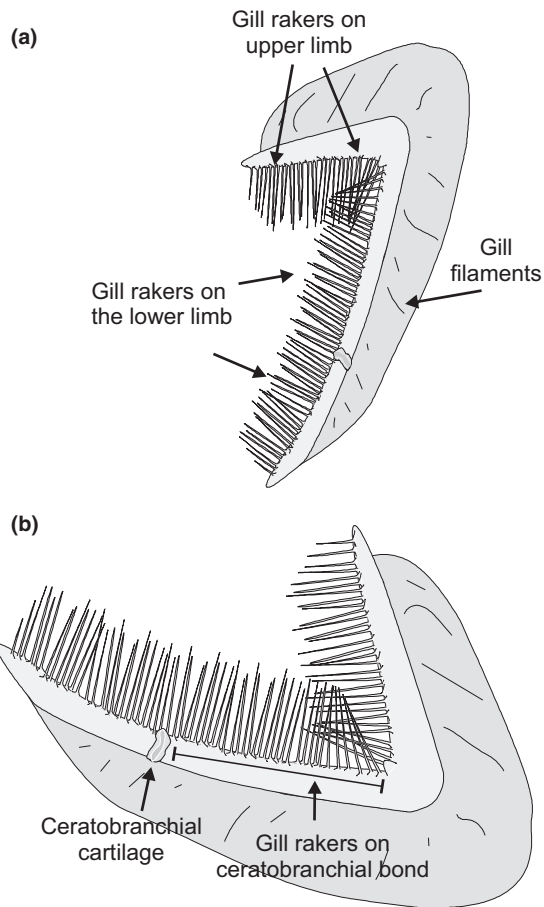


Fig. 2. Characteristics of gill rakers from the edges of the ceratobranchial segment of the first gill arch, Pacific thread herring specimen. (a) Shape of the first gill arch; (b) Gill rakers on ceratobranchial bone

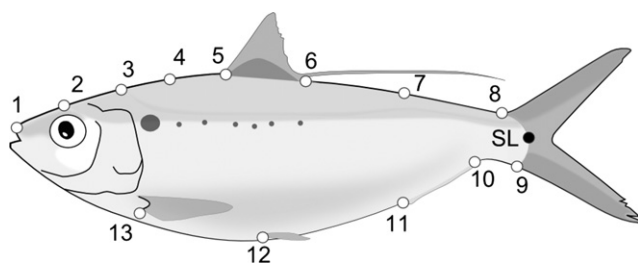


Fig. 3. Graphic representation of a thread herring, indicating the configuration used to represent body shape in the morphometric analyses. Location of the 13 marks: 1 (snout tip), 5 (anterior insertion of dorsal fin), 6 (posterior insertion of dorsal fin), 8 (dorsal insertion of caudal fin), 9 (ventral insertion of caudal fin), 11 (posterior insertion of anal fin), 12 (anterior insertion of pelvic fin), 13 (anterior insertion of pectoral fin), and five semi-landmarks (2, 3, 4, 7, and 10)

(Sheets, 2004). The partial warp scores, obtained from the Thin Plate Spline interpolation function, were used in a Canonical Variate Analysis (CVA) as shape-variation descriptors among species (Bookstein, 1991; Rohlf and Marcus, 1993; Adams et al., 2004) after testing for differences among the groups. Statistically significant differences among

groups were determined through Multivariate Analysis of Variance (MANOVA) using the Wilks' Lambda ( $\Lambda$ ) value. An assignment matrix was obtained using the Mahalanobis Distance (distance from the specimen to the multivariate space's mean of the nearest group, D2), on the scores produced in the CVA. Moreover, the D2 were used to build a dendrogram to display the affinities among the different shapes of the three species. Both the CVA and assignment matrix were made using CVAGEN6 m software (Sheets, 2004). The dendrogram was constructed by Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) algorithm using the Neighbor module from PHYLIP 3.69 software (Felsenstein, 1989). We estimated Cohen's kappa coefficient ( $\kappa$ ) to determine the error in the classification matrix because it measures the difference between randomness and percentage of correct assignment (Tuset et al., 2003). The  $\kappa$  varies from 0 to 1. High values indicate an accurate assignment and, in general, if  $\kappa > 0.70$ , the assignment is considered satisfactory. The pattern of shape variations among groups was visualized by plotting vectors that were produced in the partial warp analysis and by interpolating the variation from homologous points (Thin Plate Spline).

#### Genetic analysis

We used 25 specimens (*O. bulleri*,  $n = 8$ ; *O. medirastre*,  $n = 10$ ; and *O. libertate*,  $n = 7$ ) to identify genetic clades. The DNA was obtained using a commercial kit (QIAquick PCR Purification Kit 28106; Qiagen, Hilden, Germany) for spin-column protocol for animal tissues. A fragment of Cytochrome Oxidase Subunit 1 gene (COI) of mtDNA was amplified using the primers designed by Ward et al. (2005): FishF2 and FishR2. The volume of PCR reaction was 25  $\mu$ l, prepared with 1.16  $\mu$ l DNA; 2.5  $\mu$ l PCR Buffer Taq (10 $\times$ ); 0.5  $\mu$ l dNTP mix (10 mM) (Invitrogen, Carlsbad, CA); 1  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (50 mM) (Invitrogen); 0.7  $\mu$ l of each primer (10 mM); 18.315  $\mu$ l H<sub>2</sub>O Milli-Q; and 0.125  $\mu$ l Taq DNA polymerase (5 U  $\mu$ l<sup>-1</sup>) (Invitrogen). The thermal cycler protocol was: 2 min initial denaturation at 94°C, and 35 cycles of 30 s at 94°C for denaturation, 30 s at 49°C for annealing, and 1 min at 72°C for extension. A final extension of 10 min at 72°C was performed. The quality of the resulting products was confirmed by 1% agarose gel electrophoresis using a stain (GelGreen, Biotium, Hayward, CA), and visualized in a trans-illuminator (DyNA Light UV; Labnet International, Edison, NJ). The successful products from PCR were purified and sequenced in both directions (Macrogen, Seoul, South Korea). Sequences were arranged and edited using CHROMASPRO 1.41 software (Technelysium, Brisbane, Qld, Australia). Subsequently, all sequences were aligned with Clustal W algorithm and limited to the same size (583 bp), using MEGA 5.05 software (Tamura et al., 2011). Sequences were deposited in GenBank (access number KU587814–KU587838).

The percentage of intra- and inter-specific genetic distance was estimated with the Kimura two-parameter model (Kimura, 1980). A tree was constructed using the Neighbor Joining method, also based on the Kimura two-parameter model. Branch robustness was estimated from 1000 iterations.



These analyses were performed using MEGA 5.05 software (Tamura et al., 2011).

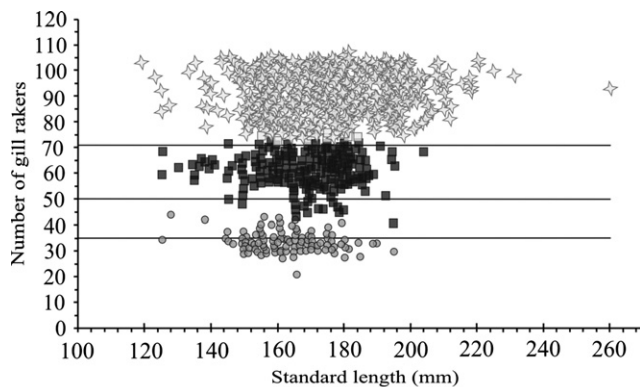
**Results**

**Meristic differences**

The scatter diagram of thread herring size and number of gill rakers (Fig. 4) shows a general pattern, as proposed by Berry and Barrett (1963). As there was no clear separation among the species, assignment of specimens (n = 90) at the end of the intervals of gill raker number was based on the criteria proposed by Torres-Ramírez (2004). Thus, from the total number of specimens obtained (n = 1598), 1060 were identified as: 164 (15.5%) *O. bulleri*, 424 (40%) *O. medirastre*, and 472 (44.5%) *O. libertate*. For the remaining thread herrings, the condition of the gill arch severely limited the gill raker count.

**Morphometric differences**

The Procrustes distances between each pair of species were statistically significant (P < 0.01) in all cases (F = 20.46 for *O. bulleri* vs *O. libertate*; F = 14.04 for *O. bulleri* vs *O. medirastre*; F = 13.03 for *O. libertate* vs *O. medirastre*), supporting the existence of three different shapes. The two axes obtained from CVA were statistically significant (Wilk's Lambda = 0.26, P < 0.001 for CV1; Wilk's Lambda = 0.75, P = < 0.001 for CV2). The CV1 (eigenvalue = 85.5%) had three times more discriminant power than CV2 (eigenvalue = 14.5%). The shape of *O. bulleri* was separated from the other two species mainly by CV1, while CV2 separated *O. medirastre* from *O. libertate* (Fig. 5). Considering the Mahalanobis distance, an average of 79% correct assignment of thread herring was obtained (Table 1). The weighted Cohen's kappa coefficient indicated a classification efficiency of 68% ( $\kappa = 0.68$ , S.E. = 0.041, 95% confidence interval = 0.605–0.764, Z = 16.6, P < 0.001), which suggests that it was not a random result.



• *O. bulleri*, n = 166 ■ *O. medirastre*, n = 424 ▲ *O. libertate*, n = 664  
 Fig. 4. Scatter diagram of the number of ceratobranchial gill rakers of the first gill arch based on the standard length of Pacific thread herring caught along the mainland coast of the southern Gulf of California. Horizontal lines = interval limits of the number of gill rakers, according to Berry and Barret (1963). *Opisthonema bulleri* (28–35), *O. medirastre* (50–68), and *O. libertate* (71–107)

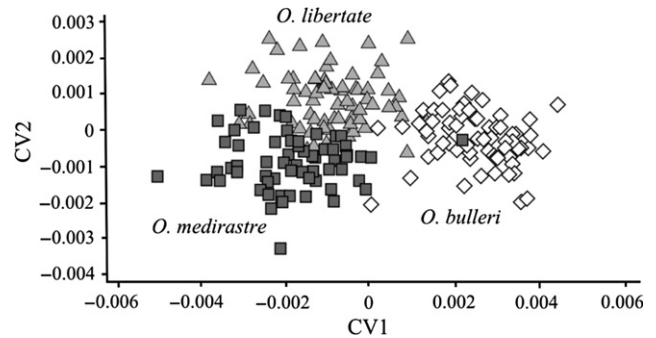


Fig. 5. Dispersion of scores from the Canonical Variate Analysis (CVA). Black squares = *Opisthonema medirastre*, white diamonds = *O. bulleri*, grey triangles = *O. libertate*

Table 1

Assignment matrices generated from scores produced in the CVA, as percentages for three species in the genus *Opisthonema* collected September 2011 – December 2012

Species	<i>O. bulleri</i>	<i>O. medirastre</i>	<i>O. libertate</i>	n	Correct assignment
<i>O. bulleri</i>	<b>84.2</b>	9.2	6.5	76	
<i>O. medirastre</i>	11.8	<b>75.0</b>	13.1	76	
<i>O. libertate</i>	1.3	21.0	<b>77.6</b>	76	79.0%
Total				228	

Bold = correct classification percentages based on Mahalanobis distance.

Sample size (n = 228) = number of individuals analyzed.

