



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

Programa de Estudios de Posgrado

**Genómica poblacional de la sardina monterrey  
*Sardinops sagax* (Jenyns, 1842) en la costa oeste de la  
Península de Baja California y el Golfo de California**

TESIS

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

**Cecilia Judith Hid Coronel**

La Paz, Baja California Sur, Febrero 2020

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 14 del Mes de febrero 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:

**"Genómica poblacional de la sardina monterrey *Sardinops sagax* (Jenyns, 1842) en la costa oeste de la Península de Baja California y el Golfo de California "**

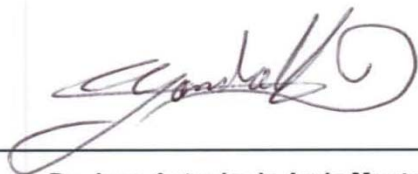
Presentada por el alumno:

**Cecilia Judith Hid Coronel**

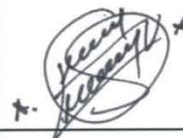
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Biología Marina**

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. Juan Antonio de Anda Montañez  
Co-Director de Tesis



Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez  
Co-Director



Dra. Crisalejandra Rivera Pérez  
Co-Tutor



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

## **Conformación de Comités**

### **Comité Tutorial**

Dr. Juan Antonio de Anda Montañez  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.  
Co-Director de Tesis

Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez  
CONACyT - Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.  
Co-Director de Tesis

Dra. Crisalejandra Rivera Pérez  
CONACyT - Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.  
Co-Tutora de Tesis

### **Comité Revisor de Tesis**

Dr. Juan Antonio de Anda Montañez  
Dra. Crisalejandra Rivera Pérez  
Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez

### **Jurado de Examen**

Dr. Juan Antonio de Anda Montañez  
Dra. Crisalejandra Rivera Pérez  
Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez

### **Suplente**

Dr. Ricardo Pérez Enriquez

## Resumen

El manejo de los recursos pesqueros requiere la identificación de las poblaciones (stocks) y su distribución espacial. Sin embargo, los métodos tradicionales de identificación de stock, normalmente no consideran la estructura genética poblacional, ni la potencial influencia de la selección natural como factor para generar adaptaciones locales. No obstante, la amalgama de poblaciones y grupos con adaptación local (*biocomplejidad*), determina la capacidad de resiliencia y prevalencia de los recursos marinos. La sardina monterrey (*Sardinops sagax*) se distribuye a lo largo de la Corriente de California y dentro del Golfo de California, y es parte de la pesquería de pelágicos menores, la cual es llevada a cabo en la costa occidental de la Península de Baja California (PBC) y en el Golfo de California (GC). La pesquería de pelágicos menores es la más relevante a nivel nacional en términos de volumen. Diversas aproximaciones derivan en hipótesis con la presencia de entre una (genética) a tres (fenotipos) poblaciones de sardina monterrey en la región, lo que genera incertidumbre del número de stocks. El presente estudio tuvo como objetivo identificar su estructura genómica poblacional considerando los grupos con potencial adaptación local. Se colectaron 139 muestras provenientes de las tres localidades (Ensenada, Bahía Magdalena y Guaymas), y se llevó a cabo el análisis de su estructura neutral y adaptativa. En total, se obtuvieron 5,166 marcadores tipo SNPs, de los cuales 4,881 fueron loci neutrales y 8 se consideraron loci candidatos a selección (*outliers*). El análisis de los marcadores neutrales indica una estructura de tipo panmixia, mientras que el estudio de marcadores *outliers* sugiere la existencia de dos grupos con adaptación local, uno en la costa occidental de la PBC y el otro dentro del GC. Esto indica que la hipótesis prevaleciente de tres stocks es resultado del efecto de la plasticidad fenotípica. Asimismo, se brindan elementos para ser considerados por los administrados en el plan de manejo del recurso.

**Palabra clave:** *genómica poblacional, SNPs, dd-RAD, Sardinops sagax.*

---

Vo.Bo

Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez  
Co-Director de Tesis

---

Vo.Bo

Dr. Juan Antonio de Anda Montañez  
Co-Director de Tesis

## Summary

Fisheries management requires the accurate identification of populations (stocks) and its spatial distribution. However, traditional methods in stock identification don't consider population genetic structure and the potential influence of natural selection to promote local adaptation. Although, the amalgam of populations and local adapted groups (*biocomplexity*) determines the resilience capacity and prevalence. The monterrey sardine (*Sardinops sagax*) inhabits along the California Current and the Gulf of California. It is part of the small pelagics fishery, performed at the west coast of the Baja California Peninsula (BCP) in the Gulf of California (GC). The small pelagic fishery represent the most important fishery by catch volume in Mexico. There are several hypothesis of the number of populations of monterrey sardine from one (genetic) to three (phenotypic) raising concern about the real stock composition. The aim of this study was to determine the genomic population structure considering groups with potential local adaptation. Samples (139 organisms) were used from three localities (Ensenada, Bahía Magdalena and Guaymas) for neutral and adaptive population structure analysis. A total of 5,166 SNPs markers were obtained, of which 4,881 were considered as neutral loci and eight as candidate adaptive loci (*outliers*). Neutral markers obtained suggested a panmictic population structure, while the study of *outliers* markers suggest the existence of two groups with local adaptation, one in the west coast of the BCP and other one inside the GC. Results indicate that the prevailing hypothesis of three stocks is result of phenotypic plasticity rather than population structure. Furthermore, this research give insights to be considered for stakeholders in the management plan of the fishery.

**Keywords:** *population genomics, SNPs, dd-RAD, fisheries, Sardinops sagax.*

---

Vo.Bo  
Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez  
Co-Director de Tesis

---

Vo.Bo  
Dr. Juan Antonio de Anda Montañez  
Co-Director de Tesis

## Dedicatoria

A la memoria de mi abuela, porque sí me mantuvo el gobierno.

## **Agradecimientos**

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. por contribuir en mi formación académica mediante el programa de Estudios de Posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada (Becario 635017).

Al proyecto Ciencia Básica 2015-01-257524 “Paisaje genómico en el medio marino: patrones de diversidad adaptativa” por el financiamiento que permitió llevar a cabo este trabajo.

A mi comité tutorial, Dr. Juan Antonio de Anda Montañez, Dra. Crisalejandra Rivera Pérez y Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez por la motivación y el aprendizaje brindado siempre con paciencia, dedicación e interés.

A la Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra encargada del laboratorio de Genética Molecular por el espacio otorgado para la realización de este proyecto y la M. C. Delia Rojas Posadas por sus enseñanzas y entrenamiento técnico.

A la Dra. Gabriela Mendoza Carrión por su apoyo en la elaboración de librerías y Dra. Karina Alejandra Vázquez por el asesoramiento en bioinformática.

Al personal del departamento de posgrado, Lic. Osvelia Ibarra Morales, Lic. Leticia González Rubio, Tania Núñez y el Lic. Horacio Sandoval por mostrarse siempre en la mejor disposición de apoyarnos ante cualquier duda o inconveniente.

A los chicos de genómica de poblaciones: Jorge, Camila, Paulina, Paulo, Vero y Ale por la constante retroalimentación durante las distintas etapas en la realización de mi tesis.

A mis compañeros de generación por su valiosa amistad y el tiempo compartido.

A mi familia por todo su apoyo incondicional, en especial a mis padres, Elvia y César, que me brindaron siempre las herramientas, motivación y confianza para lograr lo que me proponga, gracias por creer en mí.

## Contenido

<b>Resumen</b> .....	i
<b>Summary</b> .....	ii
<b>Dedicatoria</b> .....	iii
<b>Agradecimientos</b> .....	iv
<b>Contenido</b> .....	vi
<b>Lista de figuras</b> .....	viii
<b>Lista de tablas</b> .....	ix
<b>Abreviaturas</b> .....	x
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	3
2.1 Concepto de población y stock.....	3
2.2 Genómica poblacional.....	5
2.3 Genómica poblacional en pesquerías .....	6
2.4 Genómica en pelágicos menores.....	7
2.5 Sardina monterrey .....	8
2.5.1 Identificación de stocks de sardina monterrey .....	9
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	13
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	14
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	15
5.1 Objetivo General .....	15
5.2 Objetivos Específicos .....	15
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	16
6.1 Trabajo de campo .....	16
6.2 Trabajo de laboratorio .....	17
6.2.1 Extracción de ADN.....	17
6.2.2 Elaboración de librerías .....	17
6.3 Análisis de información .....	20
6.3.1 Filtrado de datos de secuenciación.....	20
6.4 Análisis de datos genómico poblacionales .....	23



6.4.1 Detección de outliers .....	23
6.4.2 Marcadores en Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) .....	23
6.4.3 Diversidad genética .....	24
6.5 Estructura genómica poblacional .....	24
<b>7. RESULTADOS</b> .....	<b>26</b>
7.1 Trabajo de Laboratorio.....	26
7.1.1 Extracción de ADN.....	26
7.1.2 Elaboración de librerías .....	27
7.2 Análisis de información .....	29
7.2.1 Control de calidad de librería .....	29
7.2.2 Filtrado de datos de secuenciación.....	30
7.3 Obtención de marcadores <i>outliers</i> y neutrales .....	31
7.3.1 Detección de marcadores <i>outliers</i> .....	31
7.3.2 Marcadores en Equilibrio de Hardy-Weinberg .....	34
7.4 Diversidad genética .....	34
7.5 Diferenciación y estructura poblacional .....	35
7.5.1 Estructura genómica neutral .....	35
7.5.2 Estructura genómica <i>outliers</i> .....	39
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	<b>45</b>
8.1 Obtención de genotipos .....	45
8.2 Detección de marcadores candidatos a selección ( <i>outliers</i> ) .....	47
8.3 Estructura genómica poblacional .....	48
8.3.1 Estructura poblacional con marcadores neutrales .....	48
8.3.2 Estructura poblacional con marcadores <i>outliers</i> .....	49
8.4 Implicaciones para el manejo de la sardina monterrey como recurso pesquero .....	53
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	<b>56</b>
<b>10. LITERATURA CITADA</b> .....	<b>57</b>



## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Mapa de las localidades de muestreo para el presente estudio. ....	16
<b>Figura 2.</b> ADN genómico extraído de tres individuos diferentes de sardina monterrey ( <i>Sardinops sagax</i> ). M: Escalera GeneRuler™ 1kb. En los carriles 1, 2 y 3 se observan tres bandas que corresponden a ADN íntegro y de alto peso molecular. ....	26
<b>Figura 3.</b> Amplificación por PCR de los pools obtenidos para la inserción del index. Las flechas señalan un producto de ~400 pb. M: Escalera GeneRuler™ 1kb. Los carriles 1-4 corresponden a los pools de la tabla I. ....	28
<b>Figura 4.</b> Análisis de control de calidad de la librería mediante electroforesis capilar. Los picos representan fragmentos de diferente tamaño (pb) (eje de las x), la altura representa la cantidad en fluorescencia (eje de las y). a) Librería enviada, b) Librería después de la purificación. ....	29
<b>Figura 5.</b> Detección de marcadores SNP candidatos a selección para la sardina monterrey ( <i>Sardinops sagax</i> ). A) Bayescan. Después de la línea se muestran los marcadores considerados <i>outliers</i> de acuerdo a sus indicadores de $F_{ST}$ , con una probabilidad de $p \leq 0.05$ . B) ARLEQUIN. Para cada locus se muestra la heterocigocidad observada en la población total sobre el eje de las x, mientras que el eje de las y representa el nivel observado de $F_{ST}$ . Los puntos en color negro se distribuyen en el cuantil del 10% con un nivel de $p > 0.05$ . Los puntos en color azul se encuentran en el cuantil del 5% con un nivel de $p \leq 0.05$ . Por último, los puntos en color rojo se encuentran en el cuantil del 1% con un nivel de $p \leq 0.01$ , estos últimos corresponden a los marcadores considerados como <i>outliers</i> . ....	33
<b>Figura 6.</b> Análisis Discriminante de Componentes Principales (ADCP) para marcadores neutrales de sardina monterrey. Se retuvieron un total de 20 componentes principales. Cada elipse representa una localidad (ENS = Ensenada, BM = Bahía Magdalena, GC = Golfo de California) mientras que los puntos representan a los individuos que corresponden a cada una de ellas. ....	36

## Lista de tablas

<b>Tabla I.</b> Número de individuos que incluye cada pool e índice empleado para su identificación. ....	27
<b>Tabla II.</b> Concentraciones obtenidas para cada pool y el volumen utilizado de cada uno en la librería final. ....	28
<b>Tabla III.</b> Secuencias obtenidas y retenidas por process_radtags. ....	30
<b>Tabla IV.</b> Valores considerados en las pruebas de optimización para ejecutar denovo_map.pl ....	31
<b>Tabla V.</b> Evaluación de la heterocigocidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ) para la sardina monterrey ( <i>Sardinops sagax</i> ) utilizando dos grupos de marcadores diferentes: Neutrales (4881 SNPs) y Outliers (8 SNPs). ....	34
<b>Tabla VI.</b> Análisis de diferencias pareadas para el grupo de marcadores neutrales (4,881 SNPs) de la sardina monterrey ( <i>Sardinops sagax</i> ). Por debajo de la diagonal se muestran los valores de $F_{ST}$ para cada comparación, mientras que por arriba de la diagonal se encuentra el respectivo de probabilidad. ....	36
<b>Tabla VII.</b> Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) de marcadores neutrales (4,881 SNPs) de sardina monterrey ( <i>Sardinops sagax</i> ), bajo el supuesto de tres hipótesis de agrupamiento, donde ENS = Ensenada, BM = Bahía Magdalena, GC = Golfo de California. En negritas se muestran los valores significativos ( $p \leq 0.05$ ). ....	38
<b>Tabla VIII.</b> Análisis de diferencias paradas para el grupo de marcadores outliers de la sardina monterrey ( <i>Sardinops sagax</i> ). Por debajo de la diagonal se muestran los valores de $F_{ST}$ para cada comparación mientras que por encima de la diagonal se encuentra el respectivo valor de $p$ . Los valores significativos para $p \leq 0.05$ se muestran en sombreado, mientras que aquellos significativos de acuerdo al ajuste de Bonferroni ( $\alpha \leq 0.016$ ) se muestran en negritas. ENS: Bahía de Ensenada B.C., BM: Bahía Magdalena, B.C.S., GC: Golfo de California. ....	40
<b>Tabla IX.</b> Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) de marcadores outliers de sardina monterrey ( <i>Sardinops sagax</i> ) bajo el supuesto de tres hipótesis de agrupamiento. En negritas se muestran los valores significativos ( $p \leq 0.05$ ). ENS: Ensenada, B.C., BM: Bahía Magdalena, B.C.S., GC: Golfo de California. ....	43

**Abreviaturas**

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADCP	Análisis Discriminante de Componentes Principales
dd-RADseq	Doble digestión asociada a sitios de restricción
EHW	Equilibrio de Hardy-Weinberg
$F_{ST}$	Índice de fijación de Wright (1943)
GC	Golfo de California
$H_e$	Heterocigosidad esperada
$H_o$	Heterocigosidad observada
PBC	Península de Baja California
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido

## 1. INTRODUCCIÓN

La genómica poblacional estudia las variaciones a nivel del genoma completo de las especies, esto permite diferenciar entre las poblaciones que las conforman. Se diferencia de la genética poblacional debido a que explora una mayor cobertura del genoma, esto permite la detección de un mayor número de loci, sin limitarse a aquellos de naturaleza neutral, sino que también es posible identificar loci adaptativos u *outliers*, los cuales potencialmente se encuentran bajo influencia de la selección natural, esto permite establecer una asociación entre la distribución geográfica de las poblaciones y las variables ambientales a las que están sujetas (Luikart *et al.*, 2003). Por esta razón, la genómica poblacional ha sido implementada en estudios con especies marinas, ya que al no existir barreras físicas que impidan el entrecruzamiento de los individuos, las barreras que limitan el flujo genético pueden depender de su capacidad de adaptarse a las condiciones ambientales del medio en el que se desarrollan (Waples, 1998; Baldwin, 2012; Stanley *et al.*, 2018; Teske *et al.*, 2019).

Este es el caso de la sardina monterrey (*Sardinops sagax*), un pez pelágico pequeño que se caracteriza por realizar largas migraciones en un amplio rango de distribución a lo largo de la costa norteamericana en el Océano Pacífico y dentro del Golfo de California (Culley, 1971; Parrish, 1989), y que, además de tener un papel ecológico importante en las redes tróficas, es un recurso pesquero muy valioso para Canadá, Estados Unidos, y particularmente en México, donde el 60% de la producción total en pesquerías está soportada por pelágicos menores, entre los cuáles la sardina monterrey es la más abundante (Martínez-Porchas, 2007).

La importancia de la sardina como recurso pesquero ha despertado el interés por entender la dinámica poblacional de la especie, de tal manera que la delimitación de sus poblaciones permita establecer stocks pesqueros y medidas de manejo adecuadas para su aprovechamiento. Sin embargo, pese a las diversas metodologías que se han venido utilizando con esta finalidad (Baldwin *et al.*,

2012), ya desde las primeras décadas del siglo XX, no se ha podido establecer un acuerdo sobre el número de unidades poblacionales (stocks) de sardina monterrey que existen a lo largo de su distribución. A pesar de las diversas aproximaciones para la definición de stocks en la región como estudios de morfometría (Felix-Uraga, 2005; Cruz-Agüero y García-Rodríguez, 2005), análisis de capturas y temperatura (Felix-Uraga, 2015) y marcadores moleculares (Hedgecock *et al.*, 1989; Lacomte *et al.*, 2004; Gutiérrez-Flores, 2007; García-Rodríguez *et al.*, 2011), ha derivado en resultados discrepantes e incertidumbre acerca de sí, las conclusiones son producto del efecto de la variación fenotípica y no poblaciones aisladas reproductivamente.

Otra incertidumbre asociada a los estudios con marcadores moleculares aplicados a este recurso (aloenzimas, ADNmt, microsátélites), es que no han contado con la suficiente resolución para detectar niveles sutiles de diferenciación genética, y no se ha considerado la diversidad adaptativa para entender la composición espacial de la diversidad genómica de este recurso pesquero (Hedgecock *et al.*, 1989; Lacomte *et al.*, 2004; García-Rodríguez *et al.*, 2011).

Existen evidencias en otras regiones del mundo que el enfoque genómico poblacional puede brindar una mayor precisión en la identificación de stocks de pelágicos menores (Lamichhanet *et al.*, 2012; Corander *et al.*, 2013; Le Moan *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2016). Por esta razón, la genómica poblacional podría ser una alternativa que brinde resultados más precisos de la caracterización espacial de la(s) población(es) (stock(s)) de sardina monterrey a lo largo de su distribución.

El presente estudio sobre la genómica poblacional de la sardina monterrey, se realiza con la finalidad de inferir la estructuración genética neutral y con potencial adaptativo entre individuos de diferentes localidades dentro y fuera del Golfo de California, así como identificar las variables ambientales asociadas que delimitan su distribución.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Concepto de población y stock

El concepto de población es crucial por las implicaciones que tiene como unidad biológica en términos ecológicos, evolutivos y de conservación, sin embargo, es difícil llegar a un acuerdo que defina la palabra en términos cuantitativos, de tal forma que pueda aplicarse por igual en las distintas áreas del conocimiento, de las cuales es objeto de estudio, lo que dificulta comparar los resultados de los diversos análisis (Waples y Gaggiotti, 2006). Sin embargo, el uso de marcadores moleculares y el desarrollo de nuevos métodos estadísticos favorecen el estudio de las poblaciones, su identificación y delimitación.

Existen diversas metodologías para llevar a cabo la identificación de stocks, como el estudio de su historia de vida (densidad, abundancia), análisis morfológicos (morfometría, merística, estructuras calcáreas), señalización ambiental (marcas biológicas, composición de otolitos, perfil de ácidos grasos), análisis genéticos (morfología de cromosomas, aloenzimas, marcadores de ADN mitocondriales y nucleares) y marcas aplicadas (marcaje interno/externo, marcaje electrónico) (Cadrin *et al.*, 2014). La elección de la metodología más adecuada para la identificación de stocks dependerá del panorama bajo el que éste se defina.

Los esfuerzos por llegar a un acuerdo respecto a la definición del concepto de stock, se remontan al siglo XIV ante la necesidad de delimitar aquellas poblaciones o grupos de individuos que sean de interés como recursos aprovechables, y por lo tanto, requieran la aplicación legal de medidas de manejo (Booke, 1999). Sin embargo, no fue sino hasta 1980 que se llevó a cabo el primer simposio internacional (Stock Concept International Symposium), que tuvo como objetivo establecer una definición formal que pudiese aplicarse de manera



universal en las diversas líneas de investigación que tienen al stock como objeto de estudio (Dizon *et al.*, 1992; Booke, 1999).

Entre las ideas compartidas en el simposio, destacan las propuestas por Booke (1981), quien enfatiza en que la correcta delimitación de los stocks requiere hacer uso de marcadores cuantificables que, independientemente de su naturaleza, se conserven sin mayor variación en el tiempo para todas sus aplicaciones. En este sentido, el autor reconoce que los marcadores empleados en la identificación de stocks serán más confiables si son basados en ADN, lo que le lleva a definir el concepto de stock desde el punto de vista genotípico, como una población de peces que se encuentra bajo equilibrio de Hardy-Weinberg, de tal forma que sus frecuencias génicas permanecen constantes. El concepto de stock propuesto por Booke es similar a las definiciones dadas por otros autores bajo el punto de vista de la genética (Larkin, 1972; Hozel y Dover, 1989), y que poco después fue usado por Sinclair (1988) para definir lo que es una población local.

Además, si la caracterización genotípica no es posible, Booke propone definir el stock bajo el concepto fenotípico, como un grupo o población que mantiene características que se expresan de acuerdo al ambiente que habiten. Este concepto fue empleado por primera vez por Heincke (1898) para hacer distinción entre grupos de la anchoveta (*Clupea harengus*), y más tarde en el salmón del pacífico (*Oncorhynchus gorbuscha*) por Ricker (1972) mediante análisis merísticos y morfométricos, sin embargo, el uso de marcadores fenotípicos podría derivar en una incorrecta identificación de los stocks si no se tiene el entendimiento respecto a la forma en que se heredan dichas características (Booke, 1999).

El presente trabajo se desarrolla bajo el concepto genético de stock propuesto por Booke (1981), y además contempla la evaluación de loci *outliers* para intentar elucidar grupos con potencial adaptativo como se explica en la siguiente sección.

## 2.2 Genómica poblacional

La genómica poblacional estudia las variaciones del genoma completo en los organismos con la finalidad de entender el efecto de la microevolución en la historia de vida de sus poblaciones (Luikart, 2003). El grado de divergencia genética entre los individuos de una misma especie varía en las distintas regiones del genoma, ya que éstas se encuentran conservadas en mayor o menor medida, por lo que la genómica poblacional se basa en el análisis de un gran número de loci (en el rango de cientos de miles e incluso millones) distribuidos a lo largo de todo el genoma, de manera que permite no sólo identificar marcadores neutrales correspondientes a las regiones genómicas que sólo se ven afectadas por los efectos de la migración, mutación y deriva génica, sino también las regiones que se consideren loci *outliers*, es decir, que de presentar una diferencia significativa entre sus frecuencias alélicas esperadas contra las observadas se considere la probabilidad de que estén bajo el efecto de la selección natural y en consecuencia se encuentren ligados a caracteres que determinen su capacidad de adaptación al medio en el que viven de acuerdo a las variables ambientales que le caractericen (Luikart, 2003). A estos loci se les conoce comúnmente como *outliers* o loci adaptativos (Ruggeri *et al.*, 2015).

Las librerías genómicas de baja representación (RAD, ddRAD, 2bRAD, GBS) acopladas a las herramientas de secuenciación masiva, posibilita la identificación de miles de marcadores moleculares tipo Polimorfismos de un Sólo Nucleótido o SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) (Davey, 2011). Los SNPs se encuentran tanto en regiones codificantes como no codificantes a lo largo del genoma, son de carácter codominante y tienen la ventaja de que pueden ser utilizados en diversas especies, aún sin tener un genoma de referencia (Morin, 2004; Schlöterer, 2004).

Estudios de genómica poblacional se han llevado a cabo en diversas especies de peces marinos alrededor del mundo, detectando niveles divergencia poblacional en algunos casos donde previamente no se habían detectado (Milano *et al.*, 2014;

Hecht *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2016; Carreras *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2018). Inclusive, otros estudios encuentran homogeneidad genética en la parte neutral del genoma (elevado flujo), pero detectan niveles significativos de divergencia poblacional con marcadores *outliers* (candidatos a selección), lo que posiblemente implica una papel preponderante de la selección natural como modelador de la diversidad genómica (André *et al.*, 2011; Bekkevold *et al.*, 2015; Cure *et al.*, 2016; Ruggeri *et al.*, 2016). Tanto en los estudios donde se encuentra diferenciación en la parte neutral y adaptativa, así como en aquellos donde sólo se encuentra en la parte adaptativa del genoma, los loci candidatos a selección se asocian a gradientes ambientales, principalmente respecto a los parámetros de temperatura superficial, salinidad, o ambos (Milano *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2016; Ruggeri *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2018).

### **2.3 Genómica poblacional en pesquerías**

Los estudios poblacionales de genoma completo se han vuelto de particular interés ante el reconocimiento de que los análisis limitados a las regiones neutrales del genoma, permiten muy poco entendimiento del efecto adaptativo al cambio ambiental sobre la micro-evolución, que en especies sujetas al aprovechamiento comercial es influenciada también por la selección deliberada de los fenotipos/genotipos deseados (Nielsen *et al.*, 2009).

La genómica se ha convertido en una valiosa herramienta en el estudio de las pesquerías, ya que nos permite entender la biocomplejidad de las poblaciones o sistemas que son objeto de estudio, es decir, de qué manera interactúan los factores biológicos, demográficos y ambientales para determinar el potencial de resiliencia de las especies, y determinar así, cuáles son las medidas requeridas para asegurar un manejo sustentable del recurso (Ruggeri *et al.*, 2016).

## 2.4 Genómica en pelágicos menores

Las pesquerías de pelágicos menores son de importancia a nivel mundial debido a los grandes volúmenes de captura que se obtienen de esta actividad derivados de los tamaños poblacionales grandes que regularmente se observa en este tipo de especies. Sin embargo, esta y otras características como los movimientos migratorios estacionales que realizan y las fases pelágicas durante el desarrollo larvario, dificultan la detección de una diferenciación genética, y en consecuencia la identificación de sus stocks, así como el establecimiento de medidas de manejo adecuadas para su aprovechamiento (Guo *et al.*, 2016).

El arenque del atlántico (*Clupea harengus*) es una especie de pez pelágico que se caracterizaba por la ausencia de diferenciación poblacional entre las distintas regiones geográficas en las que se distribuye al llevar a cabo estudios con marcadores genéticos neutrales, sin embargo, en el año 2012 fue propuesta como especie modelo en estudios de genómica poblacional en pelágicos menores por Lamichhaney *et al.* (2012), al utilizar un mayor número de marcadores tanto neutrales como candidatos a selección.

En sus resultados, encuentran que el análisis neutral del genoma soporta la hipótesis de homogeneidad genética propuesta anteriormente por otros autores, sin embargo, al enfocarse en un reducido grupo de marcadores *outliers*, observaron una diferenciación entre dos regiones caracterizