



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

PANMIXIA EN UNA ESPECIE DE PROFUNDIDAD:
EL BACALAO NEGRO DEL PACÍFICO NORTE,
Anoplopoma fimbria (Pallas, 1814)

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos
Naturales (Orientación en Biología Marina)

P r e s e n t a

Adonaji Madeleine Orozco Ruiz

La Paz, Baja California Sur, octubre de 2020.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 13:00 horas del día 31 del Mes de Agosto del 2020, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

" Panmixia en una especie de profundidad: El Bacalao Negro del Pacífico Norte, *Anoplopoma fimbria* (Pallas, 1814)"

Presentada por la alumna:

Adonaji Madeleine Orozco Ruiz

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Biología Marina**

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



LA COMISIÓN REVISORA

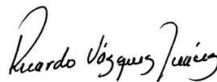


Dr. Francisco Javier García de León

Director de Tesis

Dra. Carolina Galván Tirado

Co-Tutora



Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Co-Tutor



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos.

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dr. Francisco Javier García de León

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C

Director de Tesis

Dra. Carolina Galván Tirado

Universidad Autónoma de Baja California Sur

Co-tutora de Tesis

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C

Co-tutor de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dr. Francisco Javier García de León

Dra. Carolina Galván Tirado

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Jurado de Examen

Dr. Francisco Javier García de León

Dra. Carolina Galván Tirado

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Suplente

Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez

Resumen

La estructura genética de poblaciones es el resultado de la compleja interacción de fuerzas evolutivas tales como la mutación, el flujo de genes, la deriva genética y la selección; además de la historia de la vida y la variación temporal y espacial del entorno. En las subregiones donde el flujo genético es generalmente alto, las poblaciones muestran una estructura panmíctica (apareamiento aleatorio entre aquellos individuos involucrados en la reproducción). En peces esta estructura poblacional ha sido reportada en algunas especies demersales como el bacalao negro *Anoplopoma fimbria*, una especie con amplia distribución geográfica e importancia comercial en Estados Unidos, Canadá, Rusia y Japón y considerada como un recurso potencial pesquero en México. Los estudios para determinar la estructura genética del bacalao negro no son conclusivos, mientras que algunos autores reportan una débil estructuración, otros no encuentran diferencias entre sitios. En el presente estudio, se reexamina la estructura genética del bacalao negro, integrando la información de 11 marcadores microsatélites, y datos de ADN mitocondrial. Además, se amplía el rango geográfico evaluado en estudios previos, de Rusia pasando por todo el arco norte del Pacífico hasta la parte occidental de la Península de Baja California. Los datos de microsatélites indican que los individuos recolectados en México son genéticamente diferentes del resto de los sitios de recolecta, comportándose estos últimos como una población homogénea. Mientras que los datos mitocondriales no detectan diferencias genéticas entre ellas. Estos resultados sugieren que la especie no presenta una estructura panmíctica y que el stock mexicano divergió recientemente.

Palabras clave: Estructura genética, desequilibrio mito-nuclear, polimorfismos mitocondriales de un solo nucleótido (SNPmt), COI, microsatélites



Vo.Bo.

Dr. Francisco Javier García de León
Director de Tesis

Summary

The genetic structure of populations is the result of the complex interplay of evolutionary forces such as mutation, gene flow, genetic drift, and selection; in addition to the history of life and the temporal and spatial variation of the environment. In subregions where gene flow is generally high, populations show a panmictic structure (random mating between those individuals involved in reproduction). In fish, this population structure has been reported in some demersal species such as the black cod *Anoplopoma fimbria*, a species with wide geographical distribution and commercial importance in the United States, Canada, Russia, and Japan and considered as a potential fishing resource in Mexico. Studies to determine the genetic structure of black cod are not conclusive, while some authors report a weak structure, others do not find differences between sites. In the present study, the genetic structure of black cod is reexamined, integrating information from 11 microsatellite markers, and data from mitochondrial DNA. In addition, the geographic range evaluated in previous studies is expanded, from Russia through the entire northern Pacific arc to the western part of the Baja California Peninsula. The microsatellite data indicate that the individuals collected in Mexico are genetically different from the rest of the collection sites, the latter behaving as a homogeneous population. While the mitochondrial data do not detect genetic differences between them. These results suggest that the species does not present a panmictic structure and that the Mexican stock diverged recently.

Key words: Genetic structure, mito-nuclear disequilibrium, mitochondrial single nucleotide polymorphisms (mtSNPs), COI, microsatellites



Vo.Bo.

Dr. Francisco Javier García de León
Director de Tesis

Dedicatoria

Para mis hermanos, mi mayor inspiración para esforzarme cada día.

Agradecimientos

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR) por brindarme un espacio para continuar con mi formación académica y profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada No.814211.

Al personal de Posgrado por todo el apoyo brindado durante estos dos años, y especialmente al Lic. Horacio Sandoval Gómez por su apoyo en las reuniones y con los programas y facilidades para el análisis de datos.

A mi comité tutorial: Dr. Ricardo Vásquez Juárez, Dra. Carolina Galván Tirado y Dr. Francisco Javier García de León, por compartir su experiencia conmigo y el tiempo dedicado para la realización de este proyecto.

A mis compañeros y familia del Laboratorio de Genética para la Conservación: Vero, Chevy, Gina, Josué, Caro y Karen; por brindarme además de su apoyo académico, su amistad.

A mi Director de Tesis: Dr. Francisco J. García de León por todo el apoyo que me ha dado como director y como amigo desde que me incorpore a su equipo de trabajo. Admiro la dedicación que pone a cada uno de sus estudiantes.

A mis compañeros y amigos de generación de maestría, especialmente Bardo, Dani y Fany por su amistad y apoyo en los momentos de crisis.

A mi familia paceña: Azu, Naty y Santoyo, por todo el amor y las buenas vibras que siempre recibo de ustedes. A Mapo y Arellano por dejarme formar parte de sus vidas desde que llegue a La Paz y por qué pese a todo no han dejado de demostrarme su cariño y apoyo incondicional en cada proyecto que he emprendido.

A mis padres por no dejar de creer en mí y apoyarme en todo, pero especialmente a mi madre, por tejerme unas alas grandes y fuertes para volar. Eres una SUPER MAMÁ.

A mis hermanos porque cada experiencia con ustedes me ha hecho crecer de muchas maneras. Sin importar la distancia su hermana los ama y apoyara en todo siempre. Es por ustedes que me esfuerzo en ser el mejor ejemplo de hermana mayor que puedo. Los amo.

Contenido

| | |
|--|-----|
| Resumen | i |
| Summary | ii |
| Dedicatoria | iii |
| Agradecimientos | iv |
| Contenido | v |
| Lista de figuras | vi |
| Lista de tablas | vii |
| | |
| 1.INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2.ANTECEDENTES | 3 |
| 2.1 Panmixia | 3 |
| 2.2 El Bacalao negro | 4 |
| 2.3 Marcadores moleculares | 7 |
| 3.JUSTIFICACIÓN | 9 |
| 4.HIPÓTESIS | 10 |
| 5.OBJETIVOS | 11 |
| 5.1 Objetivo general | 11 |
| 5.2 Objetivos particulares | 11 |
| 6.MATERIALES Y MÉTODOS | 12 |
| 6.1 Obtención de las muestras..... | 12 |
| 6.2 Microsatélites..... | 13 |
| 6.2.1 Extracción de ADN y genotipificación..... | 13 |
| 6.2.2 Verificación y calibración de los loci microsatélites usados..... | 14 |
| 6.2.3 Estructura genética poblacional y diversidad genética | 15 |
| 6.2.3.1 Análisis de agrupación bayesiana | 15 |
| 6.2.3.2 Análisis Discriminante de Componentes Principales (ADCP) | 16 |
| 6.2.3.3 Estimaciones de diferenciación genética poblacional (F_{ST}) | 16 |
| 6.2.3.4 Aislamiento por distancia..... | 17 |
| 6.2.3.5 Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) | 17 |
| 6.2.3.6 Diversidad genética..... | 18 |
| 6.2.4 Poder estadístico | 19 |
| 6.3 ADN mitocondrial | 19 |
| 6.3.1 Polimorfismos mitocondriales obtenido por NGS (SNPs, del ADNmt) | 19 |
| 6.3.2 Citocromo b (Cyt-B) y Región Control (D-loop) | 21 |
| 6.3.3 Estructura genética poblacional y diversidad genética..... | 23 |
| 6.3.3.1. Red haplotípica..... | 23 |
| 6.3.3.2 Estimaciones de diferenciación genética poblacional (FST)..... | 23 |
| 6.3.3.3 Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) | 23 |
| 6.3.3.4 Diversidad Genética..... | 24 |
| 7.RESULTADOS | 25 |
| 7.1 Microsatélites | 25 |
| 7.1.1 Verificación y calibración de los loci microsatélites..... | 25 |
| 7.1.2 Estructura genética poblacional y diversidad genética..... | 26 |

| | | |
|------------|---|----|
| 7.1.2.1 | Análisis de agrupación bayesiana..... | 26 |
| 7.1.2.2 | Análisis Discriminante de Componentes Principales (ADCP)..... | 27 |
| 7.1.2.3 | Estimaciones de diferenciación genética poblacional (F_{ST}) | 27 |
| 7.1.2.4 | Aislamiento por distancia | 28 |
| 7.1.2.5 | Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) | 29 |
| 7.1.2.6 | Diversidad genética..... | 31 |
| 7.1.3 | Poder estadístico..... | 33 |
| 7.2. | Mitocondrial..... | 34 |
| 7.2.1 | Estructura genética poblacional y diversidad genética..... | 34 |
| 7.2.1.1 | Red de haplotipos..... | 34 |
| 7.2.1.1.1 | Polimorfismos mitocondriales de un solo nucleótido (SNP's, ADNmt) | 34 |
| 7.2.1.1.2 | Citocromo b (Cyt-B) y Región Control (D-loop) | 35 |
| 7.2.1.2 | Estimaciones de diferenciación genética poblacional (F_{ST}) | 38 |
| 7.2.1.2.1 | Polimorfismos mitocondriales de un solo nucleótido (SNP del ADNmt) | 38 |
| 7.2.1.2.2 | Citocromo b (Cyt-B) y Región Control (D-loop) | 38 |
| 7.2.1.3 | Análisis molecular de varianza (AMOVA) | 41 |
| 7.2.1.4 | Diversidad genética..... | 44 |
| 8. | DISCUSIÓN | 45 |
| 8.1 | ADN nuclear (Microsatélites) | 45 |
| 8.2 | ADN mitocondrial | 47 |
| 8.3 | Estructura genética poblacional..... | 48 |
| 8.4 | Discordancia mito nuclear | 54 |
| 8.5 | Implicaciones para el manejo..... | 55 |
| 9. | CONCLUSIONES | 59 |
| 10. | LITERATURA CITADA | 60 |
| 11. | ANEXOS | 70 |

Lista de figuras

- Figura 1.** Mapa de los sitios de muestreo. La sombra gris indica la distribución de la especie mientras que los puntos señalan los sitios de colecta y los colores el tipo de marcador para cada localidad. Para los acrónimos e información de los sitios ver la tabla II.....12
- Figura 2.** Genoma mitocondrial de *Anoplopoma fimbria*. El círculo exterior representa la secuencia mitocondrial completa reportada previamente y disponible en GenBank. Al interior, las flechas gruesas representan los genes amplificados por secuenciación de última generación (NGS), el tamaño y nombre correspondiente a cada fragmento se encuentran al interior de las flechas. Los ARN de transferencia amplificados se presentan al exterior de los fragmentos. Sobre la secuencia mitocondrial completa (líneas perpendiculares) se muestra la posición de cada polimorfismo recuperado, así como los cebadores empleados. SnapGene® software (De GSL Biotech; disponible en snapgene.com)22
- Figura 3.** Estructura de la población inferida por el software STRUCTURE basado en análisis de ADN de 11 microsatélites para *Anoplopoma fimbria*. El valor óptimo de delta K fue 2 (DeltaK = 8.4734, Media LnP (K) -11591.350). En la parte superior de la figura, el gráfico arrojado por CLUMPAK en la que cada barra vertical representa un individuo y el eje Y indica el porcentaje estimado de los individuos para cada grupo inferido (K) los cuales son representados con un color distintivo (Naranja y Azul). Para los acrónimos e información de los sitios ver la tabla II.....26
- Figura 4.** El diagrama de ordenación a partir de un Análisis Discriminante de Componentes Principales (ADCP) empleando la base 11L para *Anoplopoma fimbria* (Numero de componentes retenidos, PC: 80; Numero de discriminantes, DA: 8; proporción de varianza conservada: 0.861). Los sitios de colecta se muestran con diferentes colores y estilo de puntos. Los puntos representan individuos y el recuadro inferior derecho muestra los valores propios (eigenvalues) de los ocho componentes de mayor magnitud resaltando en negro los usados para realizar los gráficos. Para los acrónimos e información de los sitios ver la tabla II.....27
- Figura 5.** Aislamiento por distancia en *Anoplopoma fimbria*. Gráfico correspondiente a la base 11L. En el eje X las distancias geográficas (km) y en el eje Y la distancia genética linealizada. La línea negra continua representa la línea de regresión entre la distancia geográfica y la genética. El gradiente de color de azul claro a rojo indica la densidad de los puntos que también se muestran en el fondo del gráfico. A) Distancia Cavalli-Sforza C) Distancia de Nei.....29
- Figura 6.** Índices de diversidad genética. Heterocigosidad observada (HO) y esperada (HE), por localidad (a y b) y por población genética (c y d) de *Anoplopoma fimbria*. Para los acrónimos e información de los sitios ver la tabla II.....32
- Figura 7.** Potencia estadística simulada para obtener resultados significativos en las pruebas de diferenciación genética que involucran 8 microsatélites loci y los tamaños de muestra utilizados en este estudio para *Anoplopoma fimbria*. Se muestra en el gráfico para cada valor de FST la proporción de pruebas que fueron significativas a $p < 0.05$33

| | |
|--|----|
| Figura 8. Red de haplotipos estimada mediante el algoritmo <i>Median Joining</i> usando los SNPs mt de <i>Anoplopoma fimbria</i> . Cada nodo representa un haplotipo de secuencia de ADNmt único donde cada color representa una localidad de muestreo y el tamaño del círculo indica la frecuencia. Las longitudes de las líneas que conectan haplotipos y su distancia esta medida en pasos mutacionales (líneas transversales). Los nodos rojos son haplotipos no observados inferidos por el programa. Las letras mayúsculas y las sombras en gris representan los haplogrupos designados. Para los acrónimos e información de los sitios ver la tabla II..... | 34 |
| Figura 9. Distribución de los haplogrupos de <i>Anoplopoma fimbria</i> empleando SNPs del ADNmt. Los diferentes tonos de gris representan cada haplogrupo y se muestra para cada localidad la composición en porcentaje de cada haplogrupo. Para los acrónimos e información de los sitios ver la tabla II..... | 35 |
| Figura 10. Red de haplotipos estimada mediante el algoritmo <i>Median Joining</i> usando la región Cyt-b ADNmt de <i>Anoplopoma fimbria</i> . Cada nodo representa un haplotipo de secuencia de ADNmt único donde cada color representa una localidad de muestreo y el tamaño del círculo indica la frecuencia. Las longitudes de las líneas que conectan haplotipos y su distancia esta medida en pasos mutacionales (líneas transversales). Los nodos rojos son haplotipos no observados inferidos por el programa y las letras mayúsculas y las sombras grises representan los haplogrupos designados. Para los acrónimos e información de los sitios ver la tabla II..... | 36 |
| Figura 11. Distribución de los haplogrupos de <i>Anoplopoma fimbria</i> empleando la región mitocondrial Cyt-b. Los diferentes tonos de gris representan cada haplogrupo y se muestra para cada localidad la composición en porcentaje de cada haplogrupo. Para los acrónimos e información de los sitios ver la tabla II..... | 37 |
| Figura 12. Mapa de distribución nativa de <i>Anoplopoma fimbria</i> . www.aquamaps.org , Consultado el 22 de agosto de 2020..... | 50 |
| Figura 13. Sistema actual de California (A) (CB, Cabo Blanco; PB, Punta Baja; Punta Eugenia en Negritas). (B) Las condiciones de surgencia son comunes durante la primavera y el verano cuando los vientos predominantes son del norte. Durante la primavera, el verano y principios del otoño, la afluencia y los remolinos son persistentes en la península de Baja California. (C) Los eventos de relajación ocurren cuando los vientos del norte se relajan. (D) Durante el otoño y el invierno, los vientos predominantes del sur establecen un flujo hacia el polo y una contracorriente costera. Tomado y modificado de: (Shanks y Eckert, 2005)..... | 13 |

Lista de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla I. Revisión bibliográfica sobre la estructura genético poblacional del bacalao negro (<i>Anoplopoma fimbria</i>)..... | 6 |
| Tabla II. Información de cada sitio de colecta para cada marcador empleado. El número de individuos por localidad se muestra para cada marcador..... | 13 |
| Tabla III. Porcentaje de amplificación total de la base de datos, el porcentaje por locus (A) y por localidad (B)..... | 25 |
| Tabla IV. Valores de FST obtenidos con 8 loci microsatélites para <i>Anoplopoma fimbria</i> . Diagonal inferior FST, diagonal superior G'ST (Hedrick, 2005). En negritas las comparaciones significativas. Para los acrónimos e información de los sitios ver la tabla II..... | 28 |
| Tabla V. Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) realizado con 11 loci microsatélites para <i>Anoplopoma fimbria</i> . Porcentaje de variación de diferentes niveles jerárquicos de las hipótesis puestas a prueba. Para los acrónimos e información de los sitios ver la tabla II..... | 30 |
| Tabla VI. Riqueza Alélica (RA) y Riqueza de alelos privados (RAP) para cada localidad y población genética de <i>Anoplopoma fimbria</i> . Para los acrónimos e información de los sitios ver la tabla I..... | 31 |
| Tabla VII. Valores del índice de fijación, FST (diagonal inferior) de <i>Anoplopoma fimbria</i> empleando SNP del ADNmt y niveles de significancia estadística para cada comparación (p) en la diagonal superior. Para los acrónimos e información de los sitios ver la tabla II..... | 38 |
| Tabla VIII. Valores del índice de fijación FST para la región Cyt-b (diagonal inferior) de <i>Anoplopoma fimbria</i> y niveles de significancia estadística para cada comparación (p) en la diagonal superior. Para los acrónimos e información de los sitios ver la tabla II..... | 39 |
| Tabla IX. Valores del índice de fijación FST para la región D-loop (diagonal inferior) de <i>Anoplopoma fimbria</i> y niveles de significancia estadística para cada comparación (p) en la diagonal superior. En negritas las comparaciones significativas. Para los acrónimos e información de los sitios ver la tabla II..... | 40 |
| Tabla X. Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) empleando datos de ADNmt de <i>Anoplopoma fimbria</i> . Se muestran el porcentaje de variación (%) de diferentes niveles jerárquicos de las hipótesis puestas a prueba, así como los estadísticos F y la significancia estadística (p). Para los acrónimos e información de los sitios ver la tabla II..... | 42 |
| Tabla XI. Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) de la región D-loop de <i>Anoplopoma fimbria</i> . Se muestran el porcentaje de variación (%) de diferentes niveles jerárquicos de las hipótesis puestas a prueba, así como los estadísticos F y la significancia estadística (p). Los acrónimos correspondientes a las localidades se presentan en la Tabla II..... | 43 |
| Tabla XII. Diversidad genética del ADNmt en <i>Anoplopoma fimbria</i> . Número de muestra (N), número de haplotipos (H), diversidad haplotípica (h) y diversidad nucleotídica (π). Los acrónimos correspondientes a las localidades se presentan en la Tabla II..... | 44 |

1. INTRODUCCIÓN

La estructura genética entre poblaciones es el resultado de la interacción compleja entre las diferentes fuerzas evolutivas como la mutación, el flujo de genes, la deriva genética y la selección, en conjunción con la historia vida y la variación del entorno temporal y espacial de las especies (Waples, 1998). Por lo tanto, la estructura genética no solo refleja procesos contemporáneos, sino que también refleja procesos históricos de las poblaciones (Palsbøll et al., 2007). Es por esto que es esencial conocer la importancia relativa de estos diferentes procesos para comprender la evolución de la biodiversidad. Prevenir la pérdida de la biodiversidad es clave para las estrategias de conservación y manejo, que a menudo, se plantean sin ninguna identificación adecuada de las poblaciones y sin comprensión de los mecanismos que subyacen a su estructura (Roy et al., 2014). Para la mayoría de las especies marinas existen varios aspectos que pueden favorecer o no la diferenciación genética entre poblaciones, entre ellos se encuentra: La filopatría (fidelidad de regresar al sitio de nacimiento) y el cortejo; factores demográficos, como el reclutamiento, crecimiento, reproducción, vagilidad de gametos, larvas, juveniles y adultos así como la mortalidad; además de barreras físico-químicas como los gradientes de temperatura y salinidad, corrientes y frentes oceánicos, y la historia geológica del sitio de distribución de la especie de interés (Smith y Fujio, 1982). Es por esto que en muchas ocasiones evaluar la estructura poblacional en organismos marinos resulta una tarea difícil. Aunado a lo anterior, en el mar la identificación de las áreas de desove y la recolección de individuos reproductores resulta en muchas ocasiones complicada (Palm et al., 2009). El alto flujo de genes en combinación con una población efectiva de gran tamaño, características típicas de la mayoría de las especies marinas, puede reducir el grado de diferenciación genética entre las subregiones (Waples, 1998), aunque pueden funcionar de manera independiente desde una perspectiva demográfica. En especies con una distribución geográfica amplia, las subregiones, donde el flujo de genes es generalmente alto, se pueden considerar panmícticas, en las cuales el apareamiento entre los individuos involucrados en la reproducción es aleatorio (Waples y Gaggiotti, 2006; Hauser y Carvalho, 2008). Esta estructura poblacional ha sido reportada en algunas especies demersales, las cuales comparten varias características de su historia de vida

como una tasa de crecimiento lenta, madurez tardía, tamaños corporales grandes, larga vida potencial y gran capacidad migratoria.

El presente estudio, pretende reexaminar la estructura genética poblacional actual del pez demersal, *Anoplopoma fimbria*, integrando marcadores de ambos genomas (nuclear y ADN mitocondrial) al usar 11 marcadores microsátélites y diferentes sets de datos mitocondriales. Además, se amplía el rango geográfico evaluado en el último estudio poblacional sobre la especie. Se busca verificar la panmixia en una especie con una amplia distribución geográfica y patrones de migración vertical y latitudinal complejos. Dicha información permitirá una mejor comprensión de los patrones de distribución espacial de la diversidad genética de esta especie, así como generar valiosa información para guiar políticas de explotación de un recurso biológico compartido entre los países de la cuenca del Pacífico Norte.

2. ANTECEDENTES

2.1 Panmixia

Las poblaciones silvestres se distribuyen en el espacio geográfico con varios grados de flujo de genes que conectan subregiones. Desde el punto de vista de la genética de poblaciones, existen tres modelos principales de estructura poblacional (May y Krueger, 1990; Baverstock y Moritz, 1996): el modelo de aislamiento por distancia (la distancia genética aumenta con la distancia geográfica), el modelo stepping-stone (subregiones con cierto grado de aislamiento entre ellas), y el modelo panmítico, en el que la población entera puede consistir en una sola unidad poblacional abierta donde cada individuo de la población tiene la misma probabilidad de aparearse con cualquier individuo y las subregiones son arbitrarias (Waples y Gaggiotti, 2006).

Carvalho y Hauser (1994) describen que la no detección de la diferencia genética entre las poblaciones puede surgir de cinco fuentes diferentes: (1) flujo de genes suficiente para mantener la panmixia; (2) eventos de "sorteo", como el reclutamiento esporádico de áreas distantes o cercanas que pueden conducir a panmixia; (3) selección estabilizadora derivada de la exposición a ambientes similares; (4) divergencia reciente entre poblaciones, o (5) falla para detectar variantes genéticas debido a la técnica empleada o a tamaños de muestra insuficientes. Algunos pocos casos bien demostrados de panmixia se han reportado en peces. Uno de los más estudiados ha sido el de dos anguilas del Atlántico del género *Anguila*: la anguila europea (*Anguila anguila*) y la americana (*A. rostrata*). Sobre la base de las características ecológicas de la especie (dispersión larvaria aleatoria, la aparición de una sola área de desove, la escala y estabilidad temporal del entorno) se ha asumido que ambas especies poseen una estructura panmítica (Dannewitz et al., 2005; Palm et al., 2009; Als et al., 2011; Côté et al., 2012). Sin embargo, existen otros trabajos que reportan panmixia en especies de aguas profundas o demersales; el reloj del Atlántico, *Hoplostethus atlanticus* (White et al., 2009); la merluza azul, *Antimora rostrata* (White et al., 2011); y el fletán negro, *Reinhardtius hippoglossoides* del Atlántico noroccidental (Roy et al., 2014). Para México, en especies como la totoaba (*Totoaba macdonaldi*), se ha reportado también este tipo de estructura poblacional (Valenzuela-Quíñonez et al., 2016). Todos estos estudios centran sus

interpretaciones en las características de la historia de vida de la especie, los cuales tradicionalmente se han descrito en relación con la estrategia de selección r o K (White et al., 2009). Los ambientes constantes o predecibles promueven la selección K, en donde los organismos se caracterizan por un desarrollo lento, reproducción tardía, tamaño corporal más grande y una gran longevidad (White et al., 2009). Las especies demersales se caracterizan por presentar este tipo de selección que favorece fenómenos como la dispersión prolongada o comportamientos de homing (White et al., 2009; White et al., 2011; Roy et al., 2014). Estos ejemplos resaltan la importancia de analizar los datos moleculares junto con características de la historia de vida (Carvalho y Hauser, 1994).

2.2 El Bacalao negro

El Bacalao Negro o Pez Sable *Anoplopoma fimbria* (Pallas, 1814), es una especie demersal que se distribuye en la plataforma continental del Pacífico Norte, desde Baja California, México hasta Alaska y Mar de Bering, y en las costas de Kamchatka, Rusia hasta la isla de Hokkaido, Japón (Fig. 1) y su distribución batimétrica se estructura por edades y tallas, obedeciendo a procesos reproductivos, la cual va desde la zona demersal costera hasta la oceánica (0 - 2740 m) (Hart, 1973; Morita et al., 2012). El bacalao negro es altamente migratorio a lo largo de su vida, se reconocen dos patrones migratorios para la especie: 1) Vertical, sobre la pendiente continental, a través de planicies abisales a los montes submarinos, los juveniles permanecen cerca de la costa varios años, moviéndose a aguas profundas para unirse a la población reproductora conforme maduran (Mason et al., 1983; McFarlane y Beamish, 1992; Maloney y Sigler, 2008) y 2) latitudinal, a lo largo de la pendiente continental, que puede extenderse desde el estrecho de Bering hasta el Sur de California en ambas direcciones (McFarlane y Beamish, 1990; Kimura et al., 1998). No se conoce si esta especie muestra un comportamiento de homing (fidelidad al sitio de desove) y se han reportado distancias de tránsito superiores 926 km (Head et al., 2014). Por ejemplo, en Alaska, el 11% de los peces marcados se han recuperado en lugares a más de 2,000 km de sus sitios de liberación. Sin embargo, las distancias de migración en esta especie aún es un tema de amplio debate, dado que hay datos de marcado del bacalao negro que indican que los organismos no se mueven grandes distancias durante la temporada de desove (Echave et

al., 2012; Rodgveller et al., 2018). Lamentablemente, no se cuentan con estudios de marcado y recaptura en la parte más meridional de la distribución de esta especie (Rusia y México). Algunos estudios reconocen tres poblaciones en el campo de la gestión de las pesquerías en la costa noreste del Pacífico: una población del norte, que habita en aguas de la costa de Alaska y el norte de Columbia Británica; otra población separada, administrada por Canadá, frente a la Columbia Británica y una población desde el sur de Columbia Británica hasta California; esta separación se realizó basado en estudios de marcado y diferencias en crecimiento y madurez de los organismos entre estas áreas (Head et al., 2014). Sin embargo, los primeros estudios genéticos poblacionales en el bacalao negro han aportado conclusiones contradictorias, posiblemente debido al uso de diferentes técnicas aplicadas a diferentes escalas geográficas y los muestreos realizados. Si bien algunos autores han informado una débil diferenciación genética (Gharrett et al., 1982; Tripp-Valdez et al., 2012; Galván-Tirado et al., 2015), otros no han encontrado diferencias entre los sitios de recolecta, incluso evaluando ampliamente el rango de distribución de la especie (Orlova et al., 2014, 2019; Jasonowicz et al., 2017) y con métodos modernos de secuenciación masiva de última generación (Jasonowicz et al., 2017). En la Tabla I, se muestra un resumen de la bibliografía encontrada referente a estudios poblacionales de *Anoplopoma fimbria*, en la cual se resalta el área geográfica de estudio, tipo y número de marcadores, información biológica y/o ecológica para apoyar los resultados y si se encontró o no diferencias genéticas entre poblaciones. En general, estos hallazgos sugieren una estructura de población panmíctica.

Tabla I. Revisión bibliográfica sobre la estructura genético poblacional del bacalao negro (*Anoplopoma fimbria*).

| Tipo de documento | Autores | Año | Área geográfica | Tipo y número de marcadores | Estructura poblacional | Información de apoyo |
|--------------------------|----------------------|------------|---|--|---|---|
| Artículo | Gharrett et al. | 1983 | 6 sitios. Mar de Bering hasta California | Aloenzimas | Dos poblaciones distintas: A. Mar de Bering, Islas Aleutianas, Golfo de Alaska y B. Costas de Columbia Británica y California, Estados Unidos | Condiciones oceanográficas |
| Artículo | Tripp-Valdéz et al. | 2012 | 4 sitios. Mar de Bering, Golfo de Alaska , Oregón y México | ADN mitocondrial Citocromo oxidasa I (COI) y cuatro loci microsatélites especie-específicos | Mar de Bering, Golfo de Alaska y Oregón son diferentes respecto a México | Morfometría geométrica |
| Artículo | Orlova et al. | 2014 | 8 sitios. Parte central de la isla Honsu hasta sur de California | COI y región control (D-Loop) del ADN mitocondrial | Panmixia | Eventos paleoclimáticos |
| Artículo | Galván-Tirado et al. | 2015 | México y Canadá | 2 genomas mitocondriales completos Polimorfismos de un simple nucleótido (SNP) obtenidos mediante secuenciación de última generación (NGS) | No datos | No datos |
| Artículo | Jasonowicz et al. | 2017 | 11 sitios desde las Islas Aleutianas hasta California, EU | 4 loci microsatélites especie- específicos obtenidos mediante secuenciación de última generación (NGS) | Panmixia | Variables ambientales e información demográfica |
| Tesis | Orozco-Ruiz | 2017 | Tres sitios: Rusia, California y México | 4 loci microsatélites obtenidos mediante secuenciación de última generación (NGS) | Panmixia | No datos |
| Artículo | Orlova et al. | 2019 | 5 sitios desde la Costa Rusa, pasando por Islas Aleutianas hasta California, EU | COI y región control (D-Loop) del ADN mitocondrial | Panmixia | Eventos paleoclimáticos |

2.3 Marcadores moleculares

La subdivisión de la población resulta de procesos como la reducción de la migración, que en general afectan a todos los genes de la misma manera, así como a procesos específicos del locus como la recombinación, la selección y la mutación que se limitan a regiones específicas del genoma (André et al., 2011). Un marcador molecular es un locus (posición específica en el ADN) que puede ser analizado de forma fácil en un amplio número de individuos y que se considera representativo de los procesos evolutivos de todo el genoma (Awise, 1994). Dos tipos de ADN son generalmente empleados: el ADN nuclear (ADNn) y el ADN mitocondrial (ADN mt).

El ADNn se hereda biparentalmente, por tanto, proporciona datos sobre el flujo genético tanto de machos como de hembras, indicando la estructura de la población reproductora (Hellberg et al., 2002); además el uso de regiones altamente polimórficas dentro del ADNn, tales como los microsatélites, puede proporcionar un alto nivel de poder estadístico para la identificación individual, de paternidad y análisis de estructura poblacional (Awise, 2004). La importancia del uso de los marcadores microsatélites radica en la señal que detecta, ya que al poseer una alta tasa mutacional (10^{-2} a 10^{-6} mutaciones por locus por generación) permite evaluar procesos evolutivos en una escala de tiempo reciente. Contrario a los microsatélites (ADNn) el ADNmt es haploide y por su herencia uniparental, se considera un marcador selectivamente neutral que carece de recombinación y muta a una tasa relativamente alta, 0,02 sustituciones por par de bases por millón de años (Brown et al. 1979), lo que lo hace efectivo para detectar la estructura histórica o evolutiva entre las poblaciones (Awise, 1995). En este estudio se analizan dos tipos de datos de ADN mitocondrial: 1) Polimorfismos obtenidos mediante Secuenciación de Siguiete Generación (NGS, por sus siglas en inglés) (SNP's del ADNmt) y 2) polimorfismo obtenidos por secuenciación Sanger (Citocromo b (Cyt b) y la región D-Loop) en conjunto con marcadores nucleares tipo microsatélite.

A menudo la información de diferentes tipos de marcadores genéticos es combinada en los estudios de genética de poblaciones, dado que diferentes marcadores genéticos reflejan diferentes historias demográficas (Awise, 2004) y también tienen diferentes propiedades

estadísticas que afectan el grado en que pueden resolver los patrones de divergencia (Ryman et al., 2006). Por lo que la conjunción de diferentes tipos de marcadores puede darnos una visión más completa de la estructura poblacional de la especie.

3. JUSTIFICACIÓN

La falta de heterogeneidad genética significativa, en el bacalao negro, debe interpretarse con cautela ya que esta puede tener consecuencias en términos de reclutamiento y dar como resultado una sobreexplotación del recurso. Por tanto, cuando sea posible, se deben buscar fuentes adicionales de información y métodos que ayuden a soportar la hipótesis de una sola población para la especie. Aunado a esto, el bacalao negro es una especie con una amplia distribución geográfica por lo que representa un recurso biológico compartido entre Japón, Rusia, Estados Unidos, Canadá y México, lo que obliga a generar conocimiento con relación a los niveles de diferenciación genética para un manejo sustentable del recurso.

4. HIPÓTESIS

Dados los reportes de panmixia en especies de profundidad con alta capacidad de dispersión y tamaños poblacionales grandes, como el bacalao negro, se espera que, la migración gradual desde los sitios de desove, o algún nivel de redistribución periódica durante la reproducción pueden conducir a la panmixia a través de su rango geográfico de distribución, como se ha reportado para otras especies de peces demersales.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el modelo de panmixia en *Anoplopoma fimbria*, para una mejor comprensión de los procesos involucrados en la estructura poblacional de la especie.

5.2 Objetivos particulares

5.2.2 Evaluar la estructura genético poblacional del bacalao negro empleando 11 loci microsatélites, polimorfismos mitocondriales de un solo nucleótido (SNP's del ADNmt) y secuencias del gen Citocromo b y la región control del ADNmt.

5.2.3 Determinar la variabilidad genética en los diferentes sets de datos (microsatélites, SNPs ADNmt, Cyt b y región D-Loop del ADNmt)

5.2.4 Evaluar el poder estadístico de los loci microsatélites para rechazar la hipótesis nula de homogeneidad genética.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Obtención de las muestras

Las muestras fueron colectadas entre 2008 y 2018 de 14 diferentes localidades a lo largo de la distribución del bacalao negro (Fig. 1). El año, sitio de colecta y número de individuos colectados para cada localidad se presenta en la tabla II. Las muestras fueron obtenidas a través de la colaboración con el Dr. Alexi Orlov del Instituto de Investigación Pesquera y Oceanográfica Federal de Rusia (VNIRO por sus siglas en inglés, Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography), el Dr. Michael Canino de la NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration) y la Dra. Carmen Paniagua y Salvador Villasuso Palomares del CICESE, Ensenada.

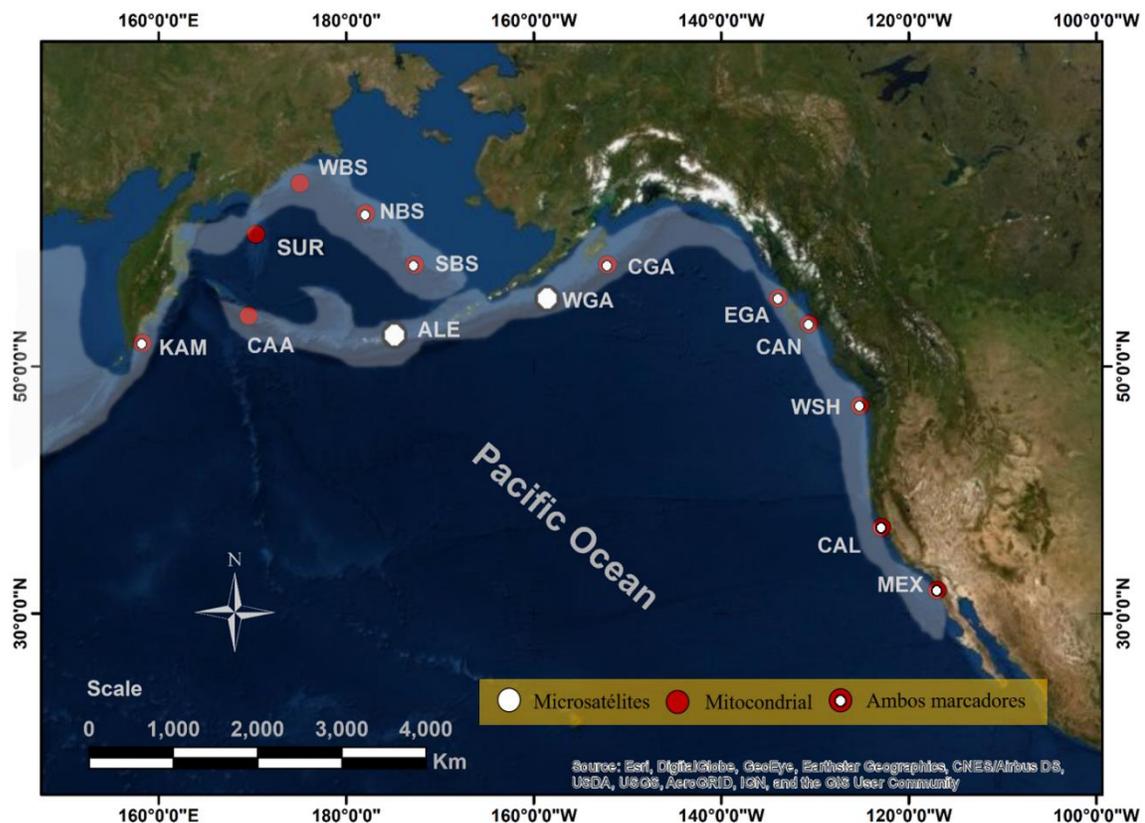


Figura 1. Mapa de los sitios de muestreo. La sombra gris indica la distribución de la especie mientras que los puntos señalan los sitios de colecta y los colores el tipo de marcador para cada localidad. Para los acrónimos e información de los sitios ver la tabla II.

Tabla II. Información de cada sitio de colecta para cada marcador empleado. El número de individuos por localidad se muestra para cada marcador.

| Área | Código | Año de muestreo | Microsatélites | Marcador | | |
|------------------------------------|------------|-----------------|----------------|----------|-------|--------|
| | | | | SNPs mt | Cyt-b | D-loop |
| Kamchatka, Rusia | <i>KAM</i> | 2011 | 30 | 8 | 10 | 14 |
| Norte del Mar de Bering | <i>NBS</i> | 2012 | 28 | 7 | 7 | 7 |
| Sur del Mar de Bering | <i>SBS</i> | 2012 | 26 | 6 | 5 | 6 |
| Oeste del Mar de Bering, Rusia | <i>WBS</i> | 2011 | | | | 5 |
| Shirshov (cresta submarina), Rusia | <i>SUR</i> | 2011 | | | | 10 |
| Commander, Islas Aleutianas | <i>CAA</i> | 2011 | | 3 | 3 | 13 |
| Islas Aleutianas | <i>ALE</i> | 2012 | 30 | | | |
| Oeste del Golfo de Alaska, USA | <i>WGA</i> | 2012 | 30 | | | |
| Centro del Golfo de Alaska, USA | <i>CGA</i> | 2012 | 30 | 8 | 8 | 8 |
| Este del Golfo de Alaska, USA | <i>EGA</i> | 2012 | 30 | 9 | 9 | 9 |
| Columbia Británica, Canadá | <i>CAN</i> | 2008 | | 8 | 15 | 12 |
| Washington, USA | <i>WSH</i> | 2012 | | 12 | 11 | 12 |
| San Francisco, California, USA | <i>CAL</i> | 2013 | 28 | 8 | 11 | 13 |
| Baja California, México | <i>MEX</i> | 2012 y 2018 | 20 | 11* | 13* | 15* |

* Muestras correspondientes al año 2012.

6.2 Microsatélites

6.2.1 Extracción de ADN y genotipificación

La extracción de ADN se realizó a partir de muestras de tejido de aleta empleando el método modificado de extracción con sales (NaCl₂) de Sambrook et al., (1989). Se amplificaron un total de 11 loci microsatélites previamente descritos para la especie (Orozco-Ruiz et al., 2018). Las condiciones de amplificación y el genotipado de los loci se realizaron siguiendo el protocolo descrito por los autores. Los productos amplificados fueron visualizados en un secuenciador ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystem®) usando GeneScan™ 600 LIZ® Size Standar v2.0 (Applied Biosystem®) y los genotipos fueron obtenidos con el software de análisis de fragmentos GeneMapper V® 5.0 (Applied Biosystems®).

6.2.2 Verificación y calibración de los loci microsatélites usados

Para asegurar la robustez de los resultados, es importante verificar que los marcadores empleados cumplan con una serie de estándares para garantizar que: 1) exista una baja frecuencia de alelos nulos, 2) que se encuentren en equilibrio de Hardy-Weinberg, 3) que los loci aporten información independiente entre ellos, y 4) que sean selectivamente neutros (Selkoe y Toonen, 2006). Para lograrlo se siguió el procedimiento que se describe a continuación:

1) Alelos nulos y errores de genotipificación

La frecuencia alelos nulos fue evaluada con el algoritmo de maximización de la expectativa de Dempster et al. (1997) con el programa FREENA (Chapuis y Estoup, 2007). También se corrió el programa MICROCHECKER V.2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004) para conocer si los alelos nulos podrían ser causados por errores en la genotipificación, presencia de tartamudeos o repeticiones (stutters), o la pérdida de alelos grandes.

2) Equilibrio de Hardy-Weinberg

Se trata de un modelo que establece que las frecuencias alélicas de una población se mantendrán constantes a lo largo de las generaciones si se cumplen condiciones de panmixia (reproducción aleatoria, y además que no haya mutación, migración ni selección (Çiftci y Okumuş, 2002)). Para evaluar si existe desviación del equilibrio Hardy-Weinberg (HW) en los sitios de colecta, se utilizó el programa ARLEQUIN V 3.5.1.2 (Excoffier y Lischer, 2010) (10,000 dememorización, 10,000 pasos en la cadena de Markov). Al valor de significancia (p), se le aplicó una corrección estadística para comparaciones múltiples usando el método FDR, False Discovery Rate (Benjamini y Hochberg, 1995).

3) Desequilibrio de ligamiento

El supuesto de segregación independiente entre los pares de loci se probó utilizando el software Genepop v.4.2 (Rousset, 2008), aplicando una prueba de Fisher bajo la hipótesis nula de independencia entre locus; (10,000 dememorización, 100 lotes, 10,000 iteraciones por lote para las cadenas de Markov).

4) Loci bajo selección

Incluir loci sujetos a selección puede distorsionar los análisis genético poblacionales (White et al., 2010). Para detectar los loci bajo posible selección, se empleó el programa

ARLEQUIN v.3.5.2.2 (Excoffier y Lischer, 2010), el cual utiliza simulaciones coalescentes para hacer una distribución nula de estadísticos de F , generando valores de probabilidad (p) para cada uno de los loci. Se utilizó el modelo finito de islas con 100,000 simulaciones y 100 repeticiones por grupo.

6.2.3 Estructura genética poblacional y diversidad genética

Se emplearon diferentes enfoques para evaluar la estructura genética. Debido a que las diferencias grandes del número de alelos entre loci microsatélites puede ocasionar problemas en la interpretación y ejecución de los análisis de estructura; se construyó una segunda base de datos retirando los *loci* Afim-10, Afim-13 y Afim-32, los cuales presentaron un mayor polimorfismo (con más de 50 alelos, ver más adelante). Para ver si existía algún efecto en los análisis al retirar los loci microsatélites, todos los análisis de estructura poblacional fueron realizados tanto para la base completa (11L) como para la base con los loci con menos de 50 alelos (8 loci, 8L).

6.2.3.1 Análisis de agrupación bayesiana

Se realizó un análisis de agrupación bayesiana implementado por el software STRUCTURE v.2.3.4 (Pritchard et al., 2000). El programa asigna a los individuos a diferentes grupos sin la necesidad de conocer a priori las unidades y/o límites poblacionales, a partir de un índice de membresía que busca maximizar el equilibrio de Hardy-Weinberg y de ligamiento gamético dentro de los grupos. Se asumió un modelo de mezcla y de frecuencias alélicas correlacionadas entre poblaciones, la opción LOCPRIOR fue usada. La ubicación de la muestra se usó como población a priori, ya que esto mejora el rendimiento del análisis cuando los valores de F_{ST} son bajos (Hubisz et al., 2009). Para cada K (grupos de 1 a 9) se corrió el análisis 10 veces para verificar la consistencia de los resultados. Posteriormente se evaluó la probabilidad acumulada y la probabilidad posterior para cada valor de K . STRUCTURE HARVESTER (Earl y VonHoldt, 2012) se utilizó para detectar el número de grupos probables; este método emplea el estadístico ΔK de Evanno et al., (2005). El servicio en línea de CLUMPAK (Kopelman et al., 2015) fue empleado para alinear los diferentes resultados obtenidos de cada una de las 10 réplicas.

6.2.3.2 Análisis Discriminante de Componentes Principales (ADCP)

El análisis discriminante de componente principales (ADCP) se realizó en los paquetes ADEGENET (Jombart, 2008) usando la plataforma R v.3.6.1 (R Core Team, 2016), mediante validación cruzada del paquete POPPR (Jombart et al., 2010). Este procedimiento permite asegurar que el número de componentes principales (CP) es el adecuado para el análisis. Este método combina la ventaja del análisis de componentes principales al no asumir equilibrio de Hardy-Weinberg o desequilibrio de ligamiento (Jombart, 2008), mientras que en análisis discriminante intenta resumir la diferenciación genética entre los grupos, omitiendo la variación dentro de los grupos (Jombart et al., 2010).

6.2.3.3 Estimaciones de diferenciación genética poblacional (F_{ST})

Una manera de conocer la estructuración genética de las especies es estudiando las frecuencias alélicas de las poblaciones propuesta por Sewall Wright (1951), mediante la estimación de los estadísticos F o correlaciones alélicas. Estos procedimientos se basan en el cálculo de frecuencia alélicas a diferentes niveles jerárquicos dentro de una población, desde el nivel de individuos considerados dentro de subpoblaciones (F_{IS}) hasta individuos en la población total (F_{IT}), pasando por las subpoblaciones dentro de la población total (F_{ST}). Se estimó F_{ST} según Weir y Cockerham (1984) por pares de localidades en el programa ARLEQUIN V 3.5.1.2 (Excoffier y Lischer, 2010) (10000 dememorización, 10000 pasos en la cadena de Markov). Sin embargo, los valores de F_{ST} han sido criticados por sus limitaciones en su uso. En teoría F_{ST} (y G_{ST} como estimador de F_{ST}) debería oscilar entre cero y uno, mientras que con loci altamente variables (gran número de alelos), el valor máximo que alcanza F_{ST} (y G_{ST}) es menor que uno (Verity y Nichols, 2014). Para superar la subestimación de los valores de F_{ST} utilizando marcadores de microsatélites altamente polimórficos, se usó el índice de fijación estandarizado (G'_{ST}) de Hedrick (2005). En el cual la magnitud de la diferenciación observada es la proporción de la diferenciación máxima posible para el nivel de homocigosidad poblacional observado. La significancia estadística fue ajustada posteriormente empleando la corrección FDR (Benjamini y Hochberg, 1995).

6.2.3.4 Aislamiento por distancia

El modelo de aislamiento por distancia examina la relación del flujo génico entre poblaciones pareadas con la distancia, partiendo del supuesto de que la diferenciación genética se incrementa con la distancia. Este modelo permite explicar posibles formas de dispersión (Goudet et al., 1994). Se probó el modelo usando un test de Mantel en el paquete ADEGENET en la plataforma de R v.3.6.1 (R Core team, 2019), para probar si existía una correlación entre las distancias geográficas con las distancias genéticas. Debido al efecto observado por el número de alelos en algunos loci sobre los valores de F_{ST} , se corrió el análisis empleando la distancia de Nei (1972), la cual mide las diferencias alélicas acumuladas por locus. Si la tasa de sustitución de genes por año es constante, está relacionada linealmente con el tiempo de divergencia entre poblaciones bajo aislamiento sexual. También se usó la distancia de Cavalli-Sforza (1967) la cual es una distancia geométrica, que refleja la similitud entre poblaciones con respecto a las frecuencias alélicas que se presentan en determinado sistema.

Las distancias geográficas en kilómetros se obtuvieron midiendo la distancia lineal entre cada par de sitios de recolecta usando una calculadora en línea (<https://es.planetcalc.com/73/>) la cual toma en cuenta la curvatura de la tierra empleando las fórmulas de Vincenty (1975).

6.2.3.5 Análisis Molecular de Varianza (AMOVA)

AMOVA es un procedimiento heurístico que permite la división jerárquica de la variación genética asociado con posibles niveles de estructura genética, dentro y entre individuos, poblaciones (localidades) y grupos (poblaciones genéticas) (Peakall y Smouse, 2012). Para estimar la repartición de la variabilidad genética entre localidades muestreadas se realizó un AMOVA en el programa GenAlex (Peakall y Smouse, 2012), con 9999 permutaciones.

Se evaluaron 5 hipótesis para determinar la estructura genética de la especie, las cuales se basaron en la hipótesis de estructura actual propuesta para la especie (hipótesis 1), los resultados obtenidos en el presente trabajo (hipótesis 2) y la distribución de los stocks de manejo mencionados en Head et al., (2014) (hipótesis 3, 4 y 5):

- *Hipótesis 1:* Considerando a todas las localidades como una sola población panmíctica.
- *Hipótesis 2:* 2 grupos, basados en las poblaciones encontradas por STRUCTURE y DAPC.
- *Hipótesis 3:* 3 grupos. Un grupo conformado por MEX, un segundo grupo integrado por las localidades de CAL a KAM excluyendo a las localidades del Mar de Bering (NBS y SBS) las cuales conforman un tercer grupo.
- *Hipótesis 4:* 2 grupos. Un grupo conformado por MEX Y CAL y un segundo grupo formado por el resto de las localidades desde EGA hasta KAM.
- *Hipótesis 5:* 3 grupos. Un grupo conformado por MEX y CAL, un segundo grupo que incluye a las localidades desde EGA a KAM excluyendo a las localidades del Mar de Bering las cuales conforman un tercer grupo.

6.2.3.6 Diversidad genética

Se empleó la base de datos completa (11L) para evaluar la diversidad genética. Se obtuvieron los valores de heterocigosidad observada (H_O) y esperada (H_e) con el paquete hierfstat (Goudet y Jombart, 2015) en la plataforma R v.3.6.1 (R Core team, 2019) y para probar diferencias en la diversidad genética entre las localidades y poblaciones, se realizó la prueba de Wilcoxon en R v.3.6.1 (R Core team, 2019). Se estimó también la riqueza alélica (R_A) y la riqueza de alelos privados (R_{AP}) usando el programa HP-Rare para corregir el efecto del tamaño de muestra desigual (Kalinowski, 2005)

6.2.4 Poder estadístico

Se empleó el programa POWSIM 4.1 (Ryman et al., 2006) para evaluar el poder estadístico de los loci microsatélites para rechazar la hipótesis nula de homogeneidad genética. Se evaluaron cuatro niveles diferentes de divergencia genética: $F_{ST} = 0.001$, 0.0025, 0.005 y 0.01; las simulaciones se llevaron a cabo con base en un tamaño de población efectivo (N_e) de 5000 y se realizaron 1000 réplicas. Debido a que POWSIM no admite loci con más de 50 alelos, 3 loci se eliminaron de la base de datos (Afim-10, Afim-13 y Afim-32). Dos de estos loci, Afim-10 y Afim-13, presentaron también desviaciones significativas del equilibrio de HW.

6.3 ADN mitocondrial

6.3.1 Polimorfismos mitocondriales obtenidos por NGS (SNPs, del ADNmt)

Si bien la generación de las librerías y el genotipado de SNPs no formó parte del presente trabajo, aquí se menciona brevemente el protocolo para su obtención.

Se usó un conjunto de 80 individuos para desarrollar el protocolo. Se intentó amplificar por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa por sus siglas en inglés) todo el mitogenoma diseñando dos conjuntos de cebadores (Anexo A), pero solo se logró un tamaño de fragmento (amplicón) de 4505 pb que incluye tres genes (12S, 16S y Cyt b), cuatro tRNA (ARN de transferencia: Phe, Val, Thr y Pro) y la región de control (D-loop). La amplificación se realizó en una mezcla de reacción con un volumen total de 10 μ l que contenía 1x tampón de reacción de phire, dNTP's 200 mM, 0.5 mM de cada cebador (Afim-Cb y Afim-16S), 0.5 U Phire hot start II DNA polymerase (ThermoFisher) y 50 ng de ADN total. Las condiciones de PCR fueron 45 s de desnaturalización inicial a 98 ° C, seguidas por 35 ciclos de desnaturalización de 8 s a 98 ° C, un paso de alineamiento de 10 s a 63 ° C y un paso de extensión de 4 min a 72 ° C, además de un tiempo de extensión final de 8 min a 72 ° C. Para construir la librería, todos los amplicones se purificaron utilizando el sistema de purificación de PCR Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Pasadena, CA), y se cuantificaron en un nanodrop Thermo Scientific NanoDrop TM 8000 (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, EUA). La construcción de la biblioteca de secuenciación se realizó con 100-200 ng de amplicón de

PCR, siguiendo la guía de preparación de muestras Nextera XT (Illumina, San Diego, CA) que usa transposoma para fragmentar el ADN y agregar simultáneamente secuencias de códigos de barras y adaptadores. Las bibliotecas agrupadas y con código de barras se secuenciaron posteriormente en la plataforma Illumina MiSeq 2x250 pb utilizando el cartucho MiSeq Reagent Kit V3 (150 ciclos PE) (Illumina, EE. UU.). Las lecturas sin procesar se evaluaron para la calidad con FastQC (Lo y Chain, 2014) y los adaptadores y las secuencias de baja calidad se recortaron antes de que las lecturas se ensamblaran con el banco de trabajo genómico CLC workbench (QIAGEN®). Se eliminaron los contigs con una profundidad inferior a la media de 10x. Luego, todos los análisis de datos posteriores, incluido el control de calidad y las llamadas de variantes, se realizaron en la aplicación BaseSpace Illumina. Los contigs se evaluaron con FastQC (Lo y Chain, 2014), luego se alinearon con un genoma de referencia (Galván-Tirado et al., 2015) usando BWA v0.6.2 (Li y Durbin, 2009). Los SNP's fueron llamados con SAM tools v0.1.18 (Li et al., 2009), aquellos con una calidad < 10 fueron descartadas.

Las regiones amplificadas y la posición de los polimorfismos obtenidos respecto al genoma mitocondrial de la especie (GenBank ID: KP777542.1), se presenta en la figura 2.

6.3.2 Citocromo b (Cyt-B) y Región Control (D-loop)

Usando la secuenciación Sanger se obtuvieron dos fragmentos. El fragmento del Cyt b se amplificó con los cebadores BC CyTB y la región control empleando BC D-LOOP (Anexo A). Las reacciones de PCR se realizaron para ambos genes en un volumen de reacción de 30 μ l con 50 ng de ADN total, tampón 1 \times , $MgCl_2$ 2 mM, dNTP 0.08 mM, 0.1 mM de cada cebador y 0.03 U/ μ l Platinum™ Taq DNA Polimerasa. El ciclo de PCR consistió en 5 min a 94 ° C, seguido de 30 ciclos de 1 min cada uno a 94 ° C, 1 min a 57°C para D-loop y a 65 ° C para Cyt b (temperatura de alineamiento), 3 min a 72 ° C; y con una extensión final de 10 min a 72 ° C. Los productos de PCR obtenidos se enviaron para su purificación y secuenciación a Macrogen, Seúl-Corea (<https://www.macrogen.com/en/>).

Las secuencias fueron editadas para obtener secuencias consenso y se alinearon con Clustal W, implementado en el programa MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013). Las secuencias de ambas regiones mitocondriales fueron comparadas con las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank para su identificación molecular utilizando la herramienta BLAST. Adicionalmente se recuperaron secuencias correspondientes a la región control del bacalao negro. A continuación, se proporcionan los números de acceso de las secuencias de la base de datos del GenBank: CAA (MG872349–MG872378), SUR (MG872401–MG872451) y WBS (MG872452–MG872462). Se añadió también a cada conjunto de datos la región correspondiente (Cyt b y D-loop) amplificada mediante NGS. Obteniendo así un total de 92 individuos para Cyt b y 124 para D-loop.

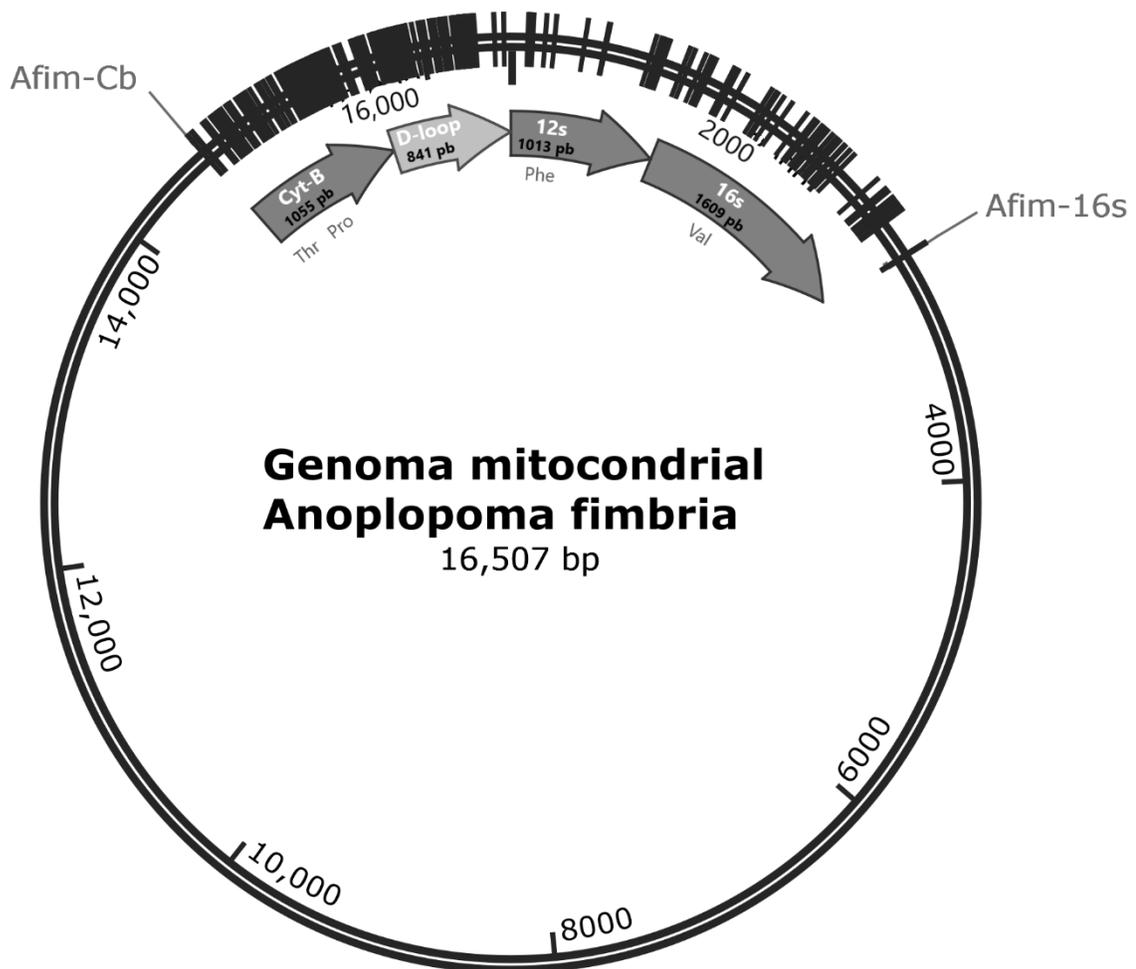


Figura 2. Genoma mitocondrial de *Anoplopoma fimbria*. El círculo representa la secuencia mitocondrial completa reportada previamente y disponible en GenBank (ID: KP777542.1). Al interior, las flechas gruesas representan los genes amplificados por secuenciación de última generación (NGS), el tamaño y nombre correspondiente a cada fragmento se encuentran al interior de las flechas. Los ARN de transferencia amplificados se presentan al exterior del fragmento y los cuales se encuentran al inicio de cada gen. Sobre la secuencia mitocondrial completa (líneas perpendiculares) se muestra la posición de cada polimorfismo recuperado, así como los cebadores empleados. SnapGene® software (De GSL Biotech; disponible en snapgene.com).

6.3.3 Estructura genética poblacional y diversidad genética

Para los dos tipos de datos mitocondriales (SNPs mt, y Cyt b y D-loop) se realizaron los siguientes análisis:

6.3.3.1. Red haplotípica

Para evaluar la distribución espacial de los haplotipos muestreados, se generó una red de haplotipos mediante el algoritmo *Median Joining* en el programa NETWORK 4.6.1.3 (Bandelt et al., 1999).

6.3.3.2 Estimaciones de diferenciación genética poblacional (F_{ST})

Se calcularon los niveles de diferenciación genética entre los sitios de recolecta mediante F_{ST} por pares de localidades en el programa ARLEQUIN v 3.5.1.2 (Excoffier y Lischer, 2010) (10000 dememorización, 10000 pasos en la cadena de Markov). La significancia estadística se ajustó posteriormente empleando la corrección FDR (Benjamini y Hochberg, 1995).

6.3.3.3 Análisis Molecular de Varianza (AMOVA)

Se evaluó la repartición de la variabilidad genética entre localidades muestreadas, para esto se realizó un AMOVA en el programa GenAlex (Peakall y Smouse, 2012), con 9999 permutaciones. Para los dos tipos de datos mitocondriales (SNP's ADN mt, Cyt b, D-Loop) se analizaron las mismas cinco hipótesis de agrupamiento empleadas con la base de datos de microsatélites. Ya que la base correspondiente a D-loop tenía un mayor tamaño de muestra (12 localidades, 124 secuencias), se analizaron cinco hipótesis adicionales, en las cuales México se puso a prueba como una población independiente (hipótesis A1 y A2), basado en los resultados obtenidos con microsatélites, y se analizó también en conjunto con tres principales grupos puestos a prueba, las costa este y oeste, y el Mar de Bering (hipótesis A3, A4 y A5) basado en la hipótesis propuesta por Orlova (2014, 2019) de dos grandes grupos a cada lado del Pacífico.

- *Hipótesis A1*: 3 grupos. Uno formado por SUR, WBS, NBS, SBS, un segundo grupo desde KAM A CAL y MEX como un grupo aparte.
- *Hipótesis A2*: 3 grupos. Uno formado por KAM, CAA, SUR, WBS, NBS, SBS; un segundo grupo con las localidades CGA, EGA, CAN, WSH, CAL y MEX como un grupo aparte.
- *Hipótesis A3*: 2 grupos. Un grupo formado por KAM, CAA, SUR, WBS, NBS, SBS; y un segundo grupo formado por CGA, EGA, CAN, WSH, CAL y MEX.
- *Hipótesis A4*: 3 grupos. Uno formado por KAM y CAA, un segundo que incluye a NBS, SBS, SUR y WBS, y tercero grupo formado por CGA, EGA, CAN, WSH, CAL, MEX
- *Hipótesis A5*: 3 grupos. Uno formado por KAM, CAA, SUR, WBS, otro grupo formado por NBS y SBS, y un grupo formado por CGA, EGA, CAN, WSH, CAL, MEX.

6.3.3.4 Diversidad Genética

Para evaluar la diversidad genética al interior de las localidades se estimó el número de haplotipos por localidad (H) así como la diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π) empleando el programa DnaSP 6.12.01 (Rozas et al., 2017).

7. RESULTADOS

7.1 Microsatélites

Se obtuvo un total de 252 individuos genotipificados con 11 loci microsatélites pertenecientes a nueve localidades (2 772 genotipos). El porcentaje de genotipificación por locus fue de 82.54% (Afim-13) a 100% (Afim-1). Porcentajes similares se obtuvieron por localidad, los cuales fueron de 80.90% (México) a 99.70 % (Centro del Golfo de Alaska) (Tabla III).

Tabla III. Porcentaje de amplificación total de la base de datos, el porcentaje por locus (A) y por localidad (B).

| Locus | A | Localidad | B |
|---------------|----------|----------------------------|---------------|
| Afim14 | 94.05 | Rusia | 90.30 |
| Afim1 | 100.00 | Norte Mar de Bering | 98.48 |
| Afim21 | 98.81 | Sur Mar de Bering | 96.85 |
| Afim23 | 97.62 | Islas Aleutianas | 98.79 |
| Afim17 | 94.84 | Este del Golfo de Alaska | 97.88 |
| Afim10 | 92.86 | Centro del Golfo de Alaska | 99.70 |
| Afim9 | 99.60 | Oeste del Golfo de Alaska | 99.09 |
| Afim28 | 89.29 | California | 89.61 |
| Afim13 | 82.54 | México | 80.90% |
| Afim32 | 98.81 | Total | 95.17% |
| Afim5 | 98.41 | Amplificación | |

7.1.1 Verificación y calibración de los loci microsatélites

No se encontraron errores en la genotipificación para ningún sitio, ni loci bajo desequilibrio de ligamiento. El programa ARLEQUIN detecto un solo locus bajo posible selección (Anexo B). Sin embargo, al remover el locus de la base de datos, ni las estimaciones de estructura ni de diversidad genética se vieron afectadas por lo que se decidió conservarlo en la base de datos. Los loci Afim-10 y Afim-13 presentaron la mayor proporción de desviaciones significativas de HW (7 de 9 localidades). Solo el locus (Afim-10) presentó una frecuencia de alelos nulos alta (>0.2) según el criterio de Chapuis y Estoup (2007) para una localidad, mientras que el resto de los loci fueron frecuencias de medias a bajas sin concentrarse en una localidad o locus en particular (Anexo C).

7.1.2 Estructura genética poblacional y diversidad genética

7.1.2.1 Análisis de agrupación bayesiana

Los análisis de STRUCTURE HARVESTER revelaron que la mejor K para ambas bases de datos (11L y 8 L) fue $K = 2$ (Anexo D y E, respectivamente), la cual separa a México del resto de los sitios de colecta con una asignación promedio del 99% a un solo grupo. El gráfico de las probabilidades de membresía obtenidos para la base 11L se muestran en la Figura 3.

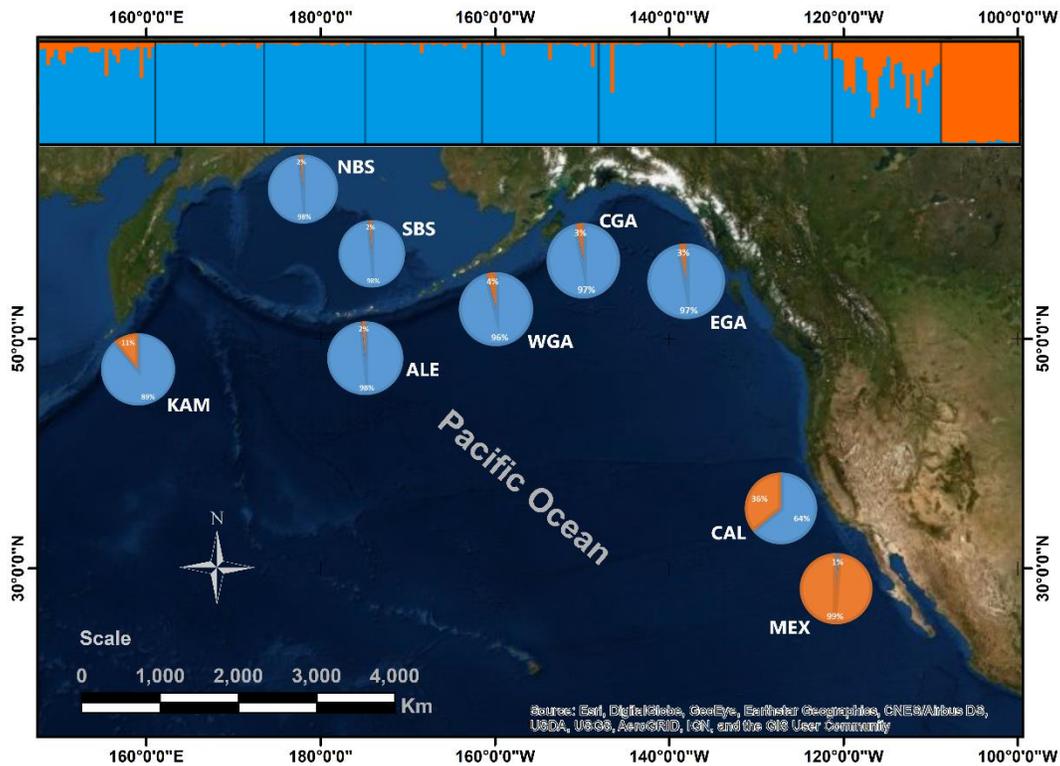


Figura 3. Estructura de la población inferida por el software STRUCTURE basado en análisis de ADN de 11 microsatélites para *Anoplopoma fimbria*. El valor óptimo delta K fue 2 (DeltaK = 8.4734, Media LnP (K) -11591.350000). En la parte superior de la figura el gráfico arrojado por CLUMPAK en la que cada barra vertical representa un individuo y el eje Y indica el porcentaje estimado de los individuos para cada grupo inferido (K) los cuales son representados con un color distinto (Naranja y Azul). Para los acrónimos e información de los sitios ver la tabla I

7.1.2.2 Análisis Discriminante de Componentes Principales (ADCP)

Al igual que con el criterio de agrupación bayesiana, el ADCP reveló dos grupos de datos discretos. México se diferenció del resto de los sitios, tanto para la base de datos de 8L como para la de 11L (Fig. 4, Anexo F resultados 8L). En el gráfico México se separó a lo largo del primer eje componente principal, mientras que en el segundo eje se observó un bajo grado de diferenciación genética.

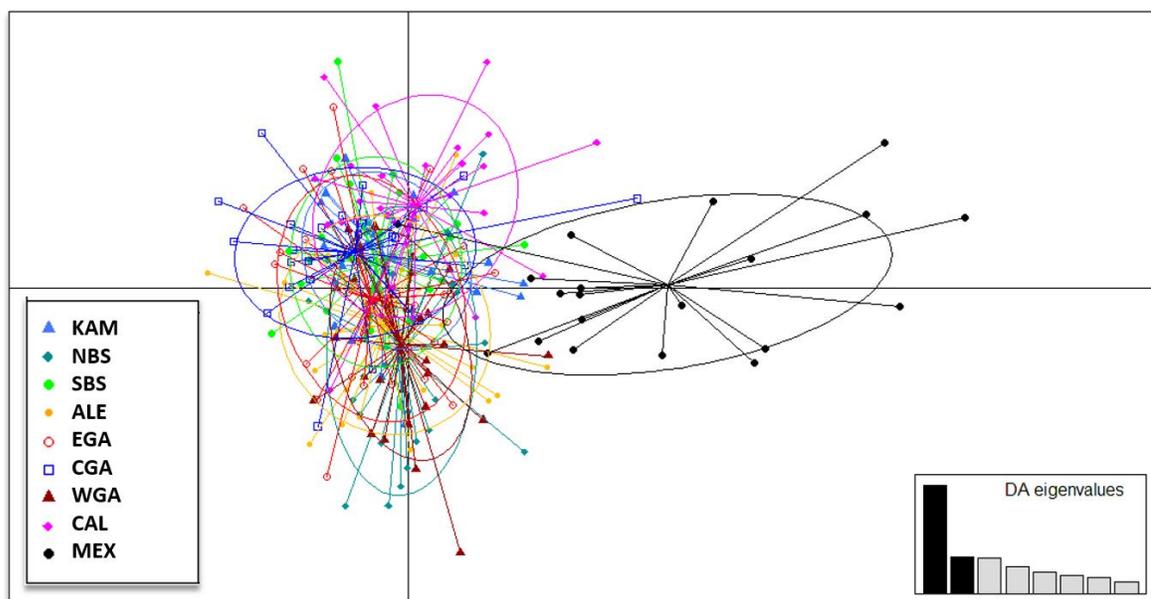


Figura 4. Diagrama de ordenación a partir del Análisis Discriminante de Componentes Principales (ADCP) empleando la base 11L para *Anoplopoma fimbria* (Número de componentes retenidos, PC: 80; Número de discriminantes, DA: 8; proporción de varianza conservada: 0.861). Los sitios de colecta se muestran con diferentes colores y estilo de puntos. Los puntos representan individuos y el recuadro inferior derecho muestra los valores propios (eigenvalues) de los ocho componentes de mayor magnitud resaltando en negro los usados para realizar los gráficos. Para los acrónimos e información de los sitios ver la tabla II.

7.1.2.3 Estimaciones de diferenciación genética poblacional (F_{ST})

Los valores de F_{ST} pareados fueron bajos tanto para la base 11L como para la base 8L, los cuales variaron de 0 a 0.023. Mientras que la base 11L no mostró ninguna comparación significativa (Anexo G), en la base 8L se observaron valores significativos entre CAL y ALE, pero la mayoría de las comparaciones que involucraron a México fueron relativamente más

altas y altamente significativas (Tabla IV). Los valores de las comparaciones pareadas empleando G'_{ST} fueron, como se esperaba, más altos que los valores obtenidos para F_{ST} ; variando de 0 a 0.155 (8L, Tabla IV; 11L, Anexo G).

Tabla IV. Valores de F_{ST} obtenidos con 8 loci microsatélites para *Anoplopoma fimbria*. Diagonal inferior F_{ST} , diagonal superior G'_{ST} (Hedrick, 2005). En negritas las comparaciones significativas. Para los acrónimos e información de los sitios ver la tabla II.

| | MEX | CAL | WBS | CGA | EGA | ALE | SBS | NBS | KAM |
|------------|---------------|---------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| MEX | | 0.1033 | 0.0998 | 0.0768 | 0.1112 | 0.0950 | 0.1165 | 0.1132 | 0.1053 |
| CAL | 0.0212 | | 0.0263 | 0.0128 | 0.0264 | 0.0461 | 0.0064 | 0.0311 | 0.0268 |
| WBS | 0.0205 | 0.0054 | | 0.0182 | 0.0169 | 0.0095 | -0.0006 | 0.0010 | -0.0024 |
| CGA | 0.0158 | 0.0026 | 0.0038 | | 0.0272 | 0.0116 | 0.0252 | 0.0224 | 0.0237 |
| EGA | 0.0228 | 0.0054 | 0.0035 | 0.0056 | | 0.0096 | 0.0222 | -0.0029 | 0.0259 |
| ALE | 0.0195 | 0.0095 | 0.0020 | 0.0024 | 0.0020 | | 0.0271 | -0.0006 | 0.0109 |
| SBS | 0.0239 | 0.0013 | -0.0001 | 0.0052 | 0.0046 | 0.0056 | | -0.0073 | -0.0004 |
| NBS | 0.0233 | 0.0064 | 0.0002 | 0.0046 | -0.0006 | -0.0001 | -0.0015 | | 0.0055 |
| KAM | 0.0216 | 0.0055 | -0.0005 | 0.0049 | 0.0053 | 0.0022 | -0.0001 | 0.0011 | |

7.1.2.4 Aislamiento por distancia

La prueba de Mantel empleando todas las localidades mostró una correlación positiva de las distancias geográficas (en Km) y las distancias genéticas para ambas distancias calculadas: Cavalli-Sforza: $R^2 = 0.607$ y $p = 0.011$; Nei $R^2 = 0.636$ y $p = 0.005$ (Fig. 5A y B respectivamente; mismos resultados para 8L en Anexo H).

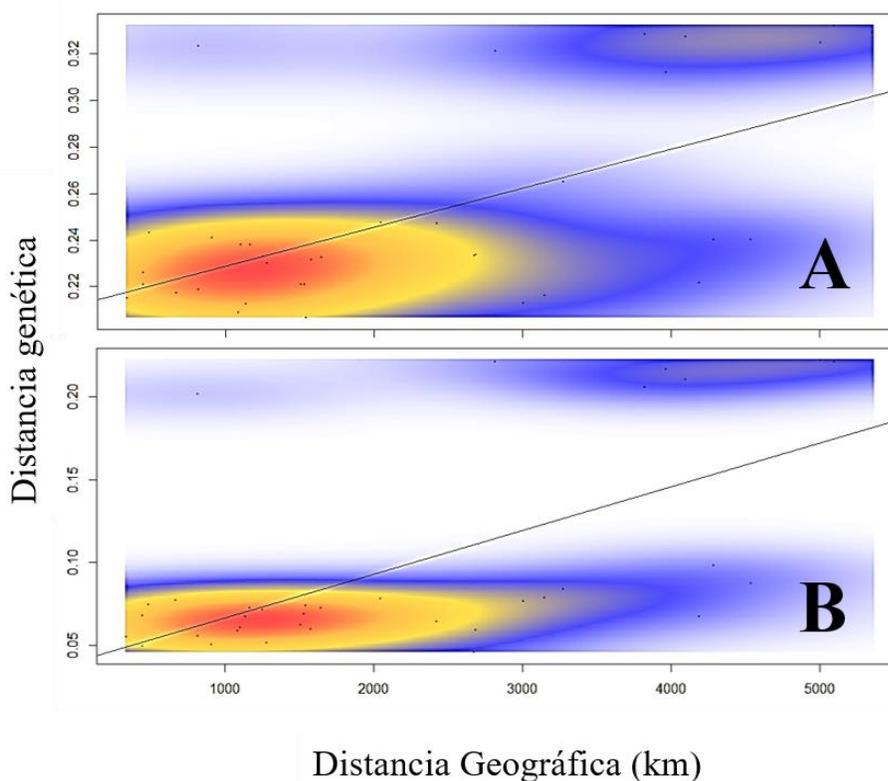


Figura 5. Aislamiento por distancia en *Anoplopoma fimbria*. Gráfico correspondiente a la base 11L. En el eje X las distancias geográficas (km) y en el eje Y la distancia genética. La línea negra continua representa la línea de regresión entre la distancia geográfica y la genética. El gradiente de color de azul claro a rojo indica la densidad de los puntos que también se muestran en el fondo del gráfico. A) Distancia Cavalli-Sforza, B) Distancia de Nei.

7.1.2.5 Análisis Molecular de Varianza (AMOVA)

El análisis de varianza molecular (AMOVA) mostró que la mayor parte de la varianza genética en cada uno de las hipótesis probadas se encontró dentro de los individuos, los cuales variaron entre 83 y 85% de la varianza total (algo menor, 79 a 82% para la base 8L, Anexo I). De las hipótesis probadas, la hipótesis 2 presentó la mayor varianza 5% para la diferenciación entre grupos para ambas bases de datos. Todos los estadísticos F fueron significativos ($p < 0.05$) tanto a nivel de individuos como entre poblaciones y grupos (11L, Tabla V; 8L Anexo I).

Tabla V. Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) realizado con 11 loci microsatélites para *Anoplopoma fimbria*. Porcentaje de variación de diferentes niveles jerárquicos de las hipótesis puestas a prueba. Para los acrónimos e información de los sitios ver la tabla II.

| Estructura analizada | Fuente | df | % | Estadístico F | P |
|---|---------------------|-----------|----------|----------------------|----------|
| Hipótesis 1 Panmixia | Entre Pops | 8 | 2% | | |
| | Dentro Pops | 495 | 98% | | |
| | Total | 503 | 100% | 0.022 | 0.000 |
| Hipótesis 2 2 grupos 1)MEX 2) CAL A KAM y Mar de Bering (SBS y NBS) | Entre grupos | 1 | 5% | 0.047 | 0.000 |
| | Entre Pops | 7 | 1% | 0.014 | 0.000 |
| | Dentro Pops | 495 | 94% | 0.06 | 0.000 |
| | Total | 503 | 100% | | |
| Hipótesis 3 3 grupos 1) MEX 2)CAL-KAM 3) Mar de Bering (SBS y NBS) | Entre grupos | 2 | 1% | 0.014 | 0.000 |
| | Entre Pops | 6 | 1% | 0.015 | 0.000 |
| | Dentro Pops | 495 | 97% | 0.028 | 0.000 |
| | Total | 503 | 100% | | |
| Hipótesis 4 2 grupos 1): KAM A EGA y Mar de Bering 2): CAL Y MEX | Entre grupos | 1 | 3% | 0.029 | 0.000 |
| | Entre Pops | 7 | 1% | 0.011 | 0.000 |
| | Dentro Pops | 495 | 96% | 0.04 | 0.000 |
| | Total | 503 | 100% | | |
| Hipótesis 5 3 grupos 1): Mar de Bering (SBS y NBS) 2): KAM A EGA 3): MEX-CAL | Entre grupos | 2 | 1% | 0.015 | 0.000 |
| | Entre Pops | 6 | 1% | 0.012 | 0.000 |
| | Dentro Pops | 495 | 97% | 0.027 | 0.000 |
| | Total | 503 | 100% | | |

7.1.2.6 Diversidad genética

Para la base de datos completa (11L) la H_O por localidad vario entre 0,59 y 0,71 mientras que la H_E vario poco con valores de entre 0,70 y 0,74 (Fig. 6a y b). Por otra parte, los valores H_O y H_E fueron similares entre poblaciones ($H_O= 0.651$ Pacífico norte y $H_O= 0.712$ México; $H_E = 0.722$ Pacífico norte y $H_E = 0.748$ México) (Fig. 5c y d). No se encontraron diferencias significativas en H_E y H_O ni por localidad ni entre poblaciones genéticas una vez aplicada la corrección FDR. Los índices de diversidad por locus se muestran en el Anexo C.

Se observó también poca variación en la R_A (7.00 a 7.4) entre localidades mientras que R_{AP} presento valores de entre 0.79 a 2.71 siendo México la localidad con el valor más alto (Tabla VI).

Tabla VI. Riqueza Alélica (R_A) y Riqueza de alelos privados (R_{AP}) para cada localidad y población genética de *Anoplopoma fimbria*. Para los acrónimos e información de los sitios ver la tabla II.

| | Localidades | | | | | | | | | Poblaciones | |
|----------|-------------|------|------|------|------|------|------|-----|------|----------------|------|
| | KAM | NBS | SBS | ALE | EGA | CGA | WGA | CAL | MEX | Pacífico Norte | MEX |
| R_A | 7.04 | 7.07 | 7 | 7.34 | 7.11 | 7.13 | 7.29 | 6.9 | 7.46 | 7.32 | 7.46 |
| R_{AP} | 0.85 | 0.88 | 0.87 | 1.07 | 1.05 | 0.79 | 1.16 | 1 | 2.71 | 4.69 | 4.83 |

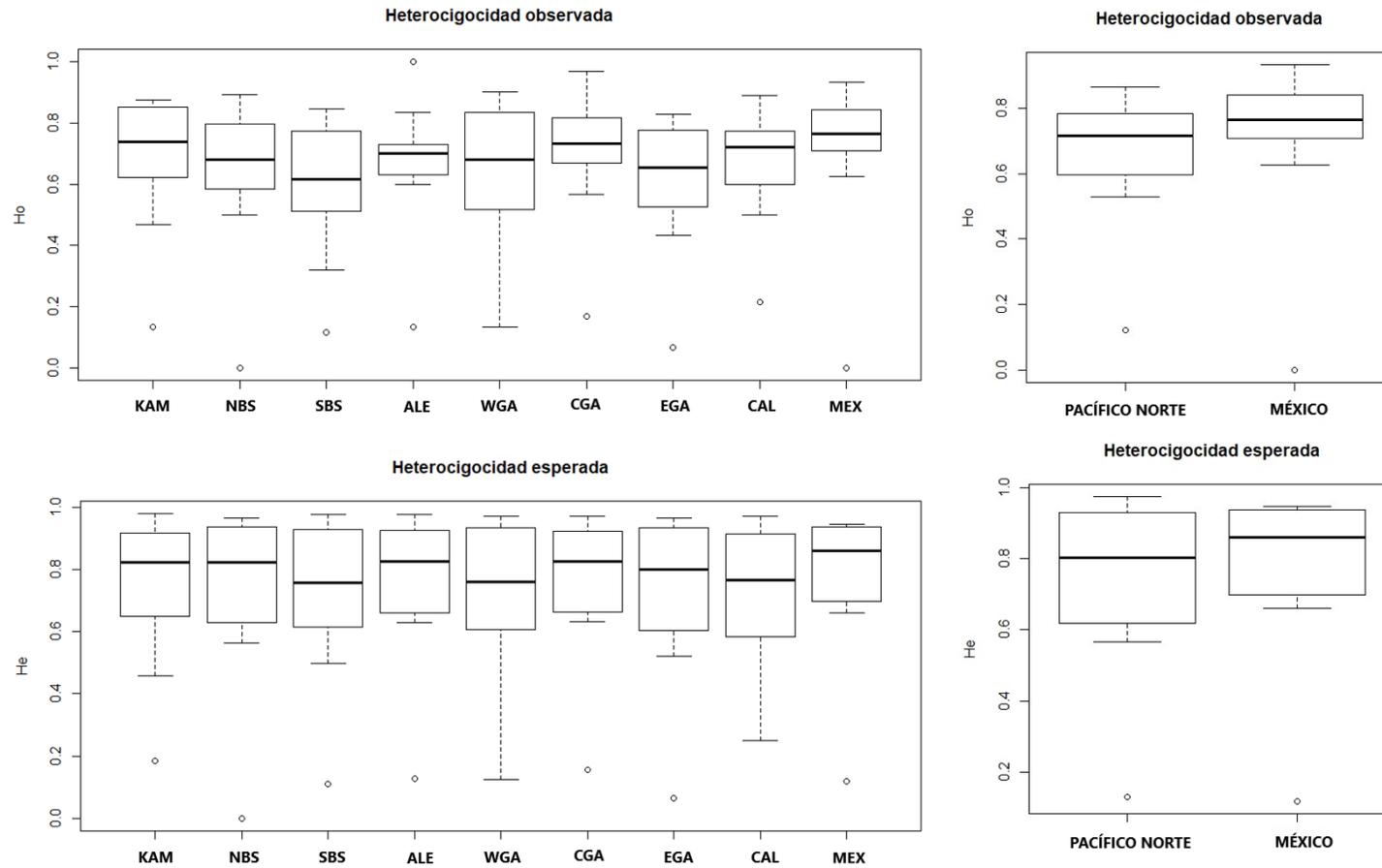


Figura 6. Índices de diversidad genética. Heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e), por localidad (a y b) y por población genética (c y d) de *Anoplopoma fimbria*. Para los acrónimos e información de los sitios ver la tabla II.

7.1.3 Poder estadístico

El análisis de poder estadístico mostró que los tamaños de muestra empleados en este análisis y los 8 loci microsátélites son adecuados para detectar F_{ST} tan pequeños de 0.0050 con una alta probabilidad (> 0.9) (Fig. 7).

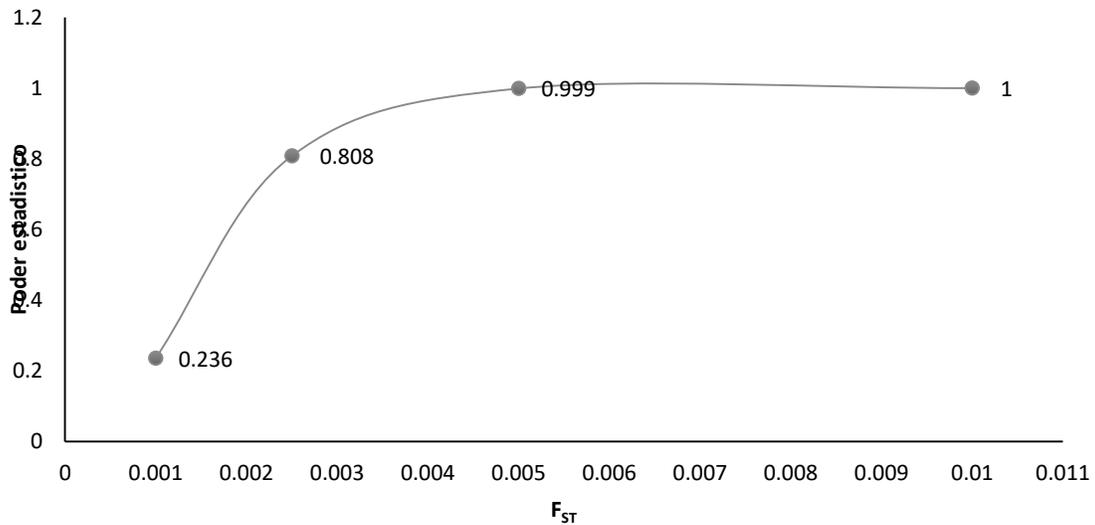


Figura 7. Potencia estadística simulada para obtener resultados significativos en las pruebas de diferenciación genética que involucran 8 loci microsátélites y los tamaños de muestra utilizados en este estudio para *Anoplopoma fimbria*. Se muestra en el gráfico para cada valor de F_{ST} la proporción de pruebas que fueron significativas a $p < 0.05$.

7.2. Mitochondrial

7.2.1 Estructura genética poblacional y diversidad genética

7.2.1.1 Red de haplotipos

7.2.1.1.1 Polimorfismos mitocondriales de un solo nucleótido (SNP's, ADNmt)

La red de haplotipos indicó una estructura genética conformada por 75 haplotipos con baja frecuencia que no se segregan espacialmente. Solo tres haplotipos se encontraron en más de una localidad (Fig. 8). Sin embargo, los haplotipos de baja frecuencia permitieron la conformación de tres haplogrupos, cada uno separado por varios pasos mutacionales (9 a 11 pasos). Estos haplogrupos se designaron con las letras mayúsculas: A, B y C (Fig. 8).

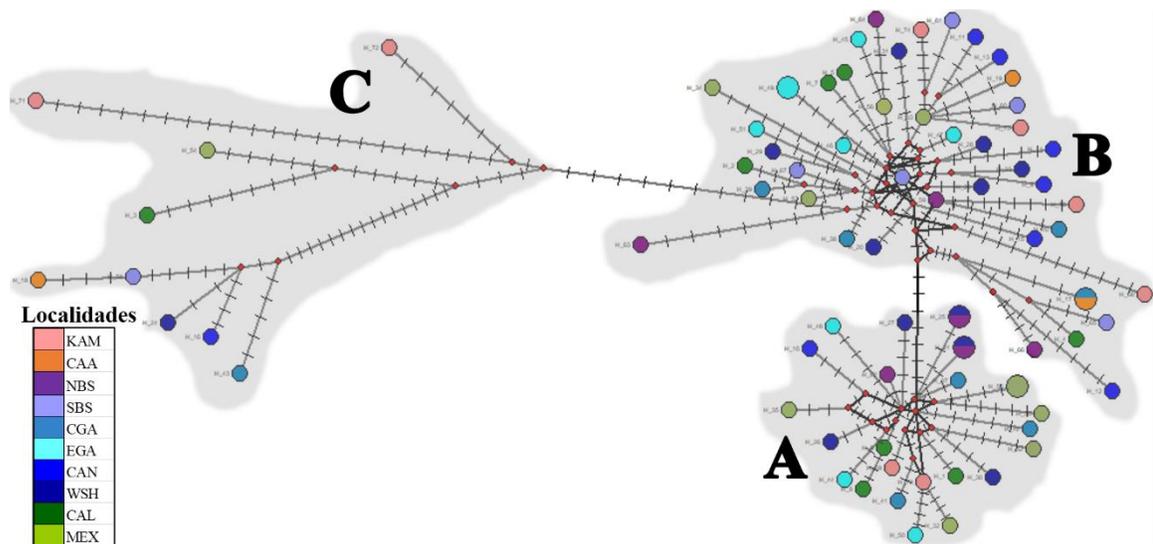


Figura 8. Red de haplotipos estimada mediante el algoritmo *Median Joining* usando los SNPs mt de *Anoplopoma fimbria*. Cada nodo representa un haplotipo de secuencia de ADNmt único donde cada color representa una localidad de muestreo y el tamaño del círculo indica la frecuencia. Las longitudes de las líneas que conectan haplotipos y su distancia esta medida en pasos mutacionales (líneas transversales). Los nodos rojos son haplotipos no observados inferidos por el programa. Las letras mayúsculas y las sombras en gris representan los haplogrupos designados. Para los acrónimos e información de los sitios ver la tabla II.

El haplogrupo B se formó por 43 haplotipos, ampliamente distribuido en todas las localidades analizadas. El segundo más abundante fue el haplogrupo A con 32 haplotipos, sin embargo, no se observó en las localidades de CAA y SBS. El haplogrupo C es el menos abundante y

homogéneo, no fue observado en las localidades de EGA y NBS, pero los distintos haplotipos se separan entre sí por muchos pasos mutacionales (Fig. 8 y 9).

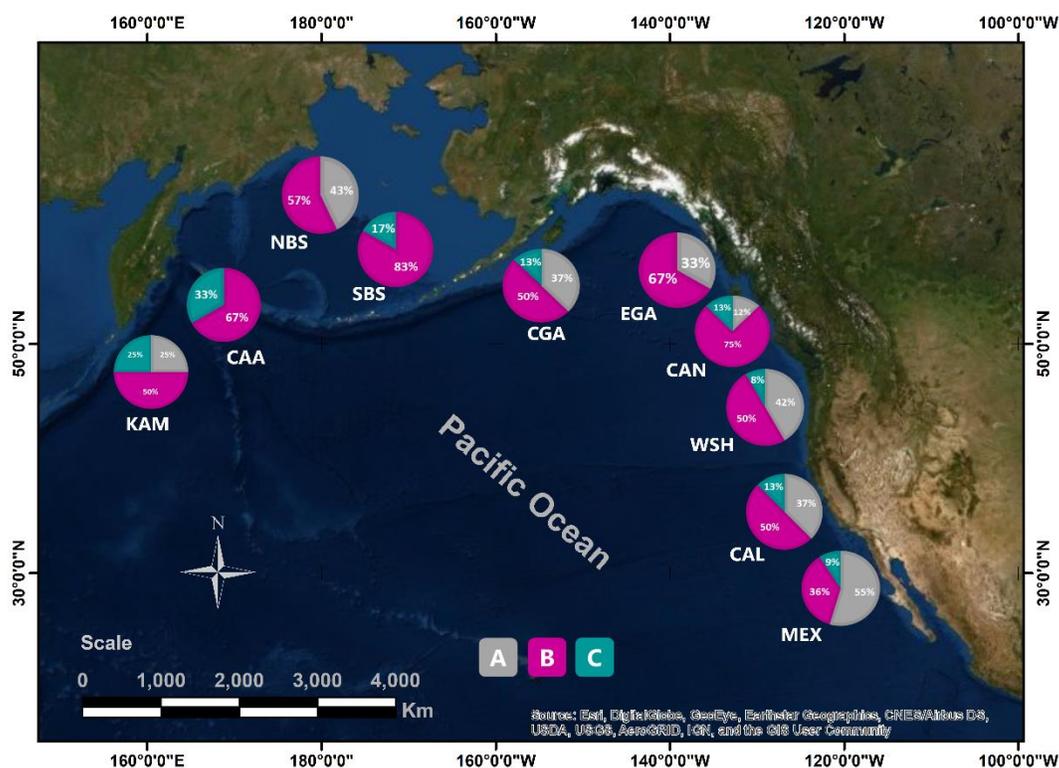


Figura 9. Distribución de los haplogrupos de *Anoplopoma fimbria* empleando SNPs del ADNmt. Los haplogrupos se muestran en diferente color (A, B y C). Para los acrónimos e información de los sitios ver la tabla II.

7.2.1.1.2 Citocromo b (Cyt-B) y Región Control (D-loop)

Con base en un fragmento de 680 pb del gen Cyt-b del ADNmt, se obtuvieron un total de 49 haplotipos diferentes a partir de 92 secuencias alineadas. Se observaron dos haplotipos más abundantes (H-9 y H-8) separados por 8 pasos mutacionales, de los cuales surgen varios haplotipos de baja frecuencia y únicos, permitiendo así la conformación de dos haplogrupos (A y B), además también se observó un tercer haplogrupo con varios haplotipos de baja frecuencia y separados por un mayor número de pasos mutacionales entre sí, el cual fue designado con la letra C (Fig. 10).

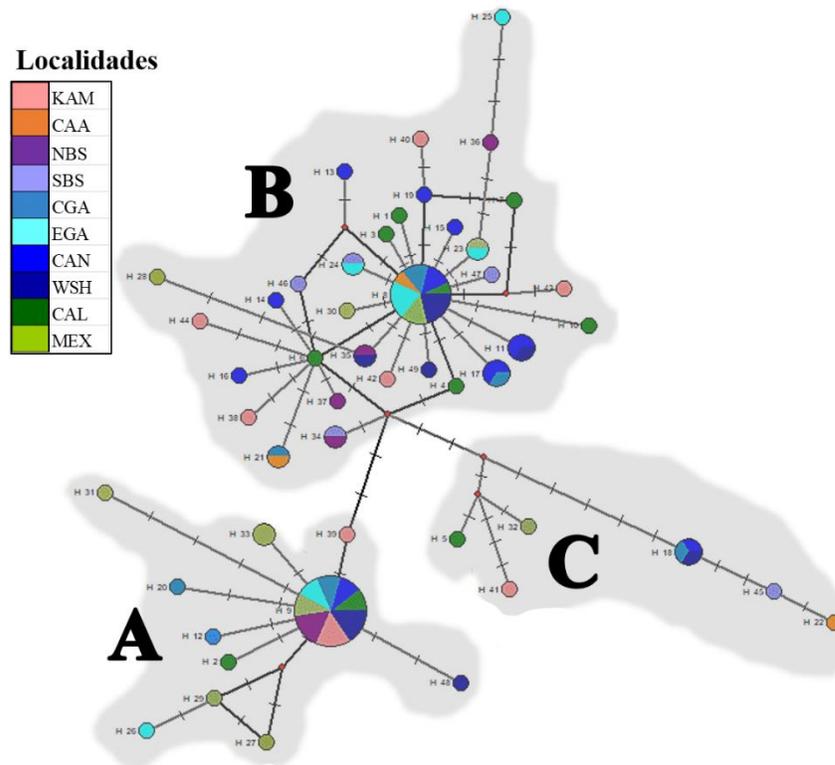


Figura 10. Red de haplotipos estimada mediante el algoritmo *Median Joining* usando la región Cyt-b ADNmt de *Anoplopoma fimbria*. Cada nodo representa un haplotipo de secuencia de ADNmt único donde cada color representa una localidad de muestreo y el tamaño del círculo indica la frecuencia. Las longitudes de las líneas que conectan haplotipos y su distancia esta medida en pasos mutacionales (líneas transversales). Los nodos rojos son haplotipos no observados inferidos por el programa y las letras mayúsculas y las sombras grises representan los haplogrupos. Para los acrónimos e información de los sitios ver la tabla II.

El haplogrupo más abundante fue el B conformado por 32 haplotipos, el cual se encontró en todas las localidades, mientras que el haplogrupo A con 11 haplotipos no se observó en las localidades de CAA ni SBS. El haplogrupo C fue menos abundante y no se encontró en NBS ni EGA (Fig. 11).

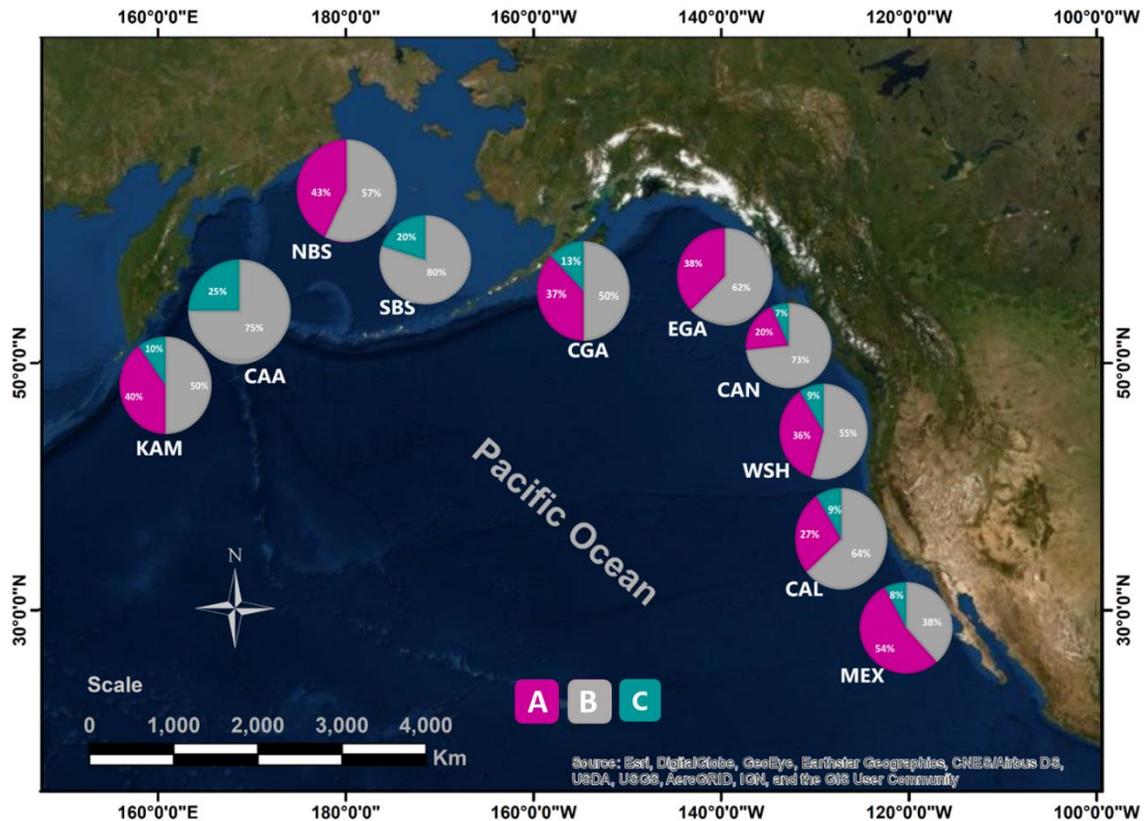


Figura 11. Distribución de los haplogrupos de *Anoplopoma fimbria* empleando la región mitocondrial Cyt-b. Los haplogrupos se muestran en diferente color. Para los acrónimos e información de los sitios ver la tabla II.

La red de haplotipos generada a partir de 124 secuencias de 653 pb de la región D-Loop presentó 96 haplotipos, la mayoría de estos fueron de baja frecuencia o únicos y no se observó una segregación espacial (Anexo J).

7.2.1.2 Estimaciones de diferenciación genética poblacional (F_{ST})

7.2.1.2.1 Polimorfismos mitocondriales de un solo nucleótido (SNP del ADNmt)

Todas las comparaciones pareadas mostraron valores generalmente bajos de F_{ST} los cuales variaron de 0 a 0.104 y ninguna de las comparaciones fue estadísticamente significativa (Tabla VII)

Tabla VII. Valores del índice de fijación, F_{ST} (diagonal inferior) de *Anoplopoma fimbria* empleando SNP del ADNmt y niveles de significancia estadística para cada comparación (p) en la diagonal superior. Para los acrónimos e información de los sitios ver la tabla II.

| | CAL | CAN | CAA | WSH | CGA | EGA | SBS | NBS | KAM | MEX |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| CAL | | 0.631 | 0.351 | 0.784 | 0.901 | 0.676 | 0.396 | 0.793 | 0.955 | 0.757 |
| CAN | 0.000 | | 0.847 | 0.577 | 0.586 | 0.387 | 0.991 | 0.486 | 0.757 | 0.135 |
| CAA | 0.012 | 0.000 | | 0.243 | 0.595 | 0.090 | 0.973 | 0.234 | 0.559 | 0.171 |
| WSH | 0.000 | 0.000 | 0.049 | | 0.856 | 0.414 | 0.360 | 0.955 | 0.577 | 0.685 |
| CGA | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | | 0.225 | 0.667 | 0.937 | 0.820 | 0.829 |
| EGA | 0.000 | 0.007 | 0.104 | 0.000 | 0.011 | | 0.279 | 0.387 | 0.324 | 0.171 |
| SBS | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.010 | 0.000 | 0.030 | | 0.225 | 0.649 | 0.117 |
| NBS | 0.000 | 0.000 | 0.065 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.022 | | 0.622 | 0.766 |
| KAM | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.013 | 0.000 | 0.000 | | 0.396 |
| MEX | 0.000 | 0.029 | 0.082 | 0.000 | 0.000 | 0.027 | 0.059 | 0.000 | 0.000 | |

7.2.1.2.2 Citocromo b (Cyt-B) y Región Control (D-loop)

Todas las comparaciones pareadas realizadas con la región Cyt-b mostraron valores de F_{ST} muy bajos los cuales variaron de 0 a 0.0924 y ninguna de las comparaciones fue estadísticamente significativa (Tabla VIII). Por otra parte, la región D-loop mostro valores de F_{ST} en su mayoría bajos (0 a 0.08), sin embargo, los valores entre las comparaciones de SBS-MEX y SBS-SUR fueron más altas (0.1545 y 0.1533) y estadísticamente significativas una vez aplicada la corrección FDR (Tabla IX).

Tabla VIII. Valores del índice de fijación F_{ST} para la región Cyt-b (diagonal inferior) de *Anoplopoma fimbria* y niveles de significancia estadística para cada comparación (p) en la diagonal superior. Para los acrónimos e información de los sitios ver la tabla II.

| | CAL | CAN | CGA | CAA | EGA | MEX | NBS | KAM | SBS | WSH |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| CAL | | 0.7658 | 0.7658 | 0.4324 | 0.4955 | 0.4775 | 0.7297 | 0.8288 | 0.5405 | 0.9910 |
| CAN | 0.0000 | | 0.4144 | 0.4234 | 0.4324 | 0.1081 | 0.2072 | 0.2703 | 0.6487 | 0.6937 |
| CGA | 0.0000 | 0.0000 | | 0.4595 | 0.4414 | 0.7838 | 0.9640 | 0.9910 | 0.6667 | 0.8559 |
| CAA | 0.0418 | 0.0175 | 0.0000 | | 0.1441 | 0.1982 | 0.3423 | 0.3514 | 0.9640 | 0.3423 |
| EGA | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0924 | | 0.4955 | 0.6667 | 0.3784 | 0.3063 | 0.68468 |
| MEX | 0.0000 | 0.0542 | 0.0000 | 0.0884 | 0.0000 | | 0.9910 | 0.7297 | 0.1712 | 0.6757 |
| NBS | 0.0000 | 0.0192 | 0.0000 | 0.0337 | 0.0000 | 0.0000 | | 0.9820 | 0.4865 | 0.7928 |
| KAM | 0.0000 | 0.0075 | 0.0000 | 0.0195 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | | 0.6126 | 0.8919 |
| SBS | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0101 | 0.0463 | 0.0000 | 0.0000 | | 0.6306 |
| WSH | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0040 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | |

Tabla IX. Valores del índice de fijación F_{ST} para la región D-loop (diagonal inferior) y niveles de significancia estadística para cada comparación (p) en la diagonal superior. En negritas las comparaciones significativas. Para los acrónimos e información de los sitios ver la tabla II.

| | MEX | EGA | CGA | CAN | CAL | CAA | NBS | KAM | SBS | SUR | WBS | WSH |
|-----|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------------|---------------|--------|--------|
| MEX | | 0.3564 | 0.5946 | 0.3960 | 0.5946 | 0.3564 | 0.8600 | 0.5946 | 0.0000 | 0.8325 | 0.5946 | 0.5946 |
| EGA | 0.0847 | | 0.5946 | 0.5946 | 0.7928 | 0.3564 | 0.5946 | 0.5946 | 0.5946 | 0.5946 | 0.8600 | 0.5946 |
| CGA | 0.0204 | 0.0557 | | 0.5946 | 0.8600 | 0.5946 | 0.9910 | 0.8325 | 0.5946 | 0.5946 | 0.8600 | 0.7624 |
| CAN | 0.0521 | 0.0247 | 0.0255 | | 0.5946 | 0.6442 | 0.7928 | 0.9476 | 0.8600 | 0.5101 | 0.9476 | 0.8600 |
| CAL | 0.0297 | 0.000 | 0.000 | 0.0065 | | 0.6285 | 0.8600 | 0.8600 | 0.5946 | 0.7553 | 0.9476 | 0.7624 |
| CAA | 0.0644 | 0.0731 | 0.0226 | 0.0068 | 0.0076 | | 0.7928 | 0.8020 | 0.8600 | 0.5946 | 0.9476 | 0.5946 |
| NBS | 0.000 | 0.0468 | 0.000 | 0.000 | 0 | 0 | | 0.9476 | 0.5946 | 0.6121 | 0.8600 | 0.9476 |
| KAM | 0.0165 | 0.0107 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | | 0.5946 | 0.5946 | 0.9910 | 0.8600 |
| SBS | 0.1533 | 0.0612 | 0.0381 | 0.000 | 0.0306 | 0.000 | 0.0477 | 0.0173 | | 0.0000 | 0.9476 | 0.5946 |
| SUR | 0.000 | 0.0595 | 0.01 | 0.0672 | 0.0003 | 0.0486 | 0.0022 | 0.02 | 0.1545 | | 0.5946 | 0.5946 |
| WBS | 0.0271 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.0427 | | 0.9476 |
| WSH | 0.0236 | 0.012 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.0323 | 0.000 | 0.000 | 0.0192 | 0.0382 | 0.000 | |

7.2.1.3 Análisis molecular de varianza (AMOVA)

Las hipótesis probadas no mostraron diferencias significativas a ninguno de los niveles (individuos, poblaciones y grupos) empleando la base de SNPs del ADNmt y la mayor parte de la varianza genética en cada una de las agrupaciones se encontró al interior de los individuos (99-100%, Tabla X). Resultados similares se observaron para la región Cyt-b. La mayor varianza genética en cada agrupación se encontró al interior de los individuos (96-100%), la hipótesis 2 presentó un 4% varianza genética entre grupos, pero no se encontraron diferencias significativas a ninguno de los niveles evaluados para ninguna hipótesis (Tabla X). Los resultados obtenidos con la región D-loop no mostraron diferencias entre grupos, pero se observó un porcentaje alto de variación entre poblaciones (30 a 38%) y para todas las hipótesis probadas todos los estadísticos F fueron significativos ($p < 0.05$) tanto a nivel de individuos como entre poblaciones (Tabla X).

Por otra parte, de las hipótesis adicionales evaluadas para D-loop mostraron un porcentaje alto de variación (18%) entre grupos al separar las localidades en costa este y oeste del Pacífico (Hipótesis 3, Tabla XI). Sin embargo, el mayor porcentaje de variación entre grupos lo presentó la hipótesis A5 (25 % de variación) en la que se puso a prueba tres grupos conformados por la costa rusa, Mar de Bering y la costa este del Pacífico (Tabla XI).

Tabla X. Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) empleando datos de ADNmt de *Anoplopoma fimbria*. Se muestran el porcentaje de variación (%) de diferentes niveles jerárquicos de las hipótesis puestas a prueba, así como los estadísticos F y la significancia estadística (p). Para los acrónimos e información de los sitios ver la tabla II.

| Estructura analizada | Fuente | SNPs mt | | | | Cyt-B | | | | D-loop | | | |
|--|---------------------|---------|------|---------------|-------|-------|------|---------------|-------|--------|------|---------------|-------|
| | | df | % | Estadístico F | P | df | % | Estadístico F | P | df | % | Estadístico F | P |
| Hipótesis 1 Panmixia | Entre Pops | 9 | 0% | | | 9 | 0% | | | 11 | 30% | | |
| | Dentro Pops | 70 | 100% | | | 82 | 100% | | | 112 | 70% | | |
| | Total | 79 | 100% | 0 | 0.646 | 91 | 100% | -0.018 | 0.789 | 123 | 100% | 0.302 | 0.000 |
| Hipótesis 2 2 grupos 1): MEX 2): CAL A KAM y Mar de Bering (SBS y NBS) | Entre grupos | 1 | 1% | 0.007 | 0.297 | 1 | 4% | 0.036 | 0.099 | 1 | 0% | -0.129 | 1.000 |
| | Entre Pops | 8 | 0% | 0 | 0.641 | 8 | 0% | -0.029 | 0.892 | 10 | 32% | 0.319 | 0.000 |
| | Dentro Pops | 70 | 99% | 0 | 0.445 | 82 | 96% | 0.009 | 0.286 | 112 | 68% | 0.231 | 0.000 |
| | Total | 79 | 100% | | | 91 | 100% | | | 123 | 100% | | |
| | Entre grupos | 2 | 0% | 0 | 0.747 | 2 | 2% | 0.016 | 0.211 | 2 | 0% | -0.131 | 1.000 |
| Hipótesis 3 3 grupos 1): MEX 2): CAL-KAM 3): Mar de Bering (SBS y NBS) | Entre Pops | 7 | 0% | 0.002 | 0.394 | 7 | 0% | -0.026 | 0.858 | 9 | 39% | 0.392 | 0.000 |
| | Dentro Pops | 70 | 100% | 0 | 0.634 | 82 | 98% | -0.010 | 0.611 | 112 | 61% | 0.313 | 0.000 |
| | Total | 79 | 100% | | | 91 | 100% | | | 123 | 100% | | |
| | Entre grupos | 1 | 1% | 0 | 0.537 | 1 | 0% | -0.002 | 0.440 | 1 | 0% | -0.039 | 1.000 |
| | Entre Pops | 8 | 0% | 0 | 0.479 | 8 | 0% | -0.019 | 0.777 | 10 | 37% | 0.371 | 0.000 |
| Hipótesis 4 2 grupos 1): KAM A EGA y Mar de Bering 2): CAL Y MEX | Dentro Pops | 70 | 99% | 0 | 0.547 | 82 | 100% | -0.022 | 0.783 | 112 | 63% | 0.347 | 0.000 |
| | Total | 79 | 100% | | | 91 | 100% | | | 123 | 100% | | |
| | Entre grupos | 2 | 0% | 0.007 | 0.159 | 2 | 0% | -0.002 | 0.482 | 2 | 0% | -0.040 | 0.999 |
| | Entre Pops | 7 | 0% | 0 | 0.633 | 7 | 0% | -0.017 | 0.739 | 9 | 38% | 0.375 | 0.000 |
| | Dentro Pops | 70 | 100% | 0.002 | 0.362 | 82 | 100% | -0.019 | 0.792 | 112 | 62% | 0.350 | 0.000 |
| Hipótesis 5 3 grupos 1): Mar de Bering (SBS y NBS) 2): KAM A EGA 3): MEX-CAL | Total | 79 | 100% | | | 91 | 100% | | | 123 | 100% | | |

Tabla XI. Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) de la región D-loop de *Anoplopoma fimbria*. Se muestran el porcentaje de variación (%) de diferentes niveles jerárquicos de las hipótesis puestas a prueba, así como los estadísticos F y la significancia estadística (p). Para los acrónimos e información de los sitios ver la tabla II.

| Hipótesis analizada | Fuente | df | % | Estadístico F | P |
|--|---------------------|-----|------|---------------|-------|
| Hipótesis S A1 | | | | | |
| 3 Grupos | Entre grupos | 2 | 2% | 0.023 | 0.079 |
| 1) Mar de Bering (SUR, WBS, NBS, SBS) | Entre Pops | 9 | 35% | 0.353 | 0.000 |
| 2) KAM-CAL (KAM,CAA,CGA,EGA,CAN,WSH,CAL) | Dentro Pops | 112 | 63% | 0.368 | 0.000 |
| 3) MEX | Total | 123 | 100% | | |
| Hipótesis A2 | | | | | |
| 3 Grupos | Entre grupos | 2 | 9% | 0.094 | 0.000 |
| 1) Rusia (KAM, CAA,SUR, WBS, NBS, SBS) | Entre Pops | 9 | 29% | 0.318 | 0.000 |
| 2) Pacífico este (CGA, EGA, CAN, WSH, CAL) | Dentro Pops | 112 | 62% | 0.382 | 0.000 |
| 3) MEX | Total | 123 | 100% | | |
| Hipótesis A3 | | | | | |
| 2 Grupos | Entre grupos | 1 | 18% | 0.177 | 0.000 |
| 1) Rusia (KAM, CAA,SUR, WBS, NBS, SBS) | Entre Pops | 10 | 24% | 0.287 | 0.000 |
| 2) Pacífico este (CGA,EGA, CAN, WSH, CAL. MEX) | Dentro Pops | 112 | 59% | 0.413 | 0.000 |
| | Total | 123 | 100% | | |
| Hipótesis A4 | | | | | |
| 3 Grupos | Entre grupos | 2 | 12% | 0.118 | 0.000 |
| 1) RUSIA (KAM, CAA) | Entre Pops | 9 | 27% | 0.306 | 0.000 |
| 2) Mar de Bering (SUR, WBS, NBS, SBS) | Dentro Pops | 112 | 61% | 0.388 | 0.000 |
| 3) Pacífico este (CGA,EGA, CAN, WSH, CAL, MEX) | Total | 123 | 100% | | |
| Hipótesis A5 | | | | | |
| 3 Grupos | Entre grupos | 2 | 25% | 0.245 | 0.000 |
| 1) RUSIA (KAM, CAA, SUR, WBS) | Entre Pops | 9 | 18% | 0.233 | 0.000 |
| 2) Mar de Bering (NBS, SBS) | Dentro Pops | 112 | 58% | 0.421 | 0.000 |
| 3) Pacífico este (CGA,EGA, CAN, WSH, CAL,MEX) | Total | 123 | 100% | | |

7.2.1.4 Diversidad genética

Todas las localidades presentaron una alta diversidad haplotípica (h) para los dos sets de datos empleados y la cual fue de 0.85 a 1.00, siendo las localidades más al norte las que presentaron los valores más altos (Tabla XII). Mientras que la diversidad nucleotídica varió de 0.005 a 0.137 entre los diferentes sets de datos empleados, sin embargo, los valores fueron similares entre poblaciones (Tabla XII).

Tabla XII. Diversidad genética del ADNmt en *Anoplopoma fimbria*. Número de muestra (N), número de haplotipos (H), diversidad haplotípica (h) y diversidad nucleotídica (π). Para los acrónimos e información de los sitios ver la tabla II.

| Datos | Localidad | | | | | | | | | | | | Global |
|------------|-----------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| | KAM | NBS | SBS | WBS | SUR | CAA | CGA | EGA | CAN | WSH | CAL | MEX | |
| SNPs ADNmt | N | 8 | 7 | 6 | | 3 | 8 | 9 | 8 | 12 | 8 | 11 | 80 |
| | H | 8 | 7 | 6 | | 3 | 8 | 8 | 8 | 12 | 8 | 10 | 75 |
| | h | 1 | 1 | 1 | | 1 | 1 | 0.972 | 1 | 1 | 1 | 0.982 | 0.998 |
| | π | 0.116 | 0.080 | 0.077 | | 0.137 | 0.102 | 0.082 | 0.103 | 0.090 | 0.100 | 0.086 | 0.086 |
| Cyt-b | N | 10 | 7 | 5 | | 3 | 8 | 9 | 15 | 11 | 11 | 13 | 92 |
| | H | 8 | 5 | 5 | | 3 | 6 | 6 | 11 | 7 | 10 | 10 | 49 |
| | h | 0.933 | 0.857 | 1 | | 1 | 0.929 | 0.88 | 0.962 | 0.891 | 0.982 | 0.962 | 0.934 |
| | π | 0.008 | 0.006 | 0.009 | | 0.011 | 0.008 | 0.005 | 0.006 | 0.006 | 0.006 | 0.008 | 0.007 |
| D-loop | N | 14 | 7 | 6 | 5 | 10 | 13 | 8 | 9 | 12 | 12 | 13 | 124 |
| | H | 12 | 7 | 6 | 5 | 10 | 13 | 8 | 8 | 12 | 12 | 13 | 96 |
| | h | 0.978 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0.972 | 1 | 1 | 1 | 0.981 |
| | π | 0.016 | 0.014 | 0.015 | 0.01 | 0.012 | 0.01 | 0.017 | 0.018 | 0.015 | 0.01 | 0.018 | 0.014 |

8. DISCUSIÓN

En el presente estudio no se observaron señales de panmixia para el marcador nuclear. Por el contrario, la localidad mexicana (MEX) se diferenció del resto de los sitios de muestreo, resultado que fue consistente a través de los diferentes enfoques empleados. Mientras que, empleando los marcadores mitocondriales no se observó un patrón espacial aparente de los haplotipos para ninguna de las bases empleadas. Sin embargo, la región D-loop sugiere diferencias entre Mar de Bering y las costas este y oeste del Pacífico.

8.1 ADN nuclear (Microsatélites)

Los procedimientos estadísticos utilizados para determinar las diferencias genéticas empleando los loci microsatélites sugieren que los individuos de México son diferentes a los individuos de las localidades al norte del rango de distribución de la especie. Cada enfoque se basa en supuestos diferentes, por ejemplo, STRUCTURE asigna individuos a las poblaciones sobre la base de sus genotipos, al tiempo que estima las frecuencias alélicas de la población, pero supone que los loci no están ligados, y que las poblaciones están en equilibrio Hardy-Weinberg (Pritchard et al., 2000). En otras palabras, el método supone que cualquier desequilibrio encontrado es atribuible a la estructura de la población. Mientras que DAPC se basa en la transformación de datos, utilizando el análisis de componentes principales (PCA) como paso previo al análisis discriminante (DA), que garantiza que las variables enviadas a DA no estén correlacionadas y que su número sea menor que el de los individuos analizados, sin implicar necesariamente una pérdida de información genética (Jombart et al., 2010). Ambos métodos concuerdan y hacen robustas las conclusiones de que los individuos recolectados en México son diferentes del resto. Por su parte, los valores de F_{ST} usando los ocho loci microsatélites (8L) también sugieren que México es diferente de la mayoría de los sitios del norte, con la excepción de CGA, que presentó un valor de F_{ST} más bajo y no significativo (Tabla 3), mientras que empleando la base de datos original (11L), no se observó ninguna comparación significativa. Los resultados obtenidos empleando F_{ST} deben ser interpretados con precaución, ya que debido a que los microsatélites son hipervariables a menudo tienen una alta heterocigosidad dentro de las poblaciones, lo cual reduce la magnitud de las medidas de diferenciación genética como F_{ST} (y G_{ST}) (Hedrick,

1999; Alcala et al., 2014; Wang, 2015). Este efecto causado por la alta variabilidad de los microsatélites fue observado al retirar de la base de datos original (11L), los tres loci con mayor polimorfismo y al emplear el índice de fijación estandarizado de Hedrick (2005) el G'_{ST} . Hedrick, (1999) destaca que un conjunto con una gran cantidad de loci altamente polimórficos pueden dar diferencias muy pequeñas, pero estadísticamente significativas, aunque no refleje una diferencia biológicamente significativa, también destaca los "falsos negativos" causados por fuerzas como la selección de genes o el flujo genético que, aunque no sean fuertes, pueden generar diferencias adaptativas similares entre las poblaciones. Una forma de examinar la relación entre significancia estadística y biológica es evaluar el poder estadístico para detectar un efecto biológico conocido (Hedrick, 1999). Los resultados obtenidos con POWSIM confirmaron que los 8 loci y el número de muestras utilizadas en este estudio poseen el suficiente poder estadístico para detectar niveles tan bajos de F_{ST} como 0.0025 con una probabilidad > 0.8 y valores de $F_{ST} = 0.0050$ con una probabilidad cercana a 1. Por lo tanto, las diferencias genéticas entre MEX y cualquiera de las localidades al norte de ésta puede interpretarse como reales, soportando también los resultados de los métodos anteriores. El análisis molecular de varianza también apoyó la hipótesis de dos poblaciones (Hipótesis 2) indicando una diferenciación baja, pero estadísticamente significativa, entre México y el resto de las localidades ($F_{ST} = 0,046$; $p = 0,000$). Además, se observó una correlación significativa entre las distancias genéticas (Cavalli-Sforza y Nei) y geográficas, empleando todas las localidades lo cual sugiere un aislamiento por distancia entre los sitios. Sin embargo, al excluir los sitios del Mar de Bering, la correlación entre la distancias genéticas y geográficas deja de ser significativa (resultados no mostrados). Esto podría sugerir que otros factores (además de la distancia) están influenciando la estructura observada (ver más adelante).

Los resultados observados en el presente trabajo coinciden con estudios previos donde se ha informado una diferenciación débil pero significativa cuando se han comparado individuos de México con otras localidades del norte. Tripp-Valdez et al. (2012) informaron una diferenciación genética poblacional leve pero significativa con datos de 4 loci microsatélites, sugiriendo que las poblaciones del Mar de Bering, el Golfo de Alaska y Oregón forman una población separada de San Quintín, México. Asimismo, el trabajo realizado por Galván-

Tirado et al. (2015) reportó una variación del 0.7% entre el mitogenoma de México con respecto a Canadá, lo que podría sugerir diferencias entre las localidades.

Usando SNPs y un muestreo extenso a lo largo de la costa oeste de Norteamérica, Jasonowicz et al. (2017) reportaron un alto grado de homogeneidad genética entre los sitios más septentrionales de la distribución del bacalao negro (Mar de Bering, Golfo de Alaska y costa pacífica de los Estados Unidos); resultados semejantes se observaron en el presente estudio, sin embargo, es importante resaltar que en el estudio de Jasonowicz et al. (2017), no se analizaron muestras provenientes de aguas mexicanas.

8.2 ADN mitocondrial

Para los conjuntos de datos mitocondriales no se observó una correspondencia de la diversidad haplotípica en función a una estructura espacial. Los SNP's del ADNmt y el Cyt b muestran 3 haplogrupos, que podrían denotar linajes genealógicos diferentes (Fig. 8 y 10), pero los valores de F_{ST} entre poblaciones no fueron significativos para ningún de estos conjuntos de datos mitocondriales. De acuerdo a lo sugerido por Orlova et al., (2019) la presencia de dos de estos tres haplogrupos podría sugerir dos refugios a ambos lados del Pacífico Norte (haplogrupos A y B, Fig. 9 y 11), uno cercano a California (Golfo de California) y el otro en aguas cercanas a Japón durante el Último Máximo Glacial y una posterior expansión durante el calentamiento climático. La región D-loop no permitió la conformación de haplogrupos, sin embargo, los valores de F_{ST} entre las localidades de SBS con MEX y SUR presentaron diferencias significativas (Tabla X). Además, los resultados obtenidos con AMOVA para la región D-loop, también sugieren la existencia de al menos 3 grupos (Tabla XI): uno conformado por la costa oeste del Pacífico (KAM, CAA, SUR WBS), otro formado por el Mar de Bering (NBS y SBS) y otra en la costa este del Pacífico (MEX, CAL, WSH, CAN, EGA, CGA). Estos resultados contrastan con los reportados por Orlova et al. (2014 y 2019) para la región control (D-loop), quienes no encontraron diferencias entre las localidades muestreadas. El tamaño de muestra usado en el presente estudio fue mayor e involucro localidades que no se habían comparado antes, lo que podría explicar las diferencias con respecto a los estudios de Orlova et al. (2014 y 2019). Aunado a esto, la región control (D-loop) es la región con la tasa de mutación más alta en el ADNmt (Cecconi et al., 1995), evoluciona de 4-5 veces más rápido que el resto de la molécula del ADN

mitocondrial (Brown et al., 1979), por lo que esta región podría dejar señales de diferenciación genética más reciente.

8.3 Estructura genética poblacional

Tanto los análisis de STRUCTURE, DAPC, como los valores de F_{ST} por pares de localidades realizados con los datos nucleares (microsatélites) resaltan la condición no panmictica de la especie e indican que la diferenciación genética aumenta hacia la parte meridional de la distribución, siendo la localidad mexicana una población genéticamente diferente. Las localidades más al norte se encuentran altamente mezcladas genéticamente y no se observan diferencias significativas entre sitios, mientras que los sitios al “margen” como California son más heterogéneos, con una ligera mezcla genética entre la población mexicana y el sitio de California. Estos resultados podrían ser consistentes con la hipótesis “central-marginal”, que predice un aumento general en la diferenciación genética hacia los márgenes de la distribución de las especies (Eckert et al., 2008). En este modelo se proponen dos parámetros genéticos claves, el tamaño efectivo poblacional (N_e) y la tasa de flujo génico (m), los cuales deberían ser más altos en el centro del rango y más bajos en los márgenes del rango de distribución. Como resultado, las poblaciones periféricas deberían exhibir una menor diversidad y una mayor diferenciación genética con respecto a las poblaciones centrales (Eckert et al., 2008). En nuestro estudio, todos los sitios evaluados a lo largo de la distribución de la especie presentaron altos valores de diversidad genética intrapoblacional (tanto nuclear como mitocondrial) y no se encontraron diferencias significativas, ni entre localidades ni entre poblaciones genéticas al comparar la H_e y H_o . Los altos niveles de diversidad observados pueden ser debido a múltiples factores que han contribuido a la estructura genética actual, particularmente aquellos asociados con el flujo de genes y la demografía pasada y la variabilidad ambiental. Por ejemplo, se espera que la diversidad genética sea mayor en las poblaciones más antiguas que en las de reciente colonización, ya que ha transcurrido el tiempo suficiente para que se establezca un equilibrio entre la migración y la deriva genética (Riginos y Liggins, 2013). Sin embargo, en el presente estudio no se encontraron diferencias en la heterocigosidad entre localidades y grupos genéticos. Bajo este escenario de colonización histórica, Riginos y Liggins (2013) sugieren que la

contribución de las variantes privadas es una medida más apropiada para evaluar los efectos de la mutación y deriva. En el presente trabajo la población de México presentó los valores más altos tanto para la riqueza alélica como de alelos privados (RA: 7.46 RAP: 2.1, Tabla VI), lo que podría sugerir aislamiento a causa de un reducido flujo genético y dado a las altas tasas de mutación de los microsatélites, este aislamiento podría ser contemporáneo.

Por otra parte, la diversidad genética también puede ser alta debido a la mezcla de poblaciones (Petit et al., 2003). Los datos microsatélites sugieren cierto grado de mezcla genética entre poblaciones. Por ejemplo, STRUCTURE reveló que dos de los sitios más al sur de ambas costas del Pacífico (CAL y KAM), muestran mezcla genética evidenciada por los coeficientes de membresía de la población de México y del resto del Pacífico Norte, a diferencia de lo observado para los sitios del Golfo de Alaska, Aleutianas y Mar de Bering (Fig. 3). La mezcla genética en la localidad CAL podría explicarse por la proximidad geográfica y eventual encuentro de individuos de ambos sitios (CAL y México, ver más adelante). Sin embargo, la localidad de KAM es un poco más problemático para explicar. Al construir un mapa de la distribución actual de la especie usando las herramientas de FishBase (Fig. 12), se observa que la especie puede estar presente en los montes submarinos en el centro del Océano Pacífico, que junto a la gran capacidad migratoria de la especie podría explicar la composición genética de la población de México en la localidad KAM (Fig. 3).

A pesar de lo anterior, los análisis de aislamiento por distancia sugieren una correlación significativa entre las distancias genéticas y geográficas (Fig. 5). Según la teoría, el aislamiento por distancia resulta en una relación directa entre las distancias genéticas y geográficas (Goudet et al., 1994), sin embargo, el o los procesos que originan este patrón puede no ser fácilmente determinados. La historia natural junto con los aspectos ecológicos, de hábitat y climáticos y la heterogeneidad del paisaje pueden generar regímenes de selección fluctuantes o contrastantes que afectan los patrones de flujo de genes y la estructura genética espacial (Manel y Holderegger, 2013).

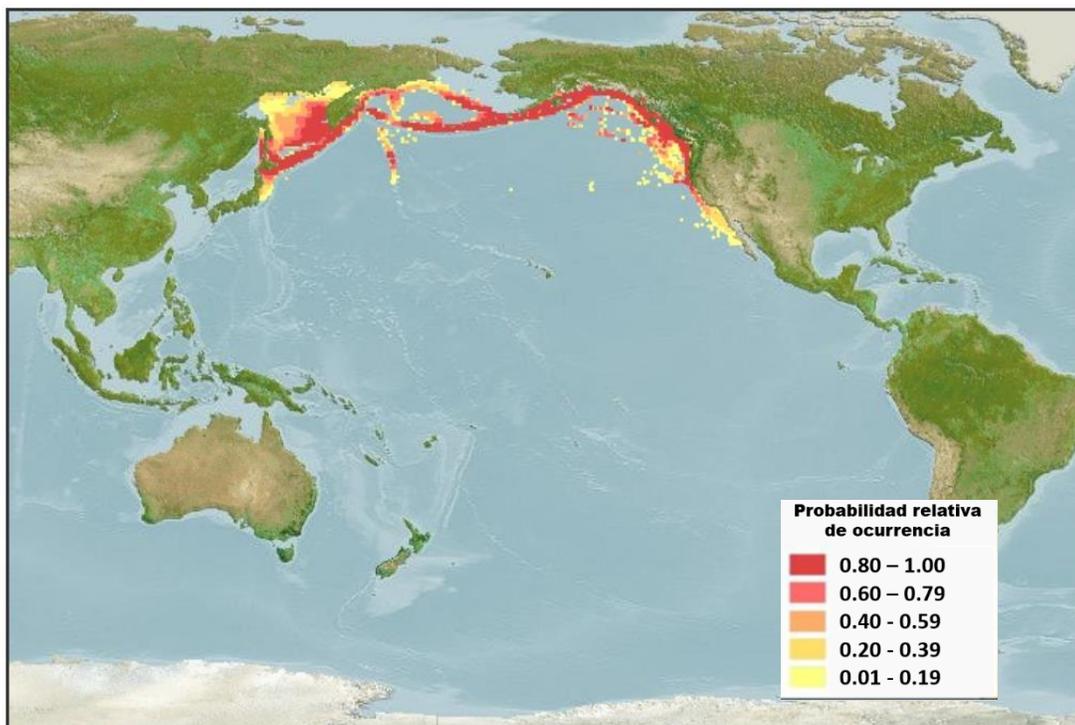


Figura 12. Mapa de distribución nativa de *Anoplopoma fimbria*. www.aquamaps.org, Consultado el 22 de agosto de 2020.

Bajo la óptica de la heterogeneidad del paisaje, las poblaciones marginales generalmente crecen en ambientes menos óptimos que las poblaciones centrales, y pueden desarrollar adaptaciones a tensiones ambientales específicas (Eckert et al., 2008; Tóth et al., 2019), manifestando así altos niveles de diversidad genética intrapoblacional. Aunque a menudo existe una correlación positiva entre la variación genética intraespecífica (neutral y adaptativa) y la heterogeneidad ambiental en los hábitats ocupados, que podrían indicar un vínculo entre la diversidad genética y ecológica (Eckert et al., 2008, Manel y Holderegger, 2013), el grado de concordancia entre la variación de los marcadores neutros (como los empleados en este trabajo) y la variación adaptativa son objeto aun de debate. No está claro si los mecanismos que generan las diferencias son lo suficientemente fuertes como para influir en el patrón de variación de rasgos ecológicamente significativos.

El bacalao negro habita las aguas de la plataforma y la pendiente continental en todo el Océano Pacífico Norte, así como en montes submarinos. Dentro de su distribución, habita diferentes rangos de profundidad; la edad, el tamaño y la madurez varían a lo largo de su

distribución y profundidades (Mason et al., 1983; McFarlane y Beamish, 1992; Maloney y Sigler, 2008). Según un estudio realizado en el Golfo de Alaska, el hábitat predicho para la especie, está determinado por la pendiente, la profundidad, la velocidad de la corriente y el color del océano, las cuales varían en importancia tanto con el estadio de vida como la estación del año (invierno o primavera, DFO, 2013). Por ejemplo, durante la primavera la profundidad y la velocidad de la corriente parecen ser las variables más influyentes, al menos en esta esta región. Lo cual puede estar relacionado con la temporada reproductiva en la zona. Los meses de desove desde el sudeste de Alaska y a lo largo de la costa de Canadá, son de enero a abril con un pico en febrero (Mason et al. 1983). Más abajo frente a la costa central de California, el desove ocurre de octubre a febrero (Hunter et al., 1989; Mateo et al., 2017). El desove ocurre a 300-500 m de profundidad cerca del borde de la plataforma continental. Los huevos son pelágicos y pueden incubarse durante varias semanas, hundiéndose a profundidades entre 400-1000 m antes de la eclosión a medida que aumenta la densidad del huevo (Kendall Jr y Matarese, 1987). Las larvas con yema se alimentan en profundidad, pero se mueven inmediatamente hacia la capa superficial donde son advectadas por las corrientes oceánicas, las cuales han sido capturadas hasta 370 km de distancia de las “zonas de desove” (Mason et al. 1983; Kendall Jr y Matarese, 1987; Wing, 1997; DFO, 2013). Estos datos de historia de vida sugieren no descartar las condiciones oceanográficas como factores que pudieran estar determinando la diferenciación de la población mexicana, y el contacto ocasional con localidades adyacentes. Las aguas costeras de la corriente de California se ven afectadas por varias variables ambientales a gran escala y locales con variabilidad estacional, anual e incluso decadal (Checkley Jr y Barth, 2009). Por ejemplo, a una escala regional, Punta Eugenia (Fig. 13) representa una barrera para el flujo de genes entre las poblaciones de diversas especies del Pacífico, como *Anisotremus davidsonii* (Haemulidae) y *Gillichthys mirabilis* (Gobiidae), solo por mencionar algunas (Bernardi et al., 2003; Bernardi y Lape, 2005), en esta región existe poca disponibilidad de hábitat y las fuertes surgencias y giros en la zona son factores oceanográficos que podrían estar generando las discontinuidades genéticas. Por otra parte, los principales impulsores de los cambios a gran escala son: la oscilación decadal del Pacífico (DOP, Mantua et al., 1997); que afecta la distribución espacial y el reclutamiento de los peces a lo largo de la corriente de California (Chavez et al.,

2003); y El Niño / Oscilación del sur (ENSO; Chavez, 1996), que puede tener efectos directos en la red alimenticia afectando la abundancia de las especies en la región (Brodeur et al., 2014). Sin embargo, estas barreras no son impermeables a lo largo del año, las condiciones en el sistema de la Corriente de California varían, no solo por influencia de las corrientes marinas sino también por la dirección y fuerza de los vientos, cambiando la dirección de la corriente (Fig.13) lo que podría facilitar cada cierto tiempo, el intercambio entre México y California (Shanks y Eckert, 2005).

En comparación con la parte noreste del rango del bacalao negro, la población en aguas orientales está poco estudiada. Se cree que el bacalao negro del Pacífico nororiental se recluta del stock de la costa este del Pacífico (Orlova et al. 2014). Sin embargo, otros autores sugieren que la reposición del bacalao negro en el este de Kamchatka y las islas Kuriles (sitios donde se reporta mayor abundancia) no se debe únicamente a la migración de los peces adultos desde el Mar de Bering, sino también a la deriva de los grupos de un año a través de la corriente aleutiana, además las aguas asiáticas, incluido el Mar de Okhotsk, están habitadas permanentemente por bacalao negro (Novikov, 1994), e incluso se han observado individuos en condiciones de desove al oeste de Kamchatka en noviembre y diciembre, lo que podría sugerir según Orlov y Biryukov, (2005) que el desove del bacalao negro también puede ocurrir en esta otra zona.

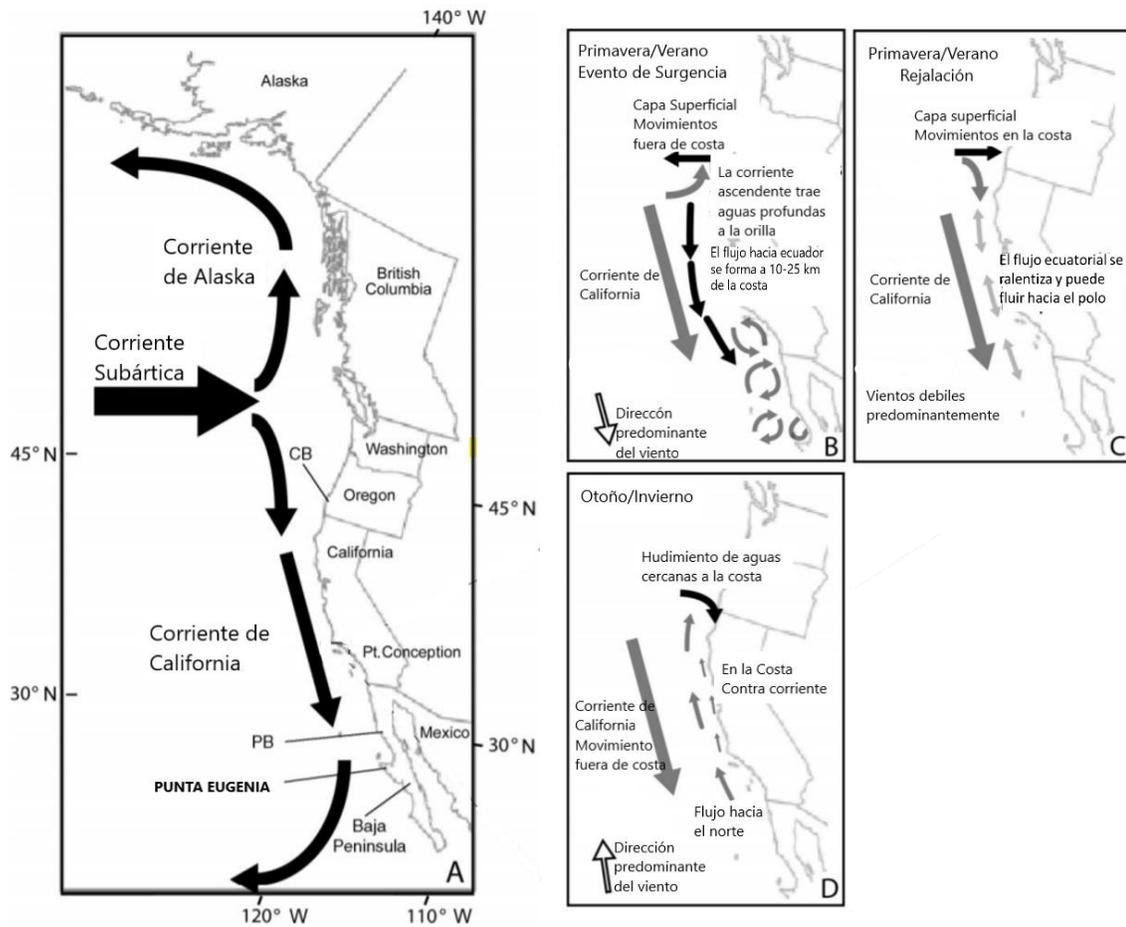


Figura 13. Sistema actual de California (A) (CB, Cabo Blanco; PB, Punta Baja; Punta Eugenia en Negritas). (B) Las condiciones de surgencia son comunes durante la primavera y el verano cuando los vientos predominantes son del norte. Durante la primavera, el verano y principios del otoño, la afluencia y los remolinos son persistentes en la península de Baja California. (C) Los eventos de relajación ocurren cuando los vientos del norte se relajan. (D) Durante el otoño y el invierno, los vientos predominantes del sur establecen un flujo hacia el polo y una contracorriente costera. Tomado y modificado de: (Shanks y Eckert, 2005).

En resumen, los resultados de este trabajo sugieren que el patrón genético de *Anoplopoma fimbria* puede explicarse por cierto grado de aislamiento por distancia, el cual junto con la heterogeneidad del paisaje permiten que la población de México se diferencie. La mezcla observada entre localidades incluso a grandes distancias geográficas sugiere que tanto el potencial de dispersión de la especie como las condiciones oceanográficas locales, juegan un papel importante en la configuración de la estructura genética de la especie.

8.4 Discordancia mito nuclear

El uso de diferentes marcadores puede producir escenarios diferentes de divergencia y hasta cierto punto contrastantes. La discordancia entre ADNmt y ADNn puede ser definida como una diferencia significativa en los patrones de diferenciación entre estos dos tipos de marcadores (Toews y Brelsford, 2012). Se ha demostrado que existen varios mecanismos que puede generar discordancia mitonuclear, como la clasificación de linaje incompleta en haplotipos del ADN mitocondrial, las asimetrías sesgadas por sexo, la introgresión, la selección natural o barridos genéticos, diferentes grados de deriva y las tasas de mutación (Larsson et al., 2009; Toews y Brelsford, 2012 ; Bowen y Grant, 2006). Comúnmente, estos conflictos entre patrones encontrados pueden estar relacionados con la cantidad general de diferenciación o en cómo estos marcadores reconstruyen las relaciones genéticas entre los grupos poblacionales. Los microsatélites y los marcadores mitocondriales son dos tipos de marcadores genéticos que difieren principalmente en su transmisión, así como en la dinámica de sus frecuencias alélicas y haplotípicas (Larsson et al., 2009). Por ejemplo, el tamaño poblacional del ADN mitocondrial tiene un tamaño efectivo de población cuatro veces menor que un locus nuclear, lo que significa que es más susceptible a eventos estocásticos, generando una tasa de clasificación de linaje mucho más rápida y por lo tanto una mayor tasa de extinción de alelos (Cecconi et al., 1995; Zhang y Hewitt, 2003). Los efectos de la deriva están relacionados con el tamaño efectivo de la población (N_e) por lo que la deriva genética dará como resultado una subdivisión de la población más rápida en el ADNmt que el ADNn. Para las especies templadas, en particular, los rangos geográficos se han modificado, fragmentado y / o fusionado en los últimos 20 000 años, creando un legado de consecuencias genéticas potencialmente significativas para las poblaciones contemporáneas (Theodoridis

et al., 2018). Se sugiere que los cambios de distribución históricos, impulsados por el clima, son de gran importancia para determinar la estructura genética de las especies a lo largo de su rango de distribución. Sin embargo, en situaciones donde el flujo de genes es alto y/o existen grandes tamaños de población, como es típico de organismos marinos (Waples, 1998) el proceso de divergencia se vuelve relativamente lento en los loci selectivamente neutros (Palumbi 1996), por lo que el tiempo transcurrido desde la última glaciación, pudo no ser suficiente para que algunas especies acumulen diferencias genéticas detectables, incluso si las poblaciones se aislaron por completo (Hynes et al., 1996). Es por eso que la señal de divergencia observada con los microsatélites y D-loop de la localidad Mexicana, no detectada con los datos de ADNmt (SNPs y Cyt-b), podría ser explicada por las diferentes características de los marcadores empleados como las diferentes tasas de mutación, más altas en microsatélites y en la región D-loop; que aunado con algunas características de la historia de vida de la especie como su alta capacidad de dispersión o grandes tamaños poblacionales (Echave et al., 2012; Head et al., 2014; Rodgveller et al., 2018), que pueden hacer que el proceso de divergencia se refleje más lentamente en marcadores como Cyt-b o SNP's del mt.

8.5 Implicaciones para el manejo

Muchas especies de peces comerciales, como el bacalao negro, son poblaciones que viven y se desplazan a través de aguas compartidas o limítrofes entre países. Estas poblaciones compartidas se definen, según la definición modificada de Caddy (1997) propuesta por Munro et al., (2004): como un grupo de organismos comercialmente explotables, que se distribuyen o migran a través de la frontera marítima entre dos o más jurisdicciones nacionales, o la frontera marítima de jurisdicción nacional y alta mar adyacente, y cuya explotación solo puede gestionarse eficazmente mediante la cooperación entre los Estados interesados. Sin embargo, no existe acuerdo o marco reglamentario “universal” que indique como y cuando se requiere la cooperación entre los Estados para la conservación y gestión estos recursos.

Gulland, (1980) propone una categorización biológica / geográfica de las poblaciones de peces compartidas, útil para dirigir el escenario de gestión de los recursos, y el cual se basa en dos categorías:

- I. Las poblaciones que se encuentran dentro de dos o más ZEE (Zona Económica Exclusiva), pero que no muestran un patrón migratorio claro.
- II. Las poblaciones se encuentran dentro de dos o más ZEE y muestran un patrón claro de movimiento, los cuales pueden ser debido a una migración estacional o según las etapas de desarrollo.

Además, Gulland, (1980) resalta también dos niveles de cooperación necesarias cuando se comparte un recurso: El nivel primario, que consiste en la cooperación solo en investigación, sin referencia a programas de gestión, como se ha realizado entre Kuwait e Irán en el Golfo Pérsico; entre los estados latinoamericanos del Pacífico Sureste, y entre los estados costeros del noroeste de África (Munro et al., 2004). Y el nivel secundario o "gestión activa" la cual implica el establecimiento de programas de gestión, y los cuales según la FAO pueden incluir regímenes no cooperativos como opción, ya que, en algunos casos como en las especies que conforman la Categoría I; no siempre está claro que la explotación en un lado del límite tenga necesariamente un efecto significativo sobre las oportunidades de pesca en el otro lado del límite. Por lo que la decisión de adoptar un enfoque cooperativo debe estar en función de las características de la pesquería y de la capacidad de las instituciones de las partes interesadas para desempeñar las funciones delegadas.

En cualquier caso, y como el autor también sugiere, no es posible lograr una gestión activa sin un nivel de primario de cooperación, por lo que un primer paso, si México tiene intención explotar el recurso, sería establecer medidas de cooperación que permitan ampliar el conocimiento biológico de la especie a lo largo de todo su rango de distribución, entre las cuales evaluar el grado de mezcla que existe entre poblaciones debe ser lo primordial a definir para establecer si es necesaria o no una gestión activa entre países.

Los movimientos de dispersión del bacalao negro en la región mexicana no han sido estudiados y la poca información referente a su población son de una prospección realizada hace más de 30 años (Silva-Ramírez y Garcia, 1988). Estos autores reportaron que gran parte de las capturas estaban compuestas por individuos que aún no alcanzaban la primera madurez, lo que repercutió en una disminución del recurso. Sin embargo, hasta el 2012, la especie aparecía en la Carta Nacional Pesquera administrada mediante permisos de pesca de fomento y su estatus es como un recurso pesquero potencial. Para Japón y Rusia, la especie se captura junto con otras especies demersales, y particularmente en Rusia se pesca como captura secundaria con en las pesquerías halibut, por lo que su regulación está en función de las capturas permitidas para este grupo de especies (FAO, 2009;Токранов и Орлов, 2015). Caso contrario, en las costas de Estados Unidos y Canadá, el bacalao negro se encuentra mejor monitoreado, se evalúa como una sola población y es administrado por regiones discretas. Estas regiones están determinadas por límites políticos incluyendo la región del estado de Alaska, la Columbia Británica y la costa oeste de los Estados Unidos. Las decisiones de gestión y reglamentarias, como los límites de captura, las estaciones y las restricciones, se implementan a nivel del área de manejo (Mateo et al., 2017). Según los datos de las instituciones administrativas, el stock no está sujeto sobrepesca. (DFO, 2013; Mateo et al., 2017). Sin embargo los cambios en la estructura genética pueden darse en cuestión de décadas y estar asociados con cambios en la aptitud de la población (Carvalho y Hauser, 1994). Aunque el máximo rendimiento sostenible es la meta para una pesca sustentable, el cual ha asegurado que el concepto de stock continúe desempeñando un papel fundamental en la biología pesquera, el enfoque numérico en los procedimientos de su evaluación, tiende a suponer que todos los individuos de una población son genéticamente equivalentes. Sin embargo, si las poblaciones, mantienen una baja diversidad y un bajo flujo de genes, quizás estas poblaciones tengan un reducido potencial evolutivo; pero si por el contrario mantienen una variación genética sustancial, las poblaciones pueden divergir adaptativamente debido a diferentes presiones selectivas y al flujo reducido de genes y por tanto, pueden desempeñar un papel en el mantenimiento y la generación de la diversidad biológica (Channell y Lomolino, 2000). Para discernir cuál de estos dos escenarios de diversidad genética en

biológica (Channell y Lomolino, 2000). Para discernir cuál de estos dos escenarios de diversidad genética en poblaciones explotadas, se requieren de estudios que deberían tener como objetivo proporcionar una evaluación más exhaustiva del genoma de la especie y cómo responde a las presiones selectivas locales, ya que las implicaciones de manejo y las estrategias de cualquier escenario son diferentes. Mientras uno aboga por la conservación de áreas clave de desove y la explotación limitada en regiones particulares y en momentos particulares, el otro intenta la identificación y conservación adecuadas de áreas caracterizadas por individuos que expresan diferencias en rasgos clave. Los estudios que combinan tanto la estructura de la población neutral como los marcadores que responden a la selección quizás puedan refinar nuestra comprensión de la historia de vida y las trayectorias evolutivas de esta especie y ayudar a diseñar estrategias de manejo más apropiadas para recursos pesqueros compartidos internacionalmente como lo es el bacalao negro.

9. CONCLUSIONES

- a) El bacalao negro no constituye una población panmíctica en el Norte del Pacífico. Los individuos distribuidos en aguas mexicanas representan una población genéticamente diferente del resto de las localidades analizadas. Dicha diferenciación pudo surgir recientemente como lo demuestra los niveles de mezcla genética (flujo de genes) con localidades tan cercanas como California y lejanas como Rusia y el patrón de aislamiento por distancia observado.
- b) Los datos mitocondriales (SNPs y Cit-b) no revelaron diferencias genéticas a lo largo de la distribución del bacalao negro. No obstante, la región D-loop con una mayor tasa de mutación, reveló diferencias significativas entre el Sur del Mar de Bering y México y dos linajes este y oeste del Pacífico Norte, lo que apoya la hipótesis de una diferenciación genética reciente de la población mexicana observada con loci microsatélites.
- c) La estructura genética observada indica que México como país soberano del mar territorial, es propietario de una parte del recurso genético que se captura en aguas norteamericanas, sin embargo, se desconoce el grado de mezcla, lo que resalta la necesidad de su evaluación a mayor profundidad.

10. LITERATURA CITADA

- Alcala, N., J. Goudet, y S. Vuilleumier 2014. On the transition of genetic differentiation from isolation to panmixia: What we can learn from G S T and D. *Theoretical Population Biology*. 93:75-84.
- Als, T.D., M.M. Hansen, G.E. Maes, M. Castonguay, L. Riemann, K. Aarestrup, P. Munk, H. Sparholt, R. Hanel, y L. Bernatchez 2011. All roads lead to home: Panmixia of European eel in the Sargasso Sea. *Molecular Ecology*. 20(7):1333-1346.
- André, C., L.C. Larsson, L. Laikre, D. Bekkevold, J. Brigham, G.R. Carvalho, T.G. Dahlgren, W.F. Hutchinson, S. Mariani, K. Mudde, D.E. Ruzzante, y N. Ryman 2011. Detecting population structure in a high gene-flow species, Atlantic herring (*Clupea harengus*): Direct, simultaneous evaluation of neutral vs putatively selected loci. *Heredity*. 106(2):270-280.
- Avise, J.C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman and HALL: An International Thomson Publishing Company.
- Avise, J.C. 1995. Mitochondrial DNA Polymorphism and a Connection Between Genetics and Demography of Relevance to Conservation. *Conservation Biology*. 9(3):686-690.
- Avise, J.C. 2004. *Molecular markers, natural history, and evolution*. Sunderland, MA.
- Bakun, A. 1975. Daily and weekly upwelling indices, west coast of North America, 1967-73. U.S. Department of Commerce, NOAA Technical Report 16, NMFS SSRF 693, 114 pp.
- Bandelt, H.-J., P. Forster, y A. Röhl 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*. 16(1):37-48.
- Baverstock, P.R. y C. Moritz 1996. Project design. *Molecular systematics*. 2:17-27.
- Benjamini, Y. y Y. Hochberg 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal statistical society: series B (Methodological)*. 57(1):289-300.
- Bernardi, G., L. Findley, y A. Rocha-Olivares 2003. Vicariance and dispersal across Baja California in disjunct marine fish populations. *Evolution*. 57(7):1599-1609.
- Bernardi, G. y J. Lape 2005. Tempo and mode of speciation in the Baja California disjunct

- fish species *Anisotremus davidsonii*. *Molecular Ecology*. 14(13):4085-4096.
- Bowen, B.W. y W.S. Grant 2006. Phylogeography of the Sardines (*Sardinops SPP.*): Assessing Biogeographic Models and Population Histories in Temperate Upwelling Zones. *Evolution*. 51(5):1601.
- Brodeur, R.D., J.C. Buchanan, y R.L. Emmett 2014. Pelagic and demersal fish predators on juvenile and adult forage fishes in the northern California current: spatial and temporal variations. *CalCOFI Reports*. 55(November):96-116.
- Brown, W.M., M. George, y A.C. Wilson 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 76(4):1967-1971.
- Caddy, J.F. 1997. Establishing a consultative mechanism or arrangement for managing shared stocks within the jurisdiction of contiguous states. 15. 16p.
- Carvalho, G.R. y L. Hauser 1994. Molecular genetics and the stock concept in fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 4(3):326-350.
- Cecconi, F., M. Giorgi, y P. Mariottini 1995. Unique features in the mitochondrial D-loop region of the European seabass *Dicentrarchus labrax*. *Gene*. 160(2):149-155.
- Channell, R. y M. V Lomolino 2000. Dynamic biogeography and conservation of endangered species. *Nature*. 403(6765):84-86.
- Chapuis, M.P. y A. Estoup 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*. 24(3):621-631.
- Chavez, F.P. 1996. Forcing and biological impact of onset of the 1992 El Niño in central California. *Geophysical Research Letters*. 23(3):265-268.
- Chavez, F.P., J. Ryan, S.E. Lluch-Cota, y M. Ñiquen 2003. From anchovies to sardines and back: multidecadal change in the Pacific Ocean. *science*. 299(5604):217-221.
- Checkley Jr, D.M. y J.A. Barth 2009. Patterns and processes in the California Current System. *Progress in Oceanography*. 83(1-4):49-64.
- Çiftci, Y. y İ. Okumuş 2002. Fish population genetics and applications of molecular markers to fisheries and aquaculture: I-Basic principles of fish population genetics. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 2(2):145-155.
- Côté, C.L., P.A. Gagnaire, V. Bourret, G. Verreault, M. Castonguay, y L. Bernatchez 2012. Population genetics of the American eel (*Anguilla rostrata*): $F_{ST} = 0$ and North

- Atlantic Oscillation effects on demographic fluctuations of a panmictic species. *Molecular Ecology*. 22(7):1763-1776.
- Dannewitz, J., G.E. Maes, L. Johansson, H. Wickström, F.A.M. Volckaert, y T. Järvi 2005. Panmixia in the European eel: A matter of time... *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 272(1568):1129-1137.
- DFO 2013. A Review of the Sablefish Population Structure in the Northeast Pacific Ocean and Implications for Canadian Seamount Fisheries. *Canadian Science Advisory Secretariat*. 2013/017(September):1-21.
- Earl, D.A. y B.M. VonHoldt 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation genetics resources*. 4(2):359-361.
- Echave, K.B., D.H. Hanselman, M.D. Adkison, y M.F. Sigler 2012. Interdecadal change in growth of sablefish (*Anoplopoma fimbria*) in the northeast Pacific Ocean. *Fishery Bulletin*. 110(3):361-374.
- Eckert, C.G., K.E. Samis, y S.C. Loughheed 2008. Genetic variation across species' geographical ranges: the central–marginal hypothesis and beyond. *Molecular Ecology*. 17(5):1170-1188.
- Evanno, G., S. Regnaut, y J. Goudet 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*. 14(8):2611-2620.
- Excoffier, L. and H.E. L. Lischer (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.
- FAO, F. and A.O. of the U.N. 2009. National Fishery Sector Overview: The Russian federation. *Exchange Organizational Behavior Teaching Journal*. 1-6.
- Galván-Tirado, C., M.A. Del Río-Portilla, R. Delgado-Vega, y F.J. García-De León 2015. Genetic variability between complete mitochondrion genomes of the sablefish, *Anoplopoma fimbria* (Pallas, 1814). *Mitochondrial DNA*. 27(4):2429-2430.
- Gharrett, A.J., M.A. Thomason, y L.W. Seeb 1982. Biochemical genetics of sablefish.
- Goudet, J., T. De Meeüs, A.J. Day, y C.J. Gliddon 1994. Gene flow and population

- structure. Genetics and evolution of aquatic organisms. London: Chapman & Hall. 81-95.
- Goudet, J., Jombart, T., & Goudet, M. J. 2015. Package 'hierfstat'. R package version 0.04- 22. <http://www.r-project.org>, <http://github.com/jgx65/hierfstat>
- Gulland, J.A. 1980. Some problems of the management of shared stocks. FAO Fisheries Technical Papers (FAO). no. 206.
- Hart, J.L. 1973. Pacific fishes of Canada. Ottawa: Fisheries Research Board of Canada. Bulletin. 180:.
- Hauser Lorenz y Carvalho Gary R 2008. Paradigm shifts in marine fisheries genetics: ugly hypotheses slain by beautiful facts. Fish and Fisheries. 9(4):333-362.
- Head, M.A., A.A. Keller, y M. Bradburn 2014. Maturity and growth of sablefish *Anoplopoma fimbria*, along the U.S. West Coast. Fisheries Research. 159(November):56-67.
- Hedrick, P.W. 1999. Perspective: highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation . Group. 53(Abril):313-318.
- Hedrick, P.W. 2005. A standardized genetic differentiation measure. Evolution. 59(8):1633-1638.
- Hellberg, M.E., R.S. Burton, J.E. Neigel, y S.R. Palumbi 2002. Genetic assessment of connectivity among marine populations. Bulletin of Marine Science. 70(1 SUPPL.):273-290.
- Hubisz, M.J., D. Falush, M. Stephens, y J.K. Pritchard 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. Molecular Ecology Resources. 9(5):1322-1332.
- Hunter, J.R., B.J. Macewicz, y C.A. Kimbrell 1989. Fecundity and other aspects of the reproduction of sablefish, *Anoplopoma fimbria*, in central California waters. CalCOFI Rep. 30(1989):61-72.
- Hynes, R.A., A. Ferguson, y M.A. McCann 1996. Variation in mitochondrial DNA and post- glacial colonization of north western Europe by brown trout. Journal of fish biology. 48(1):54-67.
- Jasonowicz, A.J., F.W. Goetz, G.W. Goetz, y K.M. Nichols 2017. Love the one you're

- with: Genomic evidence of panmixia in the sablefish (*Anoplopoma fimbria*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 74(3):377-387.
- Jombart, T. 2008. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*. 24(11):1403-1405.
- Jombart, T., S. Devillard, y F. Balloux 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC genetics*. 11(1):94.
- Kalinowski, S.T. 2005. HP-RARE 1.0: A computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Molecular Ecology Notes*. 5(1):187-189.
- Kendall Jr, A.W. y A.C. Matarese 1987. Biology of eggs, larvae, and epipelagic juveniles of sablefish, *Anoplopoma fimbria*, in relation to their potential use in management. *Mar. Fish. Rev.* 49(1):1-13.
- Kimura, D.K., A.M. Shimada, y F.R. Shaw 1998. Stock structure and movement of tagged sablefish, *Anoplopoma fimbria*, in offshore northeast pacific waters and the effects of el nino-southern oscillation on migration and growth. *Fishery Bulletin*, 96, 462-481p.
- Kopelman, N.M., J. Mayzel, M. Jakobsson, N.A. Rosenberg, y I. Mayrose 2015. Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular ecology resources*. 15(5):1179-1191.
- Larsson, L.C., J. Charlier, L. Laikre, y N. Ryman 2009. Statistical power for detecting genetic divergence-organelle versus nuclear markers. *Conservation Genetics*. 10(5):1255-1264.
- Li, H., B. Handsaker, A. Wysoker, T. Fennell, J. Ruan, N. Homer, G. Marth, G. Abecasis, y R. Durbin 2009. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 25(16):2078-2079.
- Li, H. y R. Durbin 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *bioinformatics*. 25(14):1754-1760.
- Lo, C.-C. y P.S.G. Chain 2014. Rapid evaluation and quality control of next generation sequencing data with FaQCs. *BMC bioinformatics*. 15(1):366.
- Maloney, N.E. y M.F. Sigler 2008. Age-specific movement patterns of sablefish

- (*Anoplopoma fimbria*) in Alaska. Fishery Bulletin. 106(3):305-316.
- Manel, S. y R. Holderegger 2013. Ten years of landscape genetics. Trends in Ecology and Evolution. 28(10):614-621.
- Mantua, N.J., S.R. Hare, Y. Zhang, J.M. Wallace, y R.C. Francis 1997. A Pacific interdecadal climate oscillation with impacts on salmon production. Bulletin of the American Meteorological Society. 78(6):1069-1080.
- Mason, J.C., R.J. Beamish, y G.A. McFarlane 1983. Sexual Maturity, Fecundity, Spawning, and Early Life History of Sablefish (*Anoplopoma fimbria*) off the Pacific Coast of Canada. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 40(12):2126-2134.
- Mateo, I., L. Assessor, y S. Dignan 2017. Alaska Pacific Sablefish (Black cod) Commercial Fishery. (January):
- May, B. y C.C. Krueger 1990. Use of allozyme data for population analysis. Electrophoretic and isoelectric focusing techniques in fisheries management. 157-171.
- McFarlane, G.A. y R.J. Beamish 1990. Effect of an External Tag on Growth of Sablefish (*Anoplopoma fimbria*), and Consequences to Mortality and Age at Maturity. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 47(8):1551-1557.
- McFarlane, G.A. y R.J. Beamish 1992. Climatic Influence Linking Copepod Production with Strong Year-Classes in Sablefish, *Anoplopoma fimbria*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 49(4):743-753.
- Morita, S.H., K. Morita, y A. Nishimura 2012. Sex-biased dispersal and growth in sablefish (*Anoplopoma fimbria*) in the northeastern Pacific Ocean. Environmental Biology of Fishes. 94(3):505-511.
- Munro, G.R., A. Van Houtte, y R. Willmann 2004. The conservation and management of shared fish stocks: legal and economic aspects. Food & Agriculture Org.,
- Novikov, N.P. 1994. New captures of sablefish *Anoplopoma fimbria* in the Sea of Okhotsk. Voprosy Ikhtiologii. 34:843-845.
- Van Oosterhout, C., W.F. Hutchinson, D.P.M. Wills, y P. Shipley 2004. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in

- microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*. 4(3):535-538.
- Orlov, A.M. y I.A. Biryukov 2005. First report of sablefish in spawning condition off the coast of Kamchatka and the Kuril Islands. *ICES Journal of Marine Science*. 62(5):1016-1020.
- Orlova, S.Y., A.M. Orlov, A.A. Volkov, y R.N. Novikov 2014. Micro-evolutionary processes in sablefish *Anoplopoma fimbria*, based on polymorphism of the two sites of mitochondrial DNA. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 458(1):172-176.
- Orlova, S.Y., D.M. Schepetov, N.S. Mogue, M.A. Smirnova, H. Senou, A.A. Baitaliuk, y A.M. Orlov 2019. Evolutionary history told by mitochondrial markers of large teleost deep-sea predators of family Anoplopomatidae Jordan & Gilbert 1883, endemic to the North Pacific. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 1-9.
- Orozco-Ruiz, A.M., C. Galván-Tirado, S.Y. Orlova, A.M. Orlov, y F.J. García-De León 2018. Microsatellite loci obtained by next generation sequencing on the sablefish (*Anoplopoma fimbria*). *Molecular Biology Reports*, 45, .
- Palm, S., J. Dannewitz, T. Prestegard, y H. Wickström 2009. Panmixia in European eel revisited: No genetic difference between maturing adults from southern and northern Europe. *Heredity*. 103(1):82-89.
- Palsbøll, P.J., M. Bérubé, y F.W. Allendorf 2007. Identification of management units using population genetic data. *Trends in Ecology and Evolution*. 22(1):11-16.
- Palumbi, S. R. 1996. What can molecular genetics contribute to marine biogeography? An urchin's tale. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 203(1): 75-92.
- Peakall y R. Smouse 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*. 28(19):2537.
- Petit, R.J., I. Aguinagalde, J.-L. de Beaulieu, C. Bittkau, S. Brewer, R. Cheddadi, R. Ennos, S. Fineschi, D. Grivet, y M. Lascoux 2003. Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. *science*. 300(5625):1563-1565.
- Pritchard, J.K., M. Stephens, N.A. Rosenberg, y P. Donnelly 2000. Association mapping in structured populations. *The American Journal of Human Genetics*. 67(1):170-181.
- Riginos, C. y L. Liggins 2013. Seascape Genetics: Populations, Individuals, and Genes

- Marooned and Adrift. *Geography Compass*. 7(3):197-216.
- Rodgveller, C.J., K.B. Echave, P.-J.F. Hulson, y K.M. Coutré 2018. Age-at-Maturity and Fecundity of Female Sablefish Sampled in December of 2011 and 2015 in the Gulf of Alaska. (March):1-31.
- Rousset, F. 2008. genepop'007: a complete re- implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular ecology resources*. 8(1):103-106.
- Roy, D., D.C. Hardie, M.A. Treble, J.D. Reist, y D.E. Ruzzante 2014. Evidence supporting panmixia in Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) in the Northwest Atlantic. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 71(5):763-774.
- Rozas, J., A. Ferrer-Mata, J.C. Sánchez-DelBarrio, S. Guirao-Rico, P. Librado, S.E. Ramos-Onsins, y A. Sánchez-Gracia 2017. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular biology and evolution*. 34(12):3299-3302.
- Ryman, N., S. Palm, C. André, G.R. Carvalho, T.G. Dahlgren, P.E. Jorde, L. Laikre, L.C. Larsson, A. Palmé, y D.E. Ruzzante 2006. Power for detecting genetic divergence: Differences between statistical methods and marker loci. *Molecular Ecology*. 15(8):2031-2045.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, y T. Maniatis 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press,
- Selkoe, K.A. y R.J. Toonen 2006. Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*. 9(5):615-629.
- Shanks, A. L., & Eckert, G. L 2005. Population persistence of California Current fishes and benthic crustaceans: a marine drift paradox. *Ecological Monographs*. 75(4): 505-524.
- Silva Ramírez., J.T. y S. Garcia V 1988. Resultados Preliminares del Estudio de la Pesquería del Pez Sable, *Anoplopoma fimbria*, en Mexico. *Ciencia Pesquera Inst. Nal. de la Pesca*, 33-43p.
- Smith, P.J. y Y. Fujio 1982. Genetic variation in marine teleosts: High variability in habitat specialists and low variability in habitat generalists. *Marine Biology*. 69(1):7-20.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, y S. Kumar 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*. 30(12):2725-2729.

- Team, R.C. 2016. R Project for Statistical Computing,(2019). Available online: [www. R-project. org/](http://www.R-project.org/)(accessed on 8 October 2014).
- Theodoridis, S., T.S. Patsiou, C. Randin, y E. Conti 2018. Forecasting range shifts of a cold-adapted species under climate change: are genomic and ecological diversity within species crucial for future resilience? *Ecography*. 41(8):1357-1369.
- Toews, D.P.L. y A. Brelsford 2012. The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Molecular Ecology*. 21(16):3907-3930.
- Tóth, E.G., F. Tremblay, J.M. Housset, Y. Bergeron, y C. Carcaillet 2019. Geographic isolation and climatic variability contribute to genetic differentiation in fragmented populations of the long-lived subalpine conifer *Pinus cembra* L. in the western Alps. *BMC Evolutionary Biology*. 19(1):1-17.
- Tripp-Valdez, M.A., F.J. García-de-León, H. Espinosa-Pérez, y G. Ruiz-Campos 2012. Population structure of sablefish *Anoplopoma fimbria* using genetic variability and geometric morphometric analysis. *Journal of Applied Ichthyology*. 28(4):516-523.
- Valenzuela-Quíñonez, F., J.A. De-Anda-Montañez, E. Gilbert-Horvath, J.C. Garza, y F.J. García-De León 2016. Panmixia in a critically endangered fish: The totoaba (*totoaba macdonaldi*) in the gulf of California. *Journal of Heredity*. 107(6):496-503.
- Verity, R. y R.A. Nichols 2014. What is genetic differentiation, and how should we measure it - G_{ST} , D , neither or both? *Molecular Ecology*. 23(17):4216-4225.
- Vincenty, T. 1975. Direct and inverse solutions of geodesics on the ellipsoid with application of nested equations. *Survey review*. 23(176):88-93.
- Wang, J. 2015. Does G_{ST} underestimate genetic differentiation from marker data? *Molecular Ecology*. 24(14):3546-3558.
- Waples, R.S. 1998. Separating the wheat from the chaff: Patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *Journal of Heredity*. 89(5):438-450.
- Waples, R.S. y O. 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. *Molecular Ecology*, 15, 1419-1439p.
- Weir, Bruce S.; Cockerham, C. Clark Estimating F-statistics for the analysis of population

structure. *Evolution*. 1984; 38:1358–1370

White, T.A., S. Stefanni, J. Stamford, y A.R. Hoelzel 2009. Unexpected panmixia in a long-lived, deep-sea fish with well-defined spawning habitat and relatively low fecundity. *Molecular Ecology*. 18(12):2563-2573.

White, T.A., H.A. Fotherby, P.A. Stephens, y A.R. Hoelzel 2011. Genetic panmixia and demographic dependence across the North Atlantic in the deep-sea fish, blue hake (*Antimora rostrata*). *Heredity*. 106(4):690-699.

Wing, B.L. 1997. Distribution of sablefish, *Anoplopoma fimbria*, larvae in the Eastern Gulf of Alaska. 13-26p.

Zhang, D. y G.M. Hewitt 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular ecology*. 12(3):563-584.

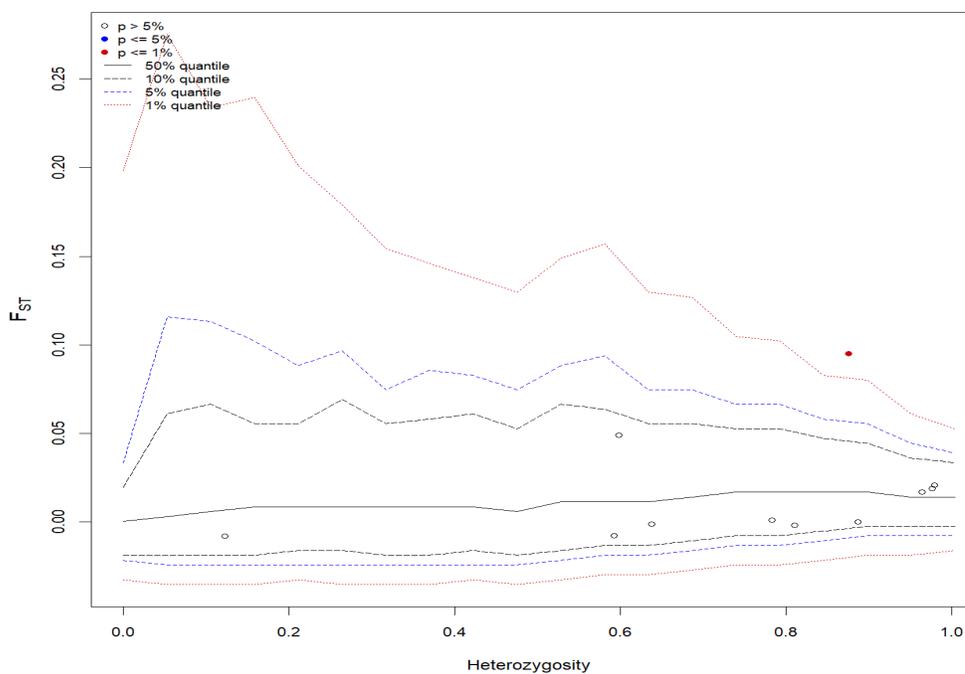
Токранов, А.М. y А.М. Орлов 2015. Теплолюбивые и восточнотихоокеанские мигранты в ихтиофауне тихоокеанских вод северных курильских островов и камчатки в XX-XXI веках. *Российский журнал биологических инвазий*. 8(3):50-70.

11. ANEXOS

Anexo A. Características de diseño del conjunto de cebadores empleados para amplificar la región mitocondrial de *Anoplopoma fimbria*.

| Nombre | Secuencia | Escala | Purificación | # Bases | Tm |
|-------------|--------------------------------|--------|--------------|---------|------|
| Afim-Cb-H | GATATGAGCCGTAGTAAAGACCTCGGCCG | 25 nM | DST | 30 | 75.7 |
| Afim-16S-L | TCGACAAGGGGGTTTACGACCTCGATGTTG | 25 nM | DST | 30 | 78.8 |
| Afim-16S-H | GACCTGGATTACTCCGGTCTGAACTCAGAT | 25 nM | DST | 30 | 72.9 |
| Afim-Cb-L | GATTAATCCGAAACATTACGCTAACGGTG | 25 nM | DST | 30 | 73.5 |
| BC-CYTB R | CCCAGTTTCATTCCAGAACCTTG | 25 nM | MOPC | 23 | 62.9 |
| BC-D-LOOP-R | GGGATGCGCATTATTTTAATAGTG | 25 nM | MOPC | 24 | 60.1 |
| BC-CYTB F | ATGGCAAGCCTGCGA AAATC | 25 nM | MOPC | 20 | 58.4 |
| BC-D-LOOP-F | CAAAGAAGGGAGATTTTAACTCCCG | 25 nM | MOPC | 25 | 64.2 |

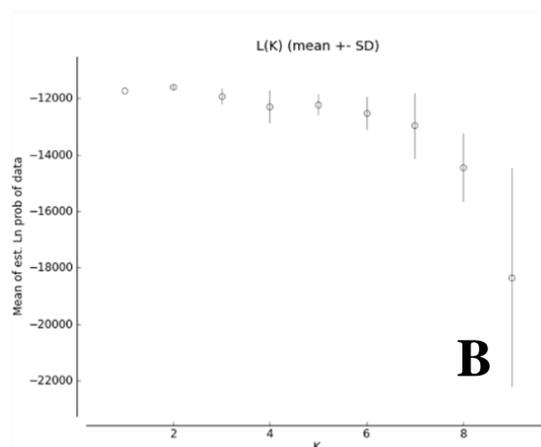
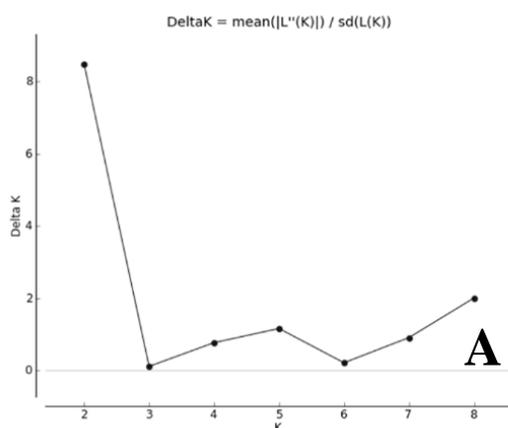
Anexo B. Gráfico de detección loci bajo selección basada en simulaciones F_{ST} implementadas en ARLEQUIN. El locus bajo posible selección (Afim-28) se muestra por encima de la línea de 99%.



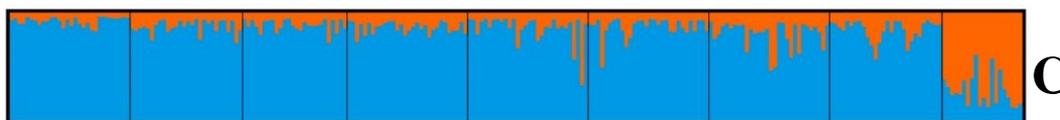
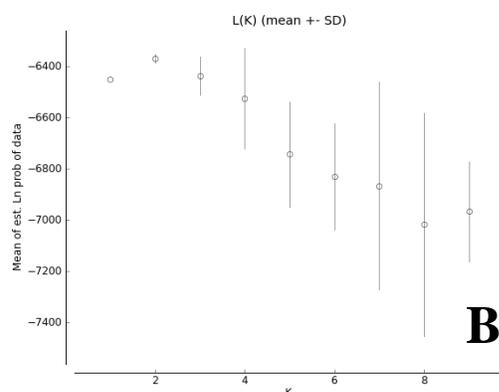
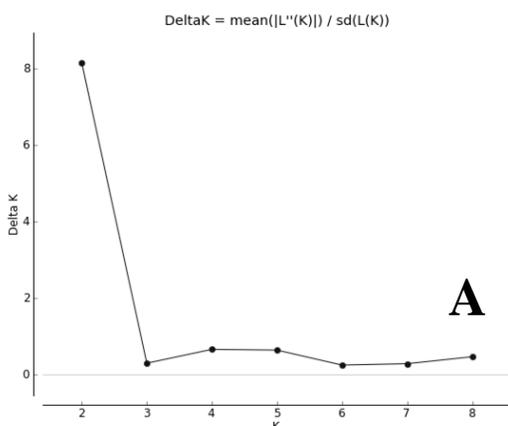
Anexo C. Índices de diversidad genética para 11 loci microsatélites de *Anoplopoma fimbria*. N tamaño de la muestra, N_E número de alelos efectivos, heterocigosidad observada y esperada (H_O y H_E respectivamente), frecuencia de alelos nulos FN y significancia estadística de la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg HWE. Con asterisco los valores significativos después de la corrección FDR. Los acrónimos correspondientes a las localidades se presentan en la Tabla II.

| Localidad | Locus | | | | | | | | | | | |
|-----------|--------|-------|--------|-------------|-------------|--------|--------------|--------|--------------|--------------|------------|--------------|
| | Afim14 | Afim1 | Afim21 | Afim23 | Afim17 | Afim10 | Afim9 | Afim28 | Afim13 | Afim32 | Afim5 | |
| KAM | N | 26 | 30 | 30 | 28 | 23 | 24 | 30 | 25 | 24 | 28 | 30 |
| | NE | 5.18 | 2.773 | 1.22 | 5.521 | 7.007 | 20.211 | 1.827 | 4.296 | 21.736 | 16 | 2.765 |
| | HO | 0.846 | 0.867 | 0.133 | 0.821 | 0.739 | 0.875 | 0.533 | 0.72 | 0.708 | 0.75 | 0.467 |
| | HE | 0.822 | 0.65 | 0.183 | 0.825 | 0.869 | 0.97 | 0.46 | 0.783 | 0.972 | 0.951 | 0.645 |
| | FN | 0 | 0 | 0.068 | 0 | 0.054 | 0.042 | 0 | 0 | 0.133 | 0.095 | 0.093 |
| | HWE | | | | | | | | * | * | | |
| NBS | N | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 29 | 30 | 27 | 29 | 30 | 30 |
| | NE | 5.279 | 2.609 | 1 | 5.341 | 10.286 | 18.899 | 2.284 | 3.582 | 15.868 | 17.476 | 2.571 |
| | HO | 0.679 | 0.5 | Monomórfico | 0.714 | 0.893 | 0.852 | 0.571 | 0.56 | 0.741 | 0.857 | 0.607 |
| | HE | 0.819 | 0.619 | Monomórfico | 0.805 | 0.899 | 0.964 | 0.564 | 0.734 | 0.947 | 0.956 | 0.634 |
| | FN | 0.049 | 0.041 | 0.001 | 0.047 | 0.012 | 0.053 | 0 | 0.104 | 0.1 | 0.044 | 0.009 |
| | HWE | | | | * | | | * | * | | * | |
| SBS | N | 25 | 26 | 26 | 26 | 26 | 25 | 26 | 24 | 22 | 26 | 25 |
| | NE | 3.87 | 3.031 | 1.124 | 5.22 | 7.86 | 15.432 | 1.957 | 3.589 | 20.167 | 19.882 | 2.119 |
| | HO | 0.64 | 0.615 | 0.115 | 0.846 | 0.731 | 0.48 | 0.577 | 0.542 | 0.818 | 0.846 | 0.32 |
| | HE | 0.744 | 0.669 | 0.112 | 0.824 | 0.885 | 0.954 | 0.498 | 0.717 | 0.961 | 0.962 | 0.539 |
| | FN | 0.056 | 0 | 0 | 0.02 | 0.074 | 0.236 | 0 | 0.095 | 0.072 | 0.051 | 0.142 |
| | HWE | | | | * | | * | | * | | | * |
| ALE | N | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 27 | 29 | 30 | 30 |
| | NE | 6.642 | 2.821 | 1.144 | 5.128 | 7.895 | 16.364 | 2.628 | 5.17 | 19.558 | 26.471 | 2.866 |
| | HO | 0.833 | 0.7 | 0.1 | 0.7 | 0.7 | 0.733 | 0.6 | 0.63 | 0.724 | 1 | 0.633 |
| | HE | 0.839 | 0.657 | 0.097 | 0.819 | 0.885 | 0.954 | 0.63 | 0.82 | 0.959 | 0.964 | 0.644 |
| | FN | 0 | 0 | 0.11 | 0.12 | 0 | 0.02 | 0.06 | 0 | 0.09 | 0.1 | 0 |
| | HWE | * | | | | * | * | | | * | | * |
| WGA | N | 29 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 28 | 30 | 30 | 30 |
| | NE | 3.967 | 2.069 | 1.142 | 5.202 | 9.524 | 20.225 | 2.503 | 3.9 | 16.071 | 21.687 | 2.442 |
| | HO | 0.655 | 0.6 | 0.067 | 0.793 | 0.759 | 0.724 | 0.433 | 0.552 | 0.828 | 0.793 | 0.5 |
| | HE | 0.788 | 0.614 | 0.066 | 0.851 | 0.897 | 0.958 | 0.519 | 0.794 | 0.951 | 0.962 | 0.586 |
| | FN | 0.046 | 0 | 0 | 0.013 | 0.08 | 0.112 | 0.071 | 0.126 | 0.056 | 0.079 | 0.045 |
| | HWE | | | | | * | * | * | * | * | | |

| | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-------|-------|--------------|-------|--------|--------------|-------|-------|--------------|--------|-------|
| CGA | N | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 29 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 |
| | NE | 4.286 | 3.046 | 1.183 | 5.294 | 8.654 | 20.024 | 2.643 | 5.882 | 14.286 | 16.667 | 2.719 |
| | HO | 0.8 | 0.667 | 0.167 | 0.767 | 0.833 | 0.724 | 0.567 | 0.733 | 0.867 | 0.967 | 0.667 |
| | HE | 0.771 | 0.683 | 0.158 | 0.811 | 0.875 | 0.964 | 0.632 | 0.832 | 0.944 | 0.954 | 0.643 |
| | FN | 0 | 0.013 | 0 | 0.03 | 0.031 | 0.119 | 0.044 | 0.045 | 0.031 | 0 | 0 |
| | HWE | | | | | * | * | | | | * | |
| EGA | N | 29 | 30 | 30 | 29 | 29 | 29 | 30 | 29 | 29 | 29 | 30 |
| | NE | 4.571 | 2.525 | 1.07 | 7.038 | 9.092 | 18.086 | 2.043 | 4.596 | 17.163 | 18.899 | 2.394 |
| | HO | 0.793 | 0.4 | 0.133 | 0.8 | 0.867 | 0.633 | 0.533 | 0.679 | 0.867 | 0.9 | 0.5 |
| | HE | 0.76 | 0.525 | 0.127 | 0.78 | 0.906 | 0.967 | 0.611 | 0.751 | 0.946 | 0.959 | 0.561 |
| | FN | 0 | 0.068 | 0 | 0 | 0.034 | 0.169 | 0.067 | 0.039 | 0.044 | 0.025 | 0.082 |
| | HWE | | | | * | * | * | | * | | | |
| CAL | N | 25 | 28 | 28 | 28 | 25 | 25 | 28 | 25 | 9 | 28 | 28 |
| | NE | 2.822 | 2.671 | 1.324 | 4.041 | 7.44 | 18.382 | 2.11 | 6.545 | 9 | 20.632 | 1.83 |
| | HO | 0.52 | 0.679 | 0.214 | 0.786 | 0.76 | 0.72 | 0.679 | 0.76 | 0.889 | 0.786 | 0.5 |
| | HE | 0.656 | 0.637 | 0.249 | 0.752 | 0.878 | 0.96 | 0.536 | 0.859 | 0.889 | 0.963 | 0.462 |
| | FN | 0.041 | 0 | 0.038 | 0 | 0.038 | 0.121 | 0 | 0.042 | 0 | 0.083 | 0 |
| | HWE | | | | | *** | ** | | | | | |
| MEX | N | 15 | 20 | 17 | 17 | 18 | 15 | 19 | 12 | 8 | 20 | 17 |
| | NE | 5.696 | 3.187 | 1.125 | 7.811 | 11.782 | 10 | 3.139 | 5.333 | 7.529 | 12.308 | 2.806 |
| | HO | 0.667 | 0.75 | 0 | 0.765 | 0.833 | 0.933 | 0.895 | 0.75 | 0.625 | 0.85 | 0.765 |
| | HE | 0.824 | 0.686 | 0.111 | 0.872 | 0.915 | 0.9 | 0.681 | 0.813 | 0.867 | 0.919 | 0.644 |
| | FN | 0.064 | 0 | 0.161 | 0.083 | 0.035 | 0 | 0 | 0.013 | 0.139 | 0.028 | 0 |
| | HWE | * | | * | * | | * | * | | | | |

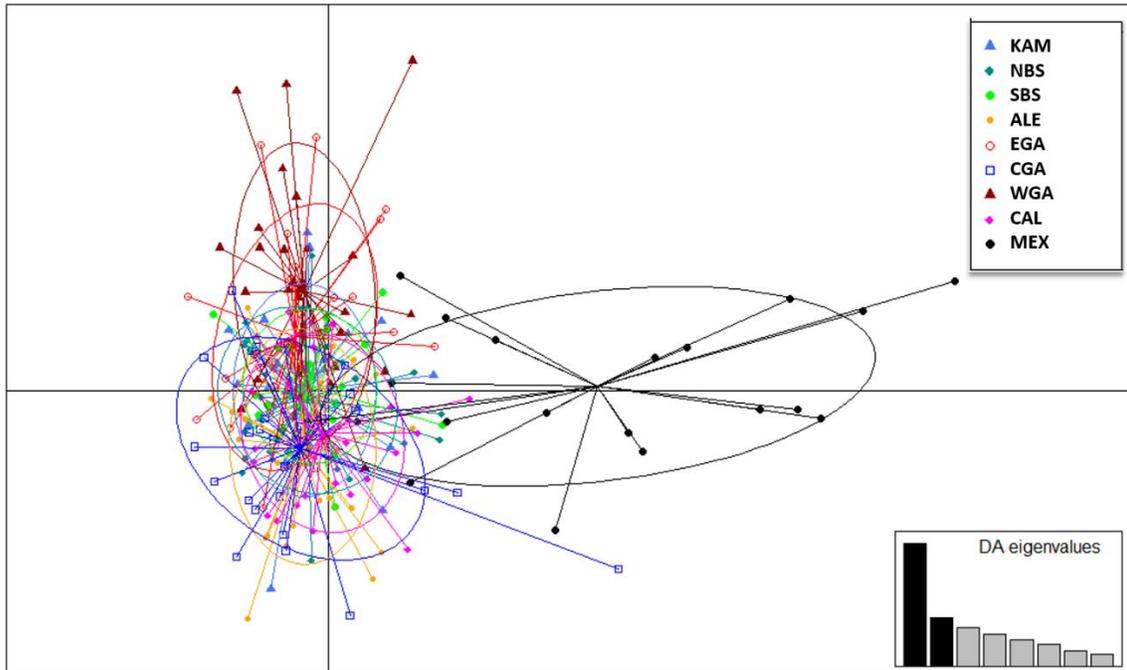


Anexo D. Numero de K inferidas por STRUCTURE empleando 11 loci microsatelites. A) Valores de delta K como función de K B) Media y desviación estándar de lnP (D) como función del valor de K.



Anexo E. Numero de K inferidas por STRUCTURE empleando 8 loci microsatelites. A) Valores de delta K como función de K (DeltaK = 8.1556. B) Media y desviación estándar de lnP (D) como función del valor de K (-6368.4). C) Grafico obtenido de CLUMPP cada línea presentan un individuo y cada color la porción asignación a cada grupo inferido.

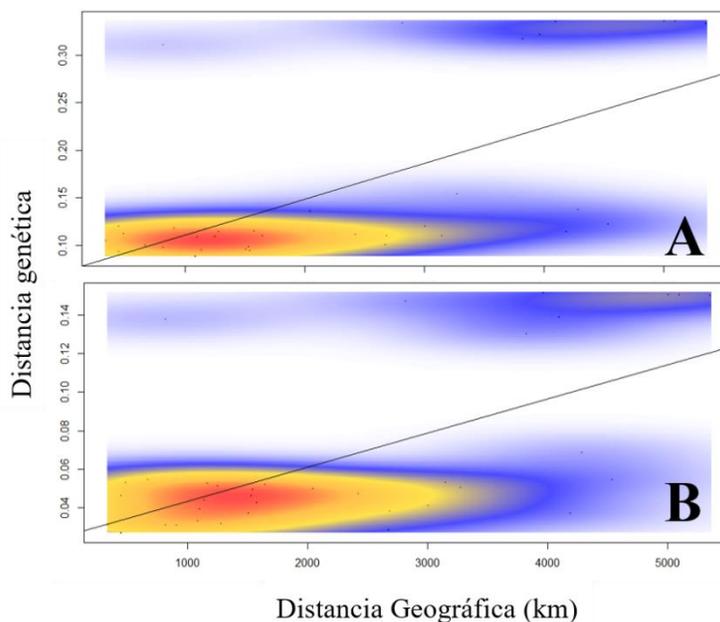
Anexo F. El diagrama de ordenación a partir de un Análisis Discriminante de Componentes Principales (ADCP) empleando la base 8L de *Anoplopoma fimbria* (Número de componentes retenidos, PC: 40; Numero de discriminantes, DA: 8; proporción de varianza conservada: 0.900). Los sitios de colecta se muestran con diferentes colores y estilo de puntos. Los puntos representan individuos y el recuadro inferior derecho muestra los valores propios (eigenvalues) de los ocho componentes de mayor magnitud resaltando en negro los usados para realizar los gráficos. Los acrónimos correspondientes a las localidades se presentan en la Tabla II.



Anexo G. Valores de F_{ST} obtenidos con 11 loci microsatélites de *Anoplopoma fimbria*. Diagonal inferior F_{ST} , diagonal Superior G'_{ST} (Hedrick, 2005). Los acrónimos correspondientes a las localidades se presentan en la Tabla II.

| | RK | NBS | SBS | ALEU | EGA | CGA | WGA | CAL | MEX |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| KAM | 0 | 0.014 | 0.007 | 0.014 | 0.027 | 0.027 | 0.007 | 0.027 | 0.135 |
| NBS | 0.002 | 0 | 0 | 0.007 | 0.000 | 0.034 | 0.007 | 0.014 | 0.149 |
| SBS | 0.001 | 0.000 | | 0.027 | 0.020 | 0.027 | 0.000 | 0.014 | 0.155 |
| ALEU | 0.002 | 0.001 | 0.004 | | 0.014 | 0.020 | 0.014 | 0.054 | 0.128 |
| EGA | 0.004 | 0.000 | 0.003 | 0.002 | | 0.034 | 0.020 | 0.034 | 0.155 |
| CGA | 0.004 | 0.005 | 0.004 | 0.003 | 0.005 | | 0.027 | 0.027 | 0.122 |
| WGA | 0.001 | 0.001 | 0.000 | 0.002 | 0.003 | 0.004 | | 0.041 | 0.142 |
| CAL | 0.004 | 0.002 | 0.002 | 0.008 | 0.005 | 0.004 | 0.006 | | 0.135 |
| MEX | 0.020 | 0.022 | 0.023 | 0.019 | 0.023 | 0.018 | 0.021 | 0.020 | |

Anexo H. Aislamiento por distancia en *Anoplopoma fimbria*. Gráfico correspondiente a la base 8L. En el eje X las distancias geográficas (km) y en el eje Y la distancia genética. La línea negra continua representa la línea de regresión entre la distancia geográfica y la genética. El gradiente de color de azul claro a rojo indica la densidad de los puntos que también se muestran en el fondo del gráfico. A) Distancia Cavalli-Sforza ($R^2= 0.623$ y $p= 0.008$) B) Distancia de Nei ($R^2= 0.6205$ y $p= 0.004$).



Anexo I. Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) realizado con 8 loci microsatélites de *Anoplopoma fimbria*. Porcentaje de variación de diferentes niveles jerárquicos de las hipótesis puestas a prueba. Los acrónimos correspondientes a las localidades se presentan en la Tabla II.

| Estructura analizada | Fuente | df | % | Estadístico F | p |
|--|-----------------------|-----------|----------|----------------------|----------|
| Hipótesis 1 Panmixia | Entre Pops | 8 | 2% | | |
| | Dentro Pops | 495 | 98% | | |
| | Total | 503 | 100% | 0.015 | 0.000 |
| Hipótesis 2 2 grupos 1) MEX 2) CAL A KAM y Mar de Bering (SBS y NBS) | Entre regiones | 1 | 5% | 0.047 | 0.000 |
| | Entre Pops | 7 | 1% | 0.007 | 0.000 |
| | Dentro Pops | 495 | 95% | 0.054 | 0.000 |
| | Total | 503 | 100% | | |
| Hipótesis 3 3 grupos 1) MEX 2) CAL-KAM 3) Mar de Bering (SBS y NBS) | Entre regiones | 2 | 2% | 0.015 | 0.000 |
| | Entre Pops | 6 | 1% | 0.008 | 0.000 |
| | Dentro Pops | 495 | 98% | 0.023 | 0.000 |
| | Total | 503 | 100% | | |
| Hipótesis 4 2 grupos Grupo 1: KAM A EGA y Mar de Bering Grupo 2: CAL Y MEX | Entre regiones | 1 | 1% | 0.010 | 0.000 |
| | Entre Pops | 7 | 1% | 0.012 | 0.000 |
| | Dentro Pops | 495 | 98% | 0.022 | 0.000 |
| | Total | 503 | 100% | | |
| Hipótesis 5 3 grupos Grupo 1: Mar de Bering (SBS y NBS) Grupo2: KAM A EGA Grupo 3: MEX-CAL | Entre regiones | 2 | 0% | 0.004 | 0.008 |
| | Entre Pops | 6 | 1% | 0.013 | 0.000 |
| | Dentro Pops | 495 | 98% | 0.017 | 0.000 |
| | Total | 503 | 100% | | |

ANEXO J. Red de haplotipos estimada mediante el algoritmo Median Joining usando la región D-Loop del ADNmt de *Anoplopoma fimbria*. Cada nodo representa un haplotipo de secuencia de ADNmt único donde cada color representa una localidad de muestreo y el tamaño del círculo indica la frecuencia. Las longitudes de las líneas que conectan haplotipos y su distancia esta medida en pasos mutacionales (líneas transversales). Los nodos rojos son haplotipos no observados inferidos por el programa. Los acrónimos correspondientes a las localidades se presentan en la Tabla II.