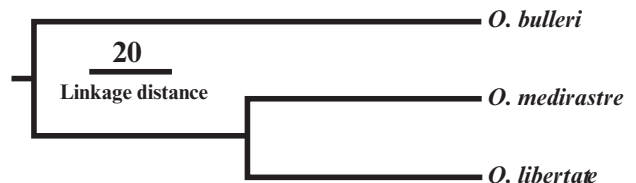


Fig. 6. Dendrogram generated by Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) algorithm using Mahalanobis distance between species

The graphic representation of the relationship among the species shapes obtained from the dendrogram (Fig. 6) suggests a stronger similarity between the shapes of *O. medirastre* and *O. libertate*. The results of shape variation among groups (Fig. 7) indicated that *O. bulleri* had the most important morphological differences within this species complex (Fig. 7a, b), namely, a lower dorsal body slope, with all marks tending to move towards the dorsal zone; hence, these individuals can be described as having lower body depth. In the other two species, differences in the dorsal region had a diagonal direction towards the posterior end and ventral side (Fig. 7c), which extended from the origin of the anal fin to the lower origin of the caudal fin. *O. libertate* was more depressed than *O. medirastre* at these points.

**Genetic differences**

The tree constructed using the neighbor-joining method, considering all of the sequences, robustly supports the existence



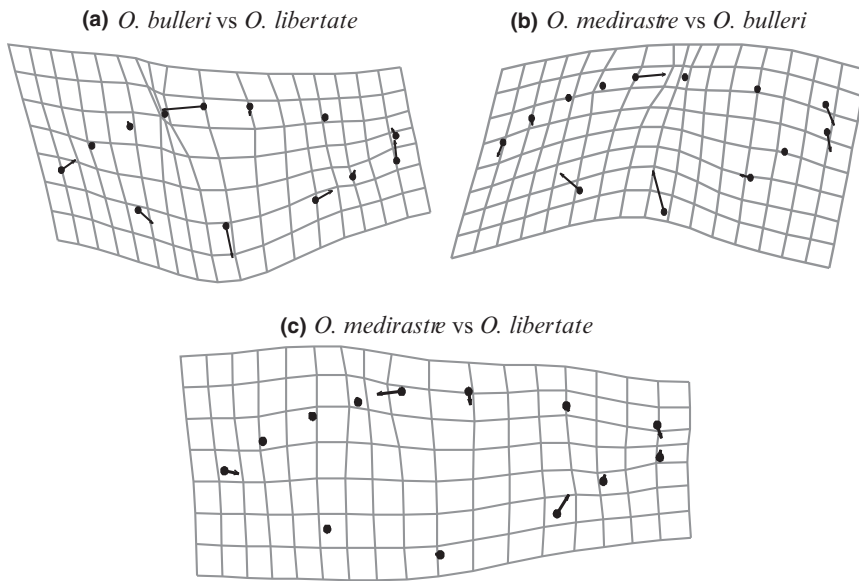


Fig. 7. Deformation grids resulting from comparison of average shape of each species with respect to global average shape, where size and direction of the arrows indicate the magnitude of variation among species. Grids are zoomed in at 2×. (a) and (b), *Opisthonema bulleri* has a different body shape (lower height) than *O. medirastre* and *O. libertate*. (c) *O. medirastre* and *O. libertate* differ due to changes in the region of the caudal peduncle to the anal fin, and of the caudal peduncle to the dorsal fin

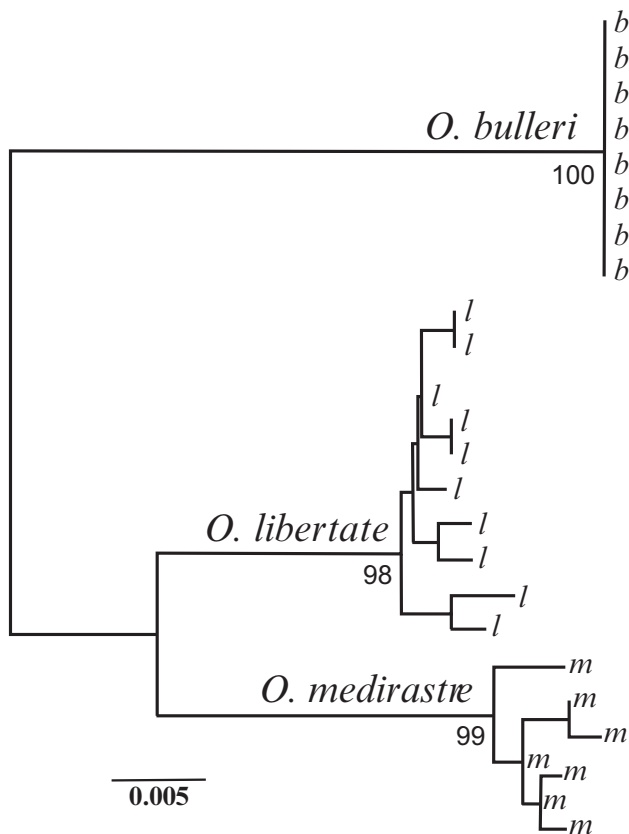


Fig. 8. Grouping tree constructed with the neighbor-joining clustering method (bootstrap of 1000) using genetic distances based on Kimura's two-parameter model. Three genetically different groups and relatively low variability within each clade are observed

of three genetically differentiated clades (Fig. 8). The genetic distances within each clade (0.000, 0.005, and 0.004 for *O. bulleri*, *O. libertate*, *O. medirastre*, respectively) were con-

Table 2  
Genetic distance estimate (in percent) for three species in the genus *Opisthonema* (n = 25), based on the Kimura two-parameter model (sampling from September 2011 to December 2012)

	<i>O. bulleri</i>	<i>O. libertate</i>	<i>O. medirastre</i>
<i>O. bulleri</i>	0.0		
<i>O. libertate</i>	4.6	0.5	
<i>O. medirastre</i>	5.1	2.9	0.4

siderably lower than distances among clades (Table 2). The intra-clade distance was 0.3% on average, which is lower than the lowest distance found between any pair of clades (2.9% between *O. libertate* vs *O. medirastre*).

We found 49 nucleotide differences out of 664 arrangements in at least one species (Table 3). Fixed differences were found in each of the species. We found at least 18 fixed differences in *O. bulleri*, at least eight differences in *O. libertate*, and at least eight differences in *O. medirastre*. The genetic data were congruent with the morphometric analysis, as both suggested that *O. libertate* and *O. medirastre* were the most similar species (Fig. 8).

**Discussion**

In contrast to Berry and Barrett (1963), who reported different intervals in the number of ceratobranchial gill rakers in sardines (>120 mm SL for each species), a superimposition in the number of gill rakers was observed for all analyzed sizes (120–240 mm SL) of the three species in our study. Similar results were found by Rodríguez-Sánchez (1985), who compared *O. medirastre* and *O. libertate*. For this reason, in our study the species assignment was based on the complementary criteria proposed by Torres-Ramírez (2004) of gill rakers and presence or absence of spicules. These characters



are easy to observe, allowing for faster identification and providing greater support than the criteria proposed by Berry and Barrett (1963).

Our analysis gave statistical support to the existence of three discrete morphotypes, in congruence with those obtained from meristic data; the percentage of correct assignment observed, however, was relatively low (79%). Some authors have found a percentage of correct assignment of 100% (De La Cruz-Agüero et al., 2015) using geometric morphometrics, which indicates large differences in the studied species. In our case, the value was even lower than values found at population or stock level in studies of Pacific sardine from Mexico (García-Rodríguez et al., 2011; Vergara-Solana et al., 2013). Our data indicate that although the three species present significant differences, their morphometric similarity is high. Therefore, taxonomic groups with high similarities such as the Pacific thread herring need to be reviewed using different approaches to give support in a robust manner to the number of valid taxonomic groups at the species level.

Hedgecock et al. (1988) confirmed the utility of body shape in distinguishing variations of *Opisthonema* species using traditional morphometry, where fish height was the distinctive characteristic of the three species. However, with the application of traditional morphometry it is not possible to recover the shape of the individual, since the matrices used are based on unidimensional data, and only an abstract representation of the structure can be obtained (Rohlf and Marcus, 1993). In our study we applied geometric morphometric analysis to identify differences in the body shape of three species of Pacific thread herring. In geometric morphometrics, the biological homology criteria limit the selection of landmarks that provide information on shape, so that one can obtain results that make inferences about shape (Zelditch et al., 2004). Using geometric morphometrics, particularly the Thin Plate Spline interpolation function, we can obtain a visualization of morphological changes.

Several approaches have been applied to distinguish species of the genus *Opisthonema*, including the analysis of geographic variations in meristic and morphometric characters, and allozyme electrophoresis (Berry and Barrett, 1963; Hedgecock et al., 1988). We also report differences based on DNA sequences: the percentages of COI distance revealed three species (*O. bulleri*, *O. medirastre*, and *O. libertate*). The length of the branches in the neighbor-joining tree (Fig. 8) indicates high divergence between clades, compared with low levels of genetic differentiation within clades, which strongly supports three natural groups. These findings, in congruence with morphometric and meristic data, confirm the results of several authors (Berry and Barrett, 1963; Rodríguez-Domínguez, 1987; Torres-Ramírez, 2004), including Hedgecock et al. (1988) who showed the occurrence of three taxa at species level. The COI gene has been used to resolve species identification problems at the molecular level, such as in *Scomberomorus sierra* (Ramírez-Pérez, 2010), and in species of the genus *Diapterus* (Vergara-Solana, 2012), and of the genus *Eucinostomus* (Martínez-Guevara et al., 2014). Many other studies (Grant and Utter, 1984; Patarnello et al., 1994; Di Finizio et al., 2007; Imaizumi et al., 2007; Lakra et al., 2009) demonstrated minimized uncertainty in species identification

with the use of several genetic markers, and COI has acquired substantial attention as a useful marker for species identification and definition (Hebert et al., 2003). In our study, we integrated information from multiples sources, combining meristic data for identifying the species, morphometric methods for a detailed analysis of body shape, and DNA sequences for supporting the existence of the three evolutionary entities.

The commercial catch can be better surveyed when species identification is robust. The composition of catches in this region agrees with the report by Berry and Barrett (1963). *Opisthonema libertate* is the species that provides the highest proportion of catches (Ruiz and Lyle, 1992) and *O. bulleri* is the least common species in catches of this genus (Castro-González et al., 1997). A similar composition was reported in Central America by Vega-Corrales (2010), with no evidence that the catch is selective (Stevenson and Carranza, 1981).

In the present study, we found enough evidence for supporting the existence of three species of Pacific thread herring throughout the southeastern Gulf of California by combining morphologic, morphometric and genetic data. Mitochondrial and nuclear genes, as well as the analysis of more species of *Opisthonema*, should provide support to the close relationship between *O. libertate* and *O. medirastre*. Considering *O. libertate* as the most important species in the catches, studies of population genetics using highly polymorphic molecular markers such as microsatellites or SNPs should be carried out in this species.

#### Acknowledgements

We thank Maz Sardina for providing samples. We are grateful to our many colleagues and technicians for their encouragement and assistance, especially those from the Population Dynamics Laboratory at Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas and Facultad de Ciencias del Mar-Universidad Autónoma de Sinaloa for helping with laboratory work and samples. Thanks to Mariana Díaz Santana-Iturríos for her assistance with English. C.I.P.Q. is a recipient of a graduate fellowship and grants from 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 the Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas-Instituto Politécnico Nacional and Estímulos al Desempeño de los Investigadores-Instituto Politécnico Nacional and C.Q.V., F.J.G.R. and J.S.R.P. Sistema Nacional de Investigadores – Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

#### References

- Acal, D. E., 1990: Biomass and potential yield of the thread herring (*Opisthonema* spp.) off the coasts of Sinaloa and Nayarit. *Cien. Mar.* **16**, 61–73.
- Adams, D.; Rohlf, F. J.; Slice, D., 2004: Geometric morphometrics: ten years of progress following the revolution. *Ital. J. Zool.* **71**, 5–16.
- Berry, D. H.; Barrett, I., 1963: Análisis de las branquiespinas y denominación del arenque de hebra *Opisthonema*. *Bull. Inter-Amer. Atun. Trop.* **7**, 137–190.

- Bookstein, F. L., 1991: Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Cadrin, S. X., 2000: Advances in morphometric identification of fishery stock. *Rev. Fish Biol. Fish* **10**, 91–112.
- Cadrin, S. X., 2005: Morphometric Landmarks. In: Stock Identification Methods: Applications in Fishery Science. S. X. Cadrin, K. D. Friedland and J. R. Waldman (Eds.) Elsevier Academic Press, London, UK, pp. 153–172.
- Cadrin, S. X.; Friedland, K. D., 1999: The utility of image processing techniques for morphometric analysis and stock identification. *Fish. Res.* **43**, 129–139.
- Cardinale, M.; Doering-Arjes, P.; Kastowsky, M.; Mosegaard, H., 2004: Effects of sex, stock, and environment on the shape of known-age Atlantic cod (*Gadus morhua*) otoliths. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **61**, 158–167.
- Castro-González, J. J.; Lizarraga-Rodríguez, H. M.; Chapa-Morales, O., 1997: Fecundidad de la sardina crinuda *Opisthonema bulleri* (Pisces: Clupeidae) entre las costas de Sinaloa y Nayarit, Mexico (Fertility of the thread herring sardine *Opisthonema bulleri* (Pisces: Clupeidae) from the coast of Sinaloa and Nayarit, Mexico). *Rev. Biol. Trop.* **44**, 659–661.
- De La Cruz-Agüero, J.; García-Rodríguez, F. J., 2004: Morphometric stock structure of the Pacific sardine *Sardinops sagax* (Jenyn, 1842) off Baja California. Mexico. In: Morphometrics: Applications in Biology and Paleontology. A. M. Elewa, T. Heidelberg (Eds). Springer Verlag, Germany, pp. 115–124.
- De La Cruz-Agüero, J.; Vergara-Solana, G. J.; García-Rodríguez, F. J., 2015: Geometric morphometrics supports the proposed molecular taxonomy for three *Eucinostomus* species (Perciformes: Gerreidae) along the coasts of Mexico. *Zoomorphology* **134**, 125–134.
- Di Finizzio, A.; Guerriero, G.; Russo, G. L.; Ciarcia, G., 2007: Identification of gadoid species (Pisces: Gadidae) by sequencing and PCR-RFLP analysis mitochondrial 12S and 16S rRNA gene fragments. *Eur. Food Res. Technol.* **225**, 337–344.
- Felsenstein, J., 1989: PHYLIP – Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* **5**, 163–166.
- Gagliano, M.; McCormick, M. I., 2004: Feeding history influences otolith shape in tropical fish. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **278**, 291–296.
- García-Rodríguez, F. J.; García-Gasca, S. A.; De La Cruz-Agüero, J.; Cota-Gómez, V. M., 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.
- Grant, W. S.; Utter, F. M., 1984: Biochemical population genetics of Pacific Herring (*Clupea pallasii*). *Can. J. Fish Aquat. Sci.* **41**, 851–864.
- Hebert, P. D. N.; Cywinska, A.; Ball, S. L.; de Waard, J. R., 2003: Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B* **270**, 313–321.
- Hedgecock, D.; Nelson, K.; López-Lemus, L. G., 1988: Biochemical genetic and morphological divergence among three species of thread. *Cal. Coop. Ocean. Fish.* **29**, 110–128.
- Ibáñez-Aguirre, A. L.; Cabral-Solís, E.; Gallardo-Cabello, M.; Espino-Barr, M. E., 2006: Comparative morphometrics of two populations of *Mugil curema* (Pisces: Mugilidae) off the Atlantic and Mexican Pacific coasts. *Sci. Mar.* **70**, 139–145.
- Imaizumi, K.; Akutsu, T.; Miyasaka, S.; Yoshino, M., 2007: Development of species identification tests targeting the 16S ribosomal RNA coding region in mitochondrial DNA. *Int. J. Legal Med.* **121**, 184–191.
- Jacob-Cervantes, M., 2010: Small pelagic fish fishery in the south of Gulf of California. Season 2008 analysis. *Cien. Pesq.* **18**, 47–58.
- Kimura, M., 1980: A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**, 111–120.
- Komers, P. E., 1997: Behavioural plasticity in variable environments. *Can. J. Zool.* **75**, 161–169.
- Lakra, W. S.; Goswami, M.; Gopalakrishnan, A., 2009: Molecular identification and phylogenetic relationships of seven Indian Sciaenids (Pisces: Perciformes, Scianidae) based on 16S rRNA and cytochrome c oxidase subunit I mitochondrial genes. *Mol. Biol. Rep.* **36**, 831–839.
- Lombarte, A.; Leonart, J., 1993: Otolith size changes related with body growth, habitat depth and temperature. *Environ. Biol. Fishes* **37**, 297–306.
- López-Lemus, L. G., 1986: Genetic relationships of the different morphotypes of the clupeid *Opisthonema* spp. in the west coast of California and Gulf of California. *Cal. Coop. Ocean. Fish. Abstracts, Annual Conference*.
- Martínez-Guevara, A.; García-Rodríguez, F. J.; De La Cruz-Agüero, J., 2014: DNA Sequence Data analysis supports the taxonomic status of *Eucinostomus dowii* within the genus (Perciformes: Gerreidae). *J. Ichthyol.* **54**, 872–881.
- Mérigot, B.; Letourneur, Y.; Lecomte-Finiger, R., 2007: Characterization of local populations of the common sole *Solea solea* (Pisces, Soleidae) in the NW Mediterranean through otolith morphometrics and shape analysis. *Mar. Biol.* **151**, 997–1008.
- Nevárez-Martínez, M. O.; Martínez-Zavala, M. A.; Coterro-Altamirano, C. E.; Jacob-Cervantes, M. L.; Green-Ruiz, Y.; Gluyas-Millán, G.; Cota-Villavicencio, A.; Santos-Molina, J. P., 2006: La pesquería de pelágicos menores. In: Sustentabilidad y pesca responsable en México: evaluación y manejo (The small pelagic fishery). In: Sustainability and responsible fishing in Mexico: evaluation and management). F. Arreguín-Sánchez, L. Beléndez-Moreno, I. Méndez Gómez-Humaran, R. Solana-Sansores, C. Rangel-Dávalos (Eds). INP, SAGARPA, Mexico City, pp. 263–295.
- Patarnello, T.; Bargelloni, L.; Caldara, F.; Colombo, L., 1994: Cytochrome b and 16SrRNA sequence variation in the *Salmotrutta* (Salmonidae: Teleostei) species complex. *Mol. Phylogenet. Evol.* **3**, 69–74.
- Ramírez-Pérez, J. S., 2010: Estructura poblacional de la sierra del Pacífico *Scomberomorus sierra* Jordan y Starks, 1895 (Perciformes: Scombridae) en el Pacífico mexicano (Population structure of Pacific sierra *Scomberomorus sierra* Jordan and Starks, 1895 (Perciformes: Scombridae) in the Mexican Pacific). Tesis Doctoral, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-Instituto Politécnico Nacional, México. Available at: <http://www.biblioteca.cicimar.ipn.mx/oasis/> (accessed on August 2014).
- Ramírez-Pérez, J. S.; Quiñónez-Velázquez, C.; García-Rodríguez, F. J.; Félix-Uraga, R.; Melo-Barrera, F. N., 2010: Using the shape of sagitta otoliths in the discrimination of phenotypic stocks in *Scomberomorus sierra* (Jordan and Starks, 1895). *J. Fish. Aquatic. Sci.* **5**, 82–93.
- Rodríguez-Domínguez, G., 1987: Caracterización bioecológica de las tres especies de sardina crinuda (*Opisthonema libertate*, *O. bulleri* y *O. medirastre*) del Pacífico mexicano (Bio-ecological characterization of the three species of thread herring (*Opisthonema libertate*, *O. medirastre* and *O. bulleri*) Mexican Pacific). Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México. Available at: <http://biblioteca.cicese.mx/> (accessed on August 2014).
- Rodríguez-Sánchez, R., 1985: Aspectos de dinámica poblacional en apoyo de la separación de las especies del género *Opisthonema* por el método de índice de densidad de branquiespinas (Aspects of population dynamics in support of the separation of the genus *Opisthonema* by the method of density index gill rakers.). *Cal. Coop. Ocean. Fish. Abstracts, Annual Conference*.
- Rohlf, F. J., 2004: TpsDIG Version 1.40. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, New York.
- Rohlf, F. J.; Marcus, L. F., 1993: A revolution in morphometrics. *T. R. E. E.* **8**, 129–132.
- Ruiz, L.; Lyle, F., 1992: Fluctuaciones periódicas de la captura de sardina crinuda (*Opisthonema* spp.) en el Golfo de California, 1972–1990 (Periodic fluctuations capture thread herring (*Opisthonema* spp.) in the Gulf of California, 1972–1990). *Cal. Coop. Ocean. Fish. Rep.* **33**, 124–129.

- SAGARPA-CONAPESCA, 2013: Anuario estadístico de acuacultura y pesca 2013 (Statistical Yearbook of Aquaculture and Fisheries 2013) Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Comisión Nacional de Pesca. Mazatlán. También disponible en la página web Available at: [http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona\\_anuario\\_estadistico\\_de\\_pesca](http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona_anuario_estadistico_de_pesca). (accessed on September 2014).
- Schlichting, C. D.; Pigliucci, M., 1998: Phenotypic Evolution: A Reaction Norm Perspective. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, USA. 340 pp.
- Sheets, H. D., 2004: IMP: Integrated Morphometrics Package. Canisius College, New York. Available at: <http://www3.canisius.edu/~sheets/morph%20soft.html>. (accessed on September 2014).
- Stevenson, D. K.; Carranza, F., 1981: Maximum yield estimates for the pacific thread herring, *Opisthonema* spp., fishery in Costa Rica. *Fish. Bull.* **79**, 689–703.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, N.; Kumar, S., 2011: MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**, 2731–2739.
- Torres-Ramírez, M. N., 2004: Nueva clave de identificación para la 'sardina crinuda' del genero *Opisthonema* (Gill, 1861) en el pacifico mexicano (New identification key for the 'thread herring' of the genus *Opisthonema* (Gill, 1861) in the Mexican Pacific). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Sinaloa, Facultad de ciencias del mar, México. Available at: <http://facimar.maz.uasnet.mx/index.php/bibliot-boton> (accessed August 2014).
- Tuset, V. M.; Lombarte, A.; González, J. A.; Pertusa, J. F.; Lorente Ma, J., 2003: Comparative morphology of the sagittal otolith in *Serranus* spp. *J. Fish Biol.* **63**, 1491–1504.
- Vega-Corrales, L. A., 2010: Evaluación poblacional del stock explotable del complejo *Opisthonema* (Pisces: Cupleidae) en el Golfo de Nicoya, Costa Rica (Population assessment of exploitable stock *Opisthonema* complex (Pisces: Clupeidae) in the Gulf of Nicoya, Costa Rica). *Rev. Mar. Cost.* **2**, 83–94.
- Vergara-Solana, F. J., 2012: Sistemática del género *Diapterus* Ranzani, 1842 (*Perciformes: Gerreidae*): análisis morfométricos y moleculares (Systematic of the genus *Diapterus* Ranzani, 1842 (*Perciformes: Gerreidae*): morphometric and molecular analyzes). Tesis de Maestría. Centro de Ciencias Interdisciplinario de Ciencias Marinas-Instituto Politécnico Nacional, México. Available at: <http://www.biblioteca.cicimar.ipn.mx/oasis/> (accessed August 2014).
- Vergara-Solana, F. J.; García-Rodríguez, F. J.; De La Cruz-Agüero, J., 2013: Comparing body and otolith shape for stock discrimination of Pacific sardine, *Sardinops sagax* Jenyns, 1842. *J. Appl. Ichthyol.* **29**, 1241–1246.
- Vignon, M.; Morat, F., 2010: Environmental and genetic determinant of otolith shape revealed by a non-indigenous tropical fish. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **411**, 231–241.
- Vilizzi, L.; Kováč, V., 2014: Alternative ontogenies and developmental plasticity: implications for ecological and evolutionary studies on species complexes. *Fish Fish.* **15**, 523–531.
- Ward, R. D.; Zemplak, T. S.; Innes, B. H.; Last, P. R.; Hebert, P. D. N., 2005: DNA barcoding Australia's fish species. *Phil. Trans. R. Soc. B.* **360**, 1847–1857.
- Zelditch, M. L.; Swiderski, D. L.; Sheets, H. D.; Fink, W. L., 2004: Geometric Morphometrics for Biologists: A Primer. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Author's address:** Francisco J. García-Rodríguez, Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Avenida IPN S/N, Colonia Playa Palo de Santa Rita, La Paz, Baja California Sur 23060, Mexico.  
E-mail: [fjgarciar@ipn.mx](mailto:fjgarciar@ipn.mx); [fj\\_gr@yahoo.com](mailto:fj_gr@yahoo.com)



*Research Article*

## Detecting *Opisthonema libertate* (Günther, 1867) phenotypic stocks in northwestern coast of Mexico using geometric morphometrics based on body and otolith shape

<sup>1</sup>Carlos I. Pérez-Quiñonez, <sup>1</sup>Casimiro Quiñonez-Velázquez & <sup>1</sup>Francisco J. García-Rodríguez

<sup>1</sup>Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas

Departamento de Pesquerías y Biología Marina, La Paz, Baja California Sur, México

Corresponding author: Casimiro Quiñonez-Velázquez (cquinone@ipn.mx)

**ABSTRACT.** Stock discrimination is essential for biomass population assessment and essential for the fisheries management. The analysis of shape differences in anatomical structures (*e.g.*, body shape, otoliths, scales) has been relevant issue in the study of population structure. We evaluated the hypothesis on the existence of a stock-structured population of Pacific thread herring *Opisthonema libertate* in the northwestern coast of Mexico. Geometric morphometric methods were used to analyze body and otolith shape. Samples come from at three commercial fishery-landing sites: Magdalena Bay, Guaymas, and Mazatlan, Mexico. Results based on body and otolith shape support the existence of different morphotypes by location. Body shape allowed better discrimination than otolith shape. The differences observed between the phenotypic stocks suggest seasonal movements, which are linked to the marine current system in this region, particularly to the California Current and the North Equatorial Counter Current.

**Keywords:** *Opisthonema libertate*, stock, morphotypes, anatomical structure, shape, fisheries management.

### INTRODUCTION

Related to the management of marine resources, the differentiation of stocks in an exploited population is critical in fishery biology (Begg & Waldman, 1999; Cadrin *et al.*, 2005). According to Ihssen *et al.* (1981) stock is an intraspecific group of individuals that mate randomly and maintain spatial and temporal integrity. An approach for stock identification has been centered on the detection of groups based on the quantification of morphometric differences (Cadrin, 2000; Waldman, 2005). This approach is founded on the assumption that individuals with high similarity (similar morphotypes) must be closely related biologically and ecologically (Cadrin *et al.*, 2005). The origins of individuals and the environmental variables associated with their distribution provide a source of additional information to justify the natural integrity of stocks.

Stock identification, mainly of commercial fishes, has usually been addressed on the analysis of body shape (Silva, 2003; De La Cruz-Agüero & García-Rodríguez, 2004; Tzeng, 2004; Ibáñez-Aguirre *et al.*,

2006; García-Rodríguez *et al.*, 2011; Vergara-Solana *et al.*, 2013) and of *sagitta* otolith shape (Campana & Casselman, 1993; DeVries *et al.*, 2002; Félix-Uraga *et al.*, 2005; Stransky *et al.*, 2008; Ramírez-Pérez *et al.*, 2010), or on the analysis of the shape of both structures (Vergara-Solana *et al.*, 2013). Results obtained based on body morphology could be different from those obtained based on otolith shape (Félix-Uraga *et al.*, 2005; García-Rodríguez *et al.*, 2011; Vergara-Solana *et al.*, 2013), as the morphometric variability between the two structures could vary (Vergara-Solana *et al.*, 2013) due to environmental and/or genetic causes. For this reason, the use of both structures could provide a better understanding of population dynamics. Comparative analyses are therefore relevant and more informative (Waldman, 1999).

To date, the study of small pelagic fishes based on morphometric analyses in northwestern Mexico has been carried out mainly on the Pacific sardine *Sardinops sagax* (De La Cruz-Agüero & García-Rodríguez, 2004; Félix-Uraga *et al.*, 2005; García-Rodríguez *et al.*, 2011; Vergara-Solana *et al.*, 2013).

These studies support the existence of different phenotypic stocks, which have been associated with water masses with different sea surface temperature (SST) (Félix-Uraga *et al.*, 2005; García Rodríguez *et al.*, 2011; Vergara-Solana *et al.*, 2013). On the other hand, there are two main marine current systems in northwestern Mexico: the California Current (CC) and the North Equatorial Counter Current (NECC). The CC intensifies in winter-spring, and the NECC is most influential in summer-fall (Pavlova, 1966; Hickey, 1979; Talley, 1993; Parés-Sierra *et al.*, 1997; Pérez-Brunius *et al.*, 2007; García-Morales *et al.*, 2012). It has been observed that the intensification or weakening of these current systems modifies the latitudinal distribution of marine fauna (Bograd & Lynn, 2003; Félix-Uraga *et al.*, 2004; Lluch-Belda *et al.*, 2005; Gaxiola-Castro *et al.*, 2008; Durazo, 2009). In particular, the existence of a well-defined anticyclonic circulation occurring from February to July and cyclonic circulation occurring from August to January has been proposed for the Gulf of California (Marinone *et al.*, 2011; Marinone, 2012). The western coast of Baja California is influenced by the CC in winter-spring, whereas in summer-fall it is influenced by the NECC. Under this scenario, it is reasonable to hypothesize some influence of oceanographic circulations patterns in the population structure of fishes. This could be true of the Pacific thread herring *Opisthonema libertate* (Günther, 1867), a species widely distributed from northern Peru to the western coast of the Baja California Peninsula and the Gulf of California, Mexico.

The Pacific thread herring is one of the most abundant species of small pelagic fishes in the northwestern Mexican Pacific and is an essential component in the diet of a wide variety of high trophic level species (Holt, 1975; Rodríguez-Domínguez, 1987; Pérez-Quñonez *et al.*, 2017). The Pacific thread herring, along with slender thread herring *Opisthonema bulleri* (Regan, 1904) and middling thread herring *Opisthonema medirastre* (Berry & Barrett, 1963), constitute important economic resources in Mexico due to their significant catch rates (1,333,786 ton total catch during 2006-2014), and currently represents one of the most stable fisheries in Mexico (Acal, 1990; Nevárez-Martínez *et al.*, 2006; Jacob-Cervantes, 2010; SAGARPA-CONAPESCA, 2013). The fishery is only regulated by a 160 mm SL minimum catch size. Despite its importance as a fishery resource, the information necessary to evaluate the population status of this species within the *Opisthonema* genus in northwestern Mexico is limited. Even its taxonomic situation is controversial until recently (Csirke, 1980; Stevenson & Carranza, 1981; Lagúnez-Moreno, 1989; Vega-

Corrales, 2010; Vallarta-Zárate, 2012). However, the taxonomic validity of the three entities (*O. libertate*, *O. bulleri* and *O. medirastre*) was recently supported by morphometric and genetic data (Pérez-Quñonez *et al.*, 2017).

Consequently, the official records do not discriminate by species in the catch records, studies by Ruiz & Lyle (1992) and Jacob-Cervantes *et al.* (2007) indicate that of the three species, *O. libertate* comprises the highest catch volumes. Consequently, it is crucial to provide biological information on this species to obtain a better understanding of its population dynamics.

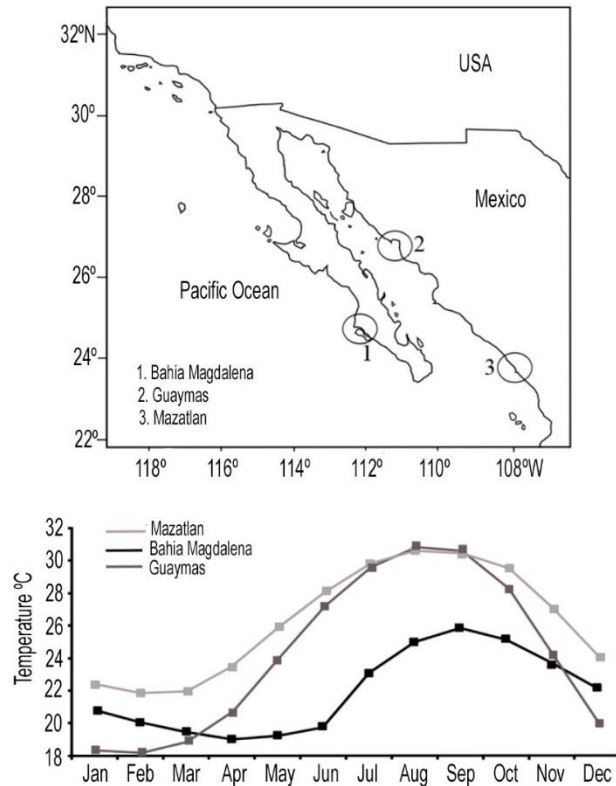
In the present study, we carried out a morphometric comparison (body and otoliths) of the Pacific thread herring *O. libertate* to detect the existence of morphotypes or phenotypic stocks in the northwestern coast of Mexico. Taking into account the movement pattern dynamics of other sardine species and the oceanographic characteristics of the region, we evaluated the hypothesis on the existence of a population structured in stocks (different morphotypes) of Pacific thread herring in northwestern Mexico.

## MATERIALS AND METHODS

### Sampling

Two hundred and four Pacific thread herring specimens were obtained from the commercial catch. The herring comes from winter (January-February) and summer (July, August and September) landings in the ports of Bahía Magdalena (BM), Guaymas (GYM), and Mazatlan (MZ), the fish caught during these months were selected for the analysis, because at this time the smallest (winter) and largest (summer) differences in SST among the three fishing zones are recorded. These SST conditions, a consequence of the influence of the two current systems in the region (CC and CCNE), would promote the expansion and concentration of the distribution of the herring population in the northwest of the Mexican Pacific. (Fig. 1). The sample size was 94 individuals (BM, n = 33; GYM, n = 31; MAZ, n = 30) in winter, and 110 individuals (BM, n = 39; GYM, n = 37; MAZ, n = 34) in summer. All individuals were sampled in 2014, except the Mazatlán winter sample, which was collected in 2013.

Specimens were frozen and transferred to the Population Dynamics Laboratory of CICIMAR-IPN (<http://www.cicimar.ipn.mx>) in La Paz, B.C.S., Mexico, where they were processed, and their taxonomic status was confirmed based on the works by Berry & Barret (1963), Torres-Ramírez (2004), and Pérez-Quñonez *et al.* (2017). The size of individuals was recorded taking into account standard length. All the individuals analy-



**Figure 1.** Northwestern coast of Mexico showing the geographic location of the landing ports of the purse-seine fleet fishing small pelagic fish, and SST monthly variation by zone.

zed were adults ( $\geq 120$  mm SL), according to the relationship between length and sexual condition (Berry & Barrett, 1963; Jacob-Cervantes & Aguirre-Villaseñor, 2014; Pérez-Quiñonez *et al.*, 2017), the range of size varies between 140 to 210 mm LE.

### Image acquisition and location of landmarks

The left side of each's body was photographed next to a size-scale using a Cannon Power Shot Sx5001S digital camera mounted on a fixed base. The *sagitta* otoliths were later extracted using dissecting forceps and washed with water and phosphate-free soap. The sulcus face of the right otolith of each was photographed using a Sony Hyper HAD CCD-IRIS/RGB Model DXC-151a digital camera connected to a stereoscopic microscope using reflected light (Olympus SZX-ILLK100). All otolith images were recorded along with a size-scale using 16.5x magnification.

Morphometric comparisons were based on configurations generated from digitizing homologous anatomical landmarks. As landmarks were insufficient to represent the body and otolith shapes, we generated templates of the digital images to provide guidelines of equal angular spacing to identify points (semiland-

marks) along the structure's curves using the MakeFam program (Sheets, 2004). For the body shape first, a template was constructed based on the landmarks at the tip of snout, and at the origin of the pectoral and dorsal fin. A second template was based on landmarks located at the end of the dorsal fin, and the origin of the anal fin and at the origin of the upper part of the caudal fin. Moreover, a third template was based on landmarks located at the origin of the dorsal and anal fin, and at the origin of the lower part of the caudal fin. Semilandmarks were digitized at the intersection of the curve and the lines of the fans. For the otolith shape first were located three natural marks; the antirostrum tip, the focus and the right posterior border of the otolith then two templates was constructed based on these marks; one for the otoliths ventral part and another for the dorsal part.

A total of 13 body landmarks and semi-landmarks, and 20 otolith landmarks and semi-landmarks were used in our analysis (Fig. 2). All marks were digitized using the program TpsDig 1.4 (Rohlf, 2004).

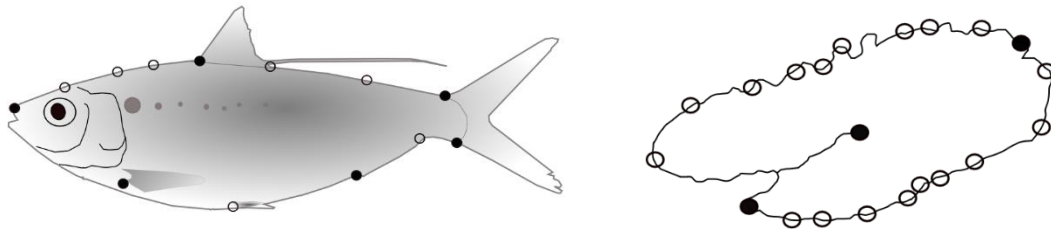
### Data analysis

We carried out morphometric comparisons, separating the winter and summer data because migratory movements can confound the origin of stocks, as has been suggested for other pelagic fish (Félix-Uraga *et al.*, 2005; García-Rodríguez *et al.*, 2011).

Geometric configurations were translated, scaled and rotated for each season using the generalized least squares Procrustes superimposition (Gower, 1975) in the Coordgen 6 program (Sheets, 2004). The Partial Procrustes Distance (PPD) was calculated between the mean shapes of the two groups to perform paired comparisons. The significance of the test was based on bootstrapping to determine whether the observed F-value could have been produced by chance, taking into account the distribution of bootstrapped F-values. We carried out this analysis using the TwoGroup6 software (Sheets, 2004).

For each structure separately, partial warp scores were obtained from the Thin-Plate Spline interpolation function (Bookstein, 1989), and used for quantifying differences between groups by means of a canonical variate analysis (CVA), which is a method of finding the set of axes (or linear combination of variables) that allows for the greatest possible ability to discriminate between two or more groups. The significance of the CVA scores was based on Wilk's lambda ( $\lambda$ ) values, using Bartlett's test, a statistic that has an approximately chi-squared distribution. The CVA scores were used to obtain an *a posteriori* assignment of individuals based on Mahalanobis distances between





**Figure 2.** Location of 13 marks used to represent the thread herring (*Opisthonema libertate*) body shape; 20 marks were used for otoliths. Black dots: landmarks, white dots: semi-landmarks.

the means of the *a priori* groups. Bias classification was determined using the Jackknife method with 1000 bootstrap iterations; this provides a sense of how effective the discrimination and assignment can be expected to be, given a specific data set. Previous analyses were performed in the CvaGen60 program (Sheets, 2004). Mahalanobis distances were estimated using Statistica v.8 (www. Statsoft.com) and used to construct an unrooted tree based on Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) using the Neighbor module in Phylip Ver 3.6 module (Felsenstein, 2005).

## RESULTS

### Morphometric differences based on body shape

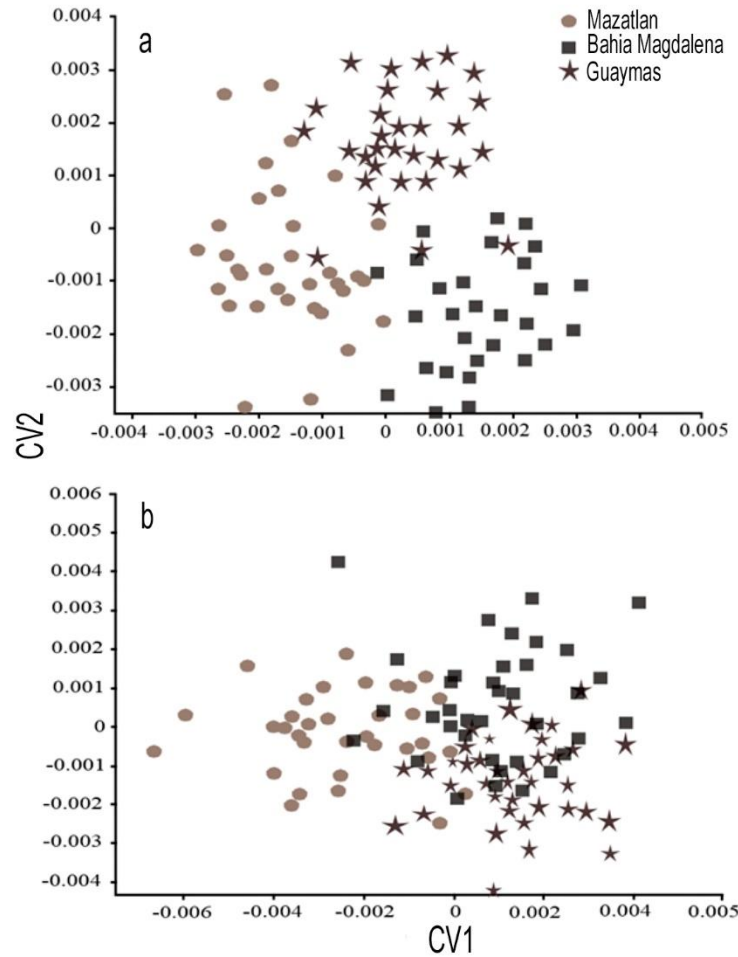
The analysis based on the F-test indicated significant differences between each paired Partial Procrustes Distance (PPD) in winter ( $F = 5.23$ ,  $P = 0.002$ ,  $PPD = 0.0218$ , for BM-GYM;  $F = 3.77$ ,  $P = 0.011$ ,  $PPD = 0.0202$ , for GYM-MAZ;  $F = 7.42$ ,  $P = 0.001$ ,  $PPD = 0.0238$ , for BM-MAZ). The two canonical variables indicated statistically significant differences between the groups (Wilk's lambda = 0.15,  $P < 0.001$  for CV1; Wilk's lambda = 0.50,  $P < 0.001$  for CV2), giving support to the existence of different Pacific thread herring morphotypes in winter (Fig. 3). The percentage of correct assignment (PeCoAs) was 72.3% on average. The highest value was obtained for MAZ (76.6%), and the lowest was obtained for GYM (67.7%) (Table 1). The lowest average assignment error occurred between fish from BM-MAZ and the highest between fish from GYM-MAZ and GYM-BM (Table 1).

The two canonical variables indicated statistically significant differences between the groups (Wilk's lambda = 0.23,  $P < 0.001$  for CV1; Wilk's lambda = 0.52,  $P < 0.001$  for CV2), suggesting the existence of different Pacific thread herring morphotypes in summer (Fig. 3). Figure 4 shows the morphological affinity between the three groups based on Mahalanobis distances and indicates that fish from GYM-MAZ had the lowest morphological differences, whereas fish from BM-MAZ showed the highest differences.

During summer the analysis indicated significant differences between each paired PPD ( $F = 3.73$ ,  $P = 0.014$ ,  $PPD = 0.0200$ , for BM-GYM;  $F = 2.91$ ,  $P = 0.024$ ,  $PPD = 0.0196$ , for GYM-MAZ;  $F = 6.96$ ,  $P = 0.001$ ,  $PPD = 0.0223$ , for BM-MAZ). The PeCoAs was 62.7% on average. The highest value was obtained for MAZ (67.4%), and the lowest for GYM (54.0%). Similarly to what occurred in winter, there was a lower average assignment error between fish from BM-MAZ and higher error between fish from GYM-MAZ and GYM-BM (Table 1). Taking into account Mahalanobis distances, individuals captured during summer in GYM showed a stronger morpho-logical relationship with fish from BM. The highest differences between fish occurred in BM and MAZ during both seasons (Fig. 4). According to the Mantel test, there was no correlation between the matrix based on body shape in winter and summer ( $P = 0.677$ ).

### Morphometric differences based on sagitta otolith shape

Results obtained using otoliths were relatively similar to those found based on body shape. The analysis based on the F-test indicated significant differences between paired PPD in winter between fish from BM-GYM ( $F = 7.52$ ,  $P = 0.001$ ,  $PPD = 0.0640$ ) and BM-MAZ ( $F = 12.48$ ,  $P = 0.001$ ,  $PPD = 0.721$ ), but not between fish from GYM-MAZ ( $F = 1.98$ ,  $P = 0.062$ ,  $PPD = 0.0188$ ). However, based on the significant differences found using body shape, we considered these groups different; consequently, we performed a CVA for otoliths considering the three groups to maximize possible morphometric differences. The two canonical variables indicated statistically significant differences between the groups (Wilk's lambda = 0.12,  $P < 0.001$  for CV1; Wilk's lambda = 0.43,  $P < 0.001$  for CV2), supporting the existence of different morphotypes, according to otolith characteristics in winter (Fig. 5). The PeCoAs was 67.3% on average, lower than that found based on body shape. The highest value was obtained for fish from MAZ (78.3%), and the lowest for fish from GYM (57.1%) (Table 2).



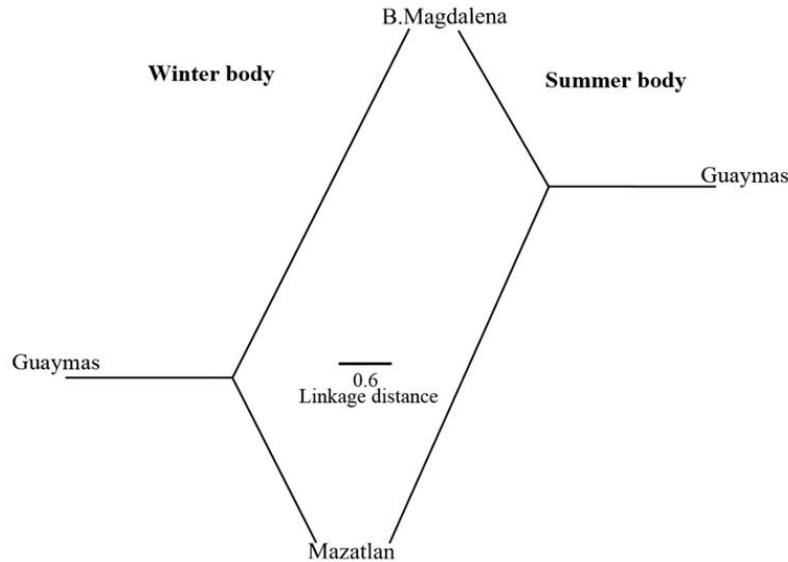
**Figure 3.** Scatter diagram generated from CV1 and CV2 scores for body shape in a) winter and b) summer.

**Table 1.** Allocation matrix (%) generated from the CVA for body shape. Upper matrix values correspond to winter body shape analysis (PeCoAs = 72.3%); bottom matrix values correspond to summer body shape analysis (PeCoAs = 62.7%). Values in bold on diagonal of each matrix show correct classification percentages per zone. Sample size: number of individuals analyzed per data set.

Zone	Mazatlán (MAZ)	Bahía Magdalena (BM)	Guaymas (GYM)	Sample size
Mazatlán (winter)	<b>76.6</b> (n = 23)	6.66 (n = 2)	16.6 (n = 5)	94
Bahía Magdalena (winter)	9.09 (n = 3)	<b>72.7</b> (n = 24)	18.1 (n = 6)	
Guaymas (winter)	16.1 (n = 5)	16.1 (n = 5)	<b>67.7</b> (n = 21)	
Mazatlán (summer)	<b>67.4</b> (n = 23)	14.7 (n = 5)	17.6 (n = 6)	110
Bahía Magdalena (summer)	12.8 (n = 5)	<b>66.6</b> (n = 26)	20.5 (n = 8)	
Guaymas (summer)	18.9 (n = 7)	27 (n = 10)	<b>54</b> (n = 20)	

The lowest average assignment error occurred between the BM-MAZ fish and the highest between the GYM-MAZ and GYM-BM fish (Table 2). Based on Mahalanobis distances, fish from GYM and MAZ had the lowest morphological differences, and fish from BM and MAZ showed the highest differences (Fig. 6).

For data corresponding to summer, the analysis based on the F-test indicated significant differences between each paired PPD ( $F = 6.29, P = 0.001, PPD = 0.0601$ , for BM-GYM;  $F = 25.86, P = 0.001, PPD = 0.1212$ , for GYM-MAZ;  $F = 12.10, P = 0.001, PPD = 0.0853$ , for BM-MAZ). There were statistically signi-



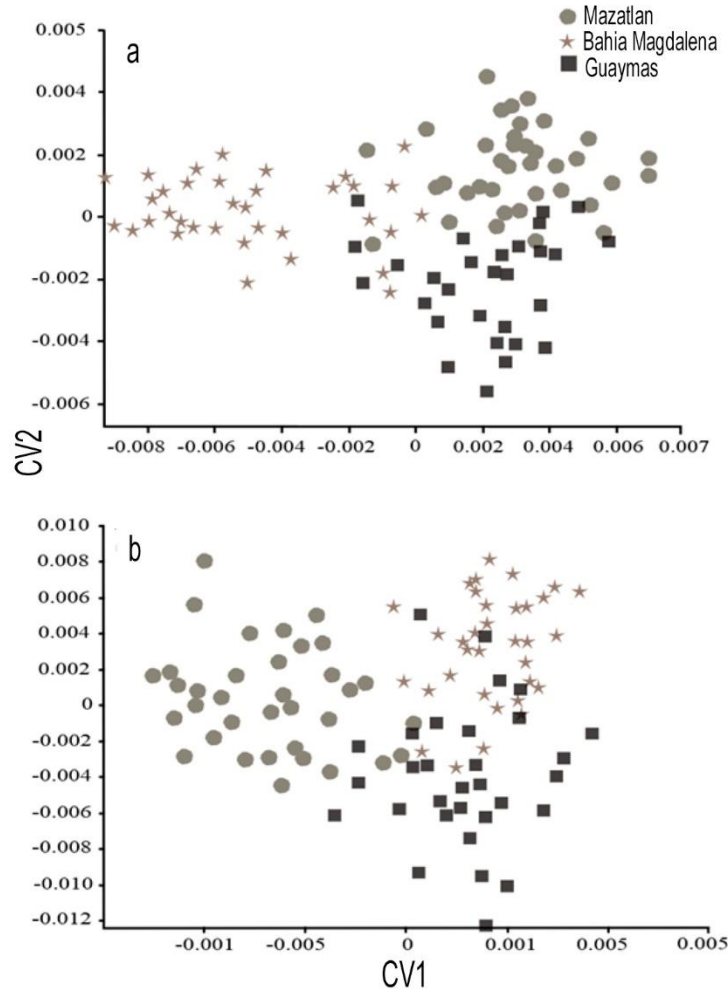
**Figure 4.** Dendrogram generated for each season with the UPGMA algorithm, using the Mahalanobis distance matrix of the body shape.

ficant differences between the groups only for the first canonical variable (Wilk's lambda = 0.14,  $P <$  using geometric morphometry, supporting the existence of three different morphotypes or phenotypic stocks in the northwest Mexican Pacific. Body shape had a higher discriminant power than otolith shape. In all cases, for analyses based on body shape the Partial Procrustes Distance, and the two Canonical Variables were significant, whereas for analyses based on otolith shape differences between Pacific thread herring landed in GYM and MAZ were non-significant (although marginal  $P = 0.06$ ) in winter. Only one Canonical Variable was statistically significant in summer. The results obtained from the *a posteriori* assignment matrix (based on Mahalanobis distances) also concur with the previous observations (Vergara-Solana *et al.*, 2013). An explanation of these differences could be related to the amount of cover provided to each structure by the landmarks and semi-landmarks because the morpho-space can be affected by an increase in the number of marks, and the differentiation among groups can be more precise (Farré *et al.*, 2016). However, since a higher number of marks were used for otolith analysis, we consider that otolith shape was not over-represented compared with body shape. In all cases, we considered a number of specimens bigger than the number of landmarks, considering that extra landmarks could be redundant. Thus, we believe that our results are not indicative of more than a methodological effect and that otoliths are less variable

structures than body shape, as has been observed in other species (Vergara-Solana *et al.*, 2013).

Despite the lower resolution in the detection of differences between groups when using otoliths, both structures used provided congruent results, indicating that body shape and otolith shape of Pacific thread herring *O. libertate* allow the detection of different morphotypes in the sampled areas of northwestern Mexico. Both indicated that the Guaymas Pacific thread herring shared the highest morphological affinity with Pacific thread herring from Bahía Magdalena and Mazatlán and that Pacific thread herring from Bahía Magdalena and Mazatlán presented the highest differences.

Variations in the shape of anatomical structures are associated with the age of individuals in species with individual growth tending towards allometry (Gould, 1966; Alberch *et al.*, 1979; Klingenberg, 1998). In the present study all analyzed individuals were adults ( $\geq 120$  mm SL) (Berry & Barret, 1963; Jacob-Cervantes & Aguirre-Villaseñor, 2014; Pérez-Quñonez *et al.*, 2017), so that differences found were not related to the allometric effect (Félix-Uraga *et al.*, 2005; Ramírez-Pérez *et al.*, 2010). In addition, one of the characteristics of the use of geometric morphometry is that it eliminates differences between configurations that are attributable to differences in location, scale, and orientation, leaving only differences in shape (Kendall, 1977; Zelditch *et al.*, 2004). Other factors related to genetic differences due to the presence of different popu-



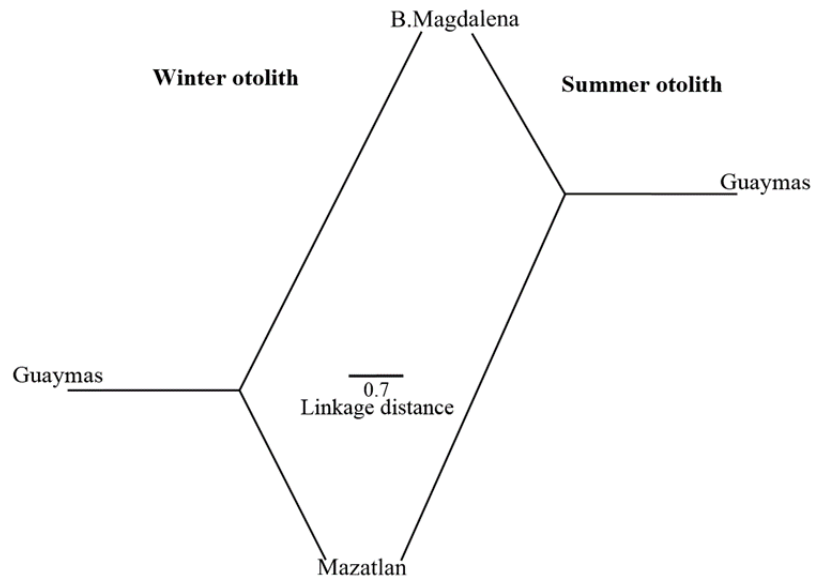
**Figure 5.** Scatter diagram generated from CV1 and CV2 scores for otolith in a) winter and b) summer.

**Table 2.** Allocation matrix (%) generated from the CVA for the otolith shape. Upper matrix values correspond to winter otolith shape analysis (PeCoAs = 67.6%); bottom matrix values correspond to summer otolith shape analysis (PeCoAs = 56.8%). Values in bold on diagonal of each matrix show correct classification percentages per zone. Sample size: number of individuals analyzed per data set.

Zone	Mazatlán (MAZ)	Bahía Magdalena (BM)	Guaymas (GYM)	Sample size
Mazatlán (winter)	<b>78.3</b> (n = 29)	5.40 (n = 2)	16.2 (n = 6)	102
Bahía Magdalena (winter)	22.8 (n = 8)	<b>57.1</b> (n = 20)	20 (n = 7)	
Guaymas (winter)	20 (n = 6)	13.3 (n = 4)	<b>66.6</b> (n = 20)	
Mazatlán (summer)	<b>77.1</b> (n = 27)	8.5 (n = 3)	14.2 (n = 5)	102
Bahía Magdalena (summer)	11.1 (n = 4)	41.6 (n = 15)	<b>47.2</b> (n = 17)	
Guaymas (summer)	9.67 (n = 13)	38.7 (n = 12)	<b>51.6</b> (n = 16)	

lations, or due to local environmental factors impinging on phenotypic plasticity should be considered to explain the differences found between the morphotypes (Lin & Dunson, 1999).

Potential stock movements could be linked to latitudinal and longitudinal migration patterns having to do with feeding and spawning (Sokolov, 1974; Lluch-Belda *et al.*, 1986). Based on this, we suggest a



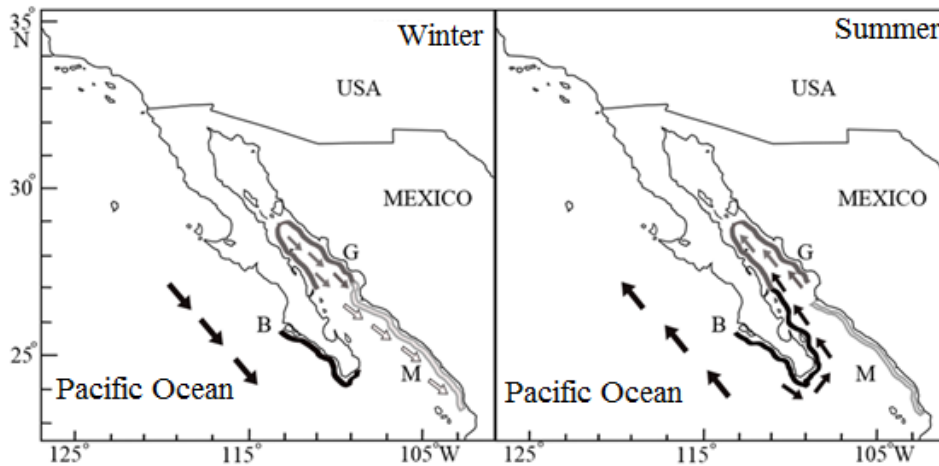
**Figure 6.** Dendrograms generated for each season with the UPGMA algorithm, using the Mahalanobis distance matrix of the otolith shape.

conceptual model of spatial displacement of Pacific thread herring explain the morphometric similarities and dissimilarities of the shape of fish structures from the three fishing zone. Seasonal changes in the wind pattern play a dominant role in the formation of fish groups (Sokolov, 1974). Winds blow from north to south in winter, and the California Current (CC) is stronger in spring in the study area. During this period the influence of the North Equatorial Counter Current (NECC) over the coast of the Baja California Peninsula decreases (Pavlova, 1966; Hickey, 1979; Talley, 1993; Parés-Sierra *et al.*, 1997; Pérez-Brunius *et al.*, 2007) favors the upwelling of sub-superficial cold and nutrient-rich waters, resulting in the formation of areas with high biological productivity off the western coast of the Baja California Peninsula and eastern coast of the Gulf of California. Consequently, favorable conditions are created for feeding by pelagic species such as herring, sardines, and anchovies (Sokolov, 1974). These physical and biological conditions could allow the migration of individuals from Guaymas towards areas to the south along the eastern gulf coast, allowing the mixing of fish from GYM and MAZ. At the same time, the BM individuals initiate their displacement towards the south along the western peninsula coast, limiting their displacement towards the mouth of the Gulf of California (Fig. 7).

There is a weakening of the CC, and strengthening of southerly winds and of the NECC flow in summer (Fig. 7) (Pavlova, 1966; Hickey, 1979; Talley, 1993; Parés-Sierra *et al.*, 1997; Pérez-Brunius *et al.*, 2007).

Coastal areas with high biological productivity appear on the western part of the Gulf of California, creating favorable conditions for BM Pacific thread herring, which had started their displacement towards the south to continue along the west coast until they reach the middle part of the gulf. The individuals that were concentrated in the MAZ area move towards the north along the coast until they reach the middle part of the gulf, and the Pacific thread herring has its maximum reproduction (Saldierna-Martínez *et al.*, 1995). These authors point out that the highest spawning rates of this species occur in summer, with maximum spawning in the central part of the gulf, in the area between GYM and Punta Lobos, and could explain the high morphological similarity between fish from BM and GYM in summer. A similar migration mechanism has been observed in the Pacific sardine *Sardinops sagax* (Sokolov, 1974; Félix-Uraga *et al.*, 2004, 2005) and in the jumbo squid *Dosidicus gigas* in the Gulf of California (Ehrhardt *et al.*, 1983), with movements along both gulf coasts and along the western coast of the peninsula, depending on conditions in the marine environment.

The results found in this study using body shape and otolith shape could have considerable potential effects on the detection of phenotypic groups. The use of otoliths has been favored in previous studies, mainly due to its dual use for age determination as well as comparison with other structures (Blood, 2003; Edwards *et al.*, 2005; Polat *et al.*, 2005; Vergara-Solana *et al.*, 2013). However, body shape has been shown to be useful for species discrimination (De La Cruz- Agüero



**Figure 7.** Time-space distribution model of the three-stock hypothesis for sardina crinuda (*O. libertate*): B: Bahía Magdalena stock, G: Guaymas stock and M: Mazatlan stock. The sizes of the arrows do not represent intensities of the current; they are indicative of the main direction.

*et al.*, 2015; Pérez-Quñonez *et al.*, 2017) and stock delimitation in structured populations (Ramírez-Pérez *et al.*, 2010; García-Rodríguez *et al.*, 2011; Vergara-Solana *et al.*, 2013). Our results suggest that at least three Pacific thread herring morphotypes are distributed in the northwestern Mexican Pacific and that the GYM morphotype has the highest similarity with the other two groups (BM and MAZ), depending on the time of year. Future analyses should focus on the identification of a morphological criterion to distinguish among individuals according to the morphotypes found, as well as on the evaluation of whether the identified phenotypic stocks correspond to different populations using molecular analyses. It could provide a better understanding of this species' biology and reinforce the management of its fishery.

**ACKNOWLEDGMENTS**

Instituto Politécnico Nacional (IPN) funded this study through projects SIP-20130785 and SIP-20141367. CIPQ is a recipient of the CONACYT postgraduate fellowship. CQV and FJGR are fellows of the Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas-IPN, Estímulos al Desempeño de los Investigadores-IPN, and Sistema Nacional de Investigadores-CONACYT. The authors declare that they have no conflict of interest. The manuscript was greatly benefited by the comments and suggestions of two anonymous reviewers.

**REFERENCES**

Acal, D.E. 1990. Biomass and potential yield of the thread herring (*Opisthonema* spp.) off the coasts of Sinaloa and Nayarit. *Cienc. Mar.*, 16: 61-73.

Alberch, P., S.J. Gould, G.F. Oster & D.B. Wake. 1979. Size and shape in ontogeny and phylogeny. *Paleobiology*, 5: 296-317.

Begg, G. & J.R. Waldman. 1999. A holistic approach to fish stock identification. *Fish. Res.*, 43: 35-44.

Berry, D.H. & I. Barret. 1963. Gillraker analysis and speciation in the thread herring genus *Opisthonema*. *Bull. Inter-Amer. Trop. Tuna Comm.*, 7: 137-190.

Blood, C.L. 2003. Age validation of Pacific halibut. II. Comparison of surface and break-and-burn otoliths methods of aging Pacific halibut. *IPHC Tech. Rep.*, 47: 32 pp.

Bograd, S.J. & R.J. Lynn. 2003. Long-term variability in the southern California Current System. *Deep-Sea Res. II*, 50: 2355-2370.

Bookstein, F.L. 1989. Principal warps: thin-plate splines and the decomposition of deformations. *IEEE Trans. Patt. Anal. Mach. Intel.*, 11: 567-585.

Cadrin, S.X. 2000. Advances in morphometric identification of fishery stocks. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 10: 91-112.

Cadrin, S.X., K.D. Friedland & J.R. Waldman. 2005. Stock identification methods -an overview. In: S.X. Cadrin, K.D. Friedland & J.R. Waldman (eds.). *Amsterdam stock identification methods applications in fishery science*. Elsevier Academic Press, London, pp. 3-8.

Campana, S.E. & J.M. Casselman. 1993. Stock discrimination using otolith shape analysis. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 50: 1062-1083.

Csirke, J. 1980. Introducción a la dinámica de poblaciones de peces. *FAO Doc. Téc. Pesca*, 203: 82 pp.

De La Cruz-Agüero, J. & F.J. García-Rodríguez. 2004. Morphometric stock structure of the Pacific sardine *Sardinops sagax* (Jenyns, 1842) off Baja California,



- Mexico. In: A.M.T. Elewa (ed.). Morphometrics applications in biology and paleontology. Springer-Verlag, New York, pp. 115-127.
- De La Cruz-Agüero, J., F.J. Vergara-Solana & F.J. García-Rodríguez. 2015. Geometric morphometrics supports the proposed molecular taxonomy for three *Eucinostomus* species (Perciformes: Gerridae) along the coasts of Mexico. *Zoomorphology*, 134: 125-134.
- DeVries, D.A., C.B. Grimes & M.H. Prager. 2002. Using otolith shape analysis to distinguish eastern Gulf of Mexico and Atlantic Ocean stocks of king mackerel. *Fish. Res.*, 57: 51-62.
- Durazo, R. 2009. Climate and upper ocean variability off Baja California, México: 1997-2008. *Prog. Oceanogr.*, 83: 361-368.
- Ehrhardt, N.M., P.S. Jacquemin, B.F. García, D.G. González, B.J.M. López, C.J. Ortiz & N.A. Solís. 1983. On the fishery and biology of the giant squid *Dosidicus gigas* in the Gulf of California, Mexico. In: J.F. Caddy (ed.). Advances in assessment of world cephalopod resources. FAO Fish. Tech. Pap., 231: 306-340.
- Edwards, K.R., Q.E. Phelps, J.L. Shepherd & D.W. Wills. 2005. Comparison of scale and otolith age estimates for two south Dakota bluegill populations. *Proc. South Dakota Acad. Sci.*, 84: 181-186.
- Farré, M., J. Narayan, G.T. Slavov, J. Damas, L. Auvil, C. Li, E.D. Jarvis, D.W. Burt, D.K. Griffin & D.M. Larkin. 2016. Novel insights into chromosome evolution in birds, archosaurs, and reptiles. *Genome Biol. Evol.*, 8: 2442-2451.
- Félix-Uraga, R., V.M. Gómez-Muñoz, C. Quiñonez-Velázquez, F.N. Melo-Barrera & W. García-Franco. 2004. On the existence of Pacific sardine groups off the west coast of Baja California and southern California. *CalCOFI Rep.*, 45: 146-151.
- Félix-Uraga, R., V.M. Gómez-Muñoz, C. Quiñonez-Velázquez, F.N. Melo-Barrera, K.T. Hill & W. García-Franco. 2005. Pacific sardine (*Sardinops sagax*) stock discrimination off the west coast of Baja California and southern California using otolith morphology. *CalCOFI Rep.*, 46: 113-121.
- Felsenstein, J. 2005. Using the quantitative genetic threshold model for inferences between and within species. *Philos. Trans. Roy. Soc. B*, 360: 1427-1434.
- García-Morales, R., B. Shirasago-German, R. Félix-Uraga & E.L. Pérez-Lezama. 2012. Conceptual models of Pacific sardine distribution in the California Current System. *Curr. Dev. Oceanogr.*, 5(1): 23-47.
- García-Rodríguez, F.J., S.A. García-Gasca, J. De La Cruz-Agüero & V.M. Cota-Gómez. 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.
- Gaxiola-Castro, G., B. Durazo-Lavaniegos, M.E. De-la-Cruz-Orozco, E. Millán-Núñez, L. Soto-Mardones & J. Cepeda-Morales. 2008. Pelagic ecosystem response to interannual variability off Baja California. *Cienc. Mar.*, 34: 263-270.
- Gould, S.J. 1966. Allometry and size in ontogeny and phylogeny. *Biol. Rev.*, 41: 587-638.
- Gower, J.C. 1975. Generalized procrustes analysis. *Psychometrika*, 40: 33-51.
- Hickey, B.M. 1979. The California current system. Hypotheses and facts. *Progr. Oceanogr.*, 8: 191-279.
- Holt, S.J. 1975. Los recursos alimenticios del océano. *Oceanografía*. Madrid: selecciones del Scientific American, [sardinagolfodecalifornia.org/wp-content/uploads/2013/08/](http://sardinagolfodecalifornia.org/wp-content/uploads/2013/08/), pp. 400-414.
- Ibáñez-Aguirre, A.L., E. Cabral-Solís, M. Gallardo-Cabello & E. Espino-Barr. 2006. Comparative morphometrics of two populations of *Mugil curema* (Pisces: Mugilidae) on the Atlantic and Mexican Pacific coasts. *Sci. Mar.*, 70: 139-145.
- Ihssen, P.E., H.E. Booke, J.M. Casselman, J.M. McGlade, R.N. Payne & F.M. Utter. 1981. Stock identification: material and methods. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 38: 1838-1855.
- Jacob-Cervantes, M. 2010. La pesquería de peces pelágicos menores en el sur del Golfo de California. Análisis de la temporada de pesca 2008. *Cienc. Pesq.*, 18(2): 47-58.
- Jacob-Cervantes, M.L. & H. Aguirre-Villaseñor. 2014. Inferencia multimodelo y selección de modelos aplicados a la determinación de L50 para la sardina crinuda *O. libertate* del sur del Golfo de California. *Cienc. Pesq.*, 22(1): 61-68.
- Jacob-Cervantes, M.L., M.A. Valdez-Ornelas, O. Chapa-Morales, R.E. Gastelum-Villareal, I. López-Nuño & P. Valdez-Ledón. 2007. La variabilidad de las capturas en la pesquería de peces pelágicos menores en Sinaloa, Nayarit y Jalisco durante el 2006. CRIP-Mazatlán, INP, SAGARPA. Doc. Interno, 23 pp.
- Kendall, D. 1977. The diffusion of shape. *Adv. Appl. Probab.*, 9: 428-430.
- Klingenberg, C.P. 1998. Heterochrony and allometry: the analysis of evolutionary change in ontogeny. *Biol. Rev.*, 73: 79-123.
- Lagúnez-Moreno, L.M. 1989. Identificación de razas geográficas de *Opisthonema* sp. en las costas de Baja California Sur. Tesis Maestría en Ciencias, Centro de Ciencias Interdisciplinario de Ciencias Marinas, La Paz, 46 pp.
- Lin, H.C. & W.A. Dunson. 1999. Phenotypic plasticity in the growth of the self-fertilizing hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus*. *J. Fish. Biol.*, 54: 250-266.
- Lluch-Belda, D., F.J. Magallon & R.A. Schwartzlose. 1986. Large fluctuations in the sardine fishery in the Gulf of

- California: possible causes. CalCOFI Rep., 27: 136-140.
- Lluch-Belda, D., D.B. Lluch-Cota & S.E Lluch-Cota. 2005. Changes in marine faunal distributions and ENSO events in the California Current. Fish. Oceanogr., 14: 458-467.
- Marinone, S.G. 2012. Seasonal surface connectivity in the Gulf of California. Estuar. Coast. Shelf Sci., 100: 133-141.
- Marinone, S.G., M.F. Lavín, A. Parés-Sierra. 2011. A quantitative characterization of the seasonal Lagrangian circulation of the Gulf of California from a three dimensional numerical model. Cont. Shelf Res., 31: 1420-1426.
- Nevárez-Martínez, M.O., M.A. Martínez-Zavala, C.E. Cotero-Altamirano, M.L. Jacob-Cervantes, Y. Green-Ruiz, G. Gluyas-Millán, A. Cota-Villavicencio & J.P. Santos-Molina. 2006. La pesquería de pelágicos menores. In: F. Arreguín-Sánchez, L. Beléndez-Moreno, I. Méndez Gómez-Humaran, R. Solana-Sansores & C. Rangel-Dávalos (eds.). Sustentabilidad y pesca responsable en México: evaluación y manejo. Instituto Nacional de la Pesca, SAGARPA, México, pp. 263-295.
- Parés-Sierra, A., M. López & E.G. Pavia. 1997. Oceanografía física del Océano Pacífico Nororiental. In: M.F. Lavín (ed.). Contribuciones a la oceanografía física en México. Unión Geofísica Mexicana, Monografía, 3: 1-24.
- Pavlova, Y.V. 1966. Seasonal variations of the California Current. Oceanology, 6: 806-814.
- Pérez-Brunius, P., M. Lopez, A. Pares-Sierra & J. Pineda. 2007. Comparison of upwelling indices off Baja California derived from three different wind data sources. CalCOFI Rep., 48: 204-214.
- Pérez-Quiñonez, C.I., C. Quiñonez-Velázquez, J.S. Ramírez-Pérez, F.J. Vergara-Solana & F.J. García-Rodríguez. 2017. Combining geometric morphometrics and genetic analysis to identify species of *Opisthonema* Gill, 1861 in the eastern Mexican Pacific. J. Appl. Ichthyol., 33: 84-92.
- Polat, N., D. Bostanci & S. Yilmaz. 2005. Differences between whole otolith and broken-burnt otolith ages of red mullet (*Mullus barbatus ponticus* Essipov, 1927) Sampled from the black sea (Samsun Turkey). Turk. J. Vet. Anim. Sci., 29: 429-433.
- Ramírez-Pérez, J.S., C. Quiñonez-Velázquez, F.J. García-Rodríguez, R. Félix-Uraga & F.N. Melo-Barrera. 2010. Using the body shape of *Sagitta* otoliths in the discrimination of phenotypic stocks in *Scomberomorus sierra* (Jordan & Starks, 1895). J. Fish. Aquat. Sci., 5(2): 82-93.
- Rodríguez-Domínguez, G. 1987. Caracterización bioecológica de las tres especies de sardina crinuda (*Opisthonema libertate*, *O. bulleri* y *O. mediraastre*) del Pacífico mexicano. Tesis de Maestría, CICESE, Ensenada, 87 pp.
- Rohlf, F.J. 2004. TpsDIG Version 1.40. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, New York.
- Ruiz, L. & F. Lyle. 1992. Periodic fluctuations capture thread herring (*Opisthonema* spp.) in the Gulf of California, 1972-1990. CalCOFI Rep. 33: 124-129.
- SAGARPA-CONAPESCA. 2013. Anuario estadístico de acuicultura y pesca 2013. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Comisión Nacional de Pesca. Mexico. [http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona\_anuario\_estadistico\_de\_pesca]. Reviewed: 5 July 2017.
- Saldierna-Martínez, R.J., G. Vera-Alejandro, F. Lachica-Bonilla & M.E. Hernández-Rivas. 1995. Estrategias reproductivas de *Sardinops caeruleus* y *Opisthonema libertate* (Pisces: Clupeidae) en el Golfo de California, México. Memorias del Talles de Pelágicos Menores, La Paz, B.C.S., noviembre 1995.
- Saitou, N. & M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol., 4: 406-425.
- Sheets, H.D. 2004. IMP: integrated morphometrics package. Canisius College, Buffalo. [http://www3.canisius.edu/~sheets/morphsoft.html]. Reviewed: 10 July 2017.
- Silva, A. 2003. Morphometric variation among sardine (*Sardina pilchardus*) populations from the north-eastern Atlantic and the western Mediterranean. ICES J. Mar. Sci., 60: 1352-1360.
- Sokolov, D.V. 1974. Investigaciones biológico pesqueras de los peces pelágicos del Golfo de California. All-Union Research Institute of Marine Fisheries and Oceanography, 17, Krasnoselskaya. Moscow B-140, USSR.
- Stevenson, D.K. & F. Carranza. 1981. Maximum yield estimates for the Pacific thread herring, *Opisthonema* spp., fishery in Costa Rica. Fish. Bull., 79: 689-703.
- Stransky, C., A.G. Murta & C. Zimmermann. 2008. Otolith shape analysis as a tool for stock separation of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) in the Northeast Atlantic and Mediterranean. Fish. Res., 89: 159-166.
- Talley, L.D. 1993. Distribution and formation of the North Pacific Intermediate Water. J. Phys. Oceanogr., 23: 517-537.
- Torres-Ramírez, M.N. 2004. Nueva clave de identificación para la sardina crinuda del género *Opisthonema* (Gil, 1861) en el Pacífico mexicano. Tesis de



- Licenciatura, Universidad Autónoma de Sinaloa, Mazatlán, 19 pp.
- Tzeng, T.D. 2004. Morphological variation between populations of spotted mackerel (*Scomber australasicus*) off Taiwan. *Fish. Res.*, 68: 45-55.
- Vallarta-Zárate, J.R. 2012. Distribución y abundancia de la sardina crinuda (*Opisthonema* spp.) en el sur del Golfo de California asociada a la variabilidad ambiental durante el periodo 1996-2010. Tesis Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, Mazatlán, 119 pp.
- Vega-Corrales, L.A. 2010. Population assessment of exploitable stock *Opisthonema* complex (Pisces: Clupeidae) in the Gulf of Nicoya, Costa Rica. *Rev. Mar. Cost.*, 2: 83-94.
- Vergara-Solana, F.J., F.J. García-Rodríguez & J. De la Cruz-Aguero. 2013. Comparing body and otolith shape for stock discrimination of Pacific sardine, *Sardinops sagax* Jenyns, 1842. *J. Appl. Ichthyol.*, 29: 1241-1246.
- Waldman, J.R. 1999. The importance of comparative studies in stock analysis. *Fish. Res.*, 43: 237-246.
- Waldman, J.R. 2005. Definition of stocks: an evolving concept. In: S.X. Cadrin, K.D. Friedl & J.R. Waldman (eds.). *Stock identification methods applications in fishery science*. Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp. 7-16.
- Zelditch, M.L., D.L. Swiderski, H.D. Sheets & W.L. Fink. 2004. *Geometric morphometrics for biologists: a primer*. Elsevier Academic Press, London, 443 pp.

*Received: 16 August 2017; Accepted: 2 April 2018*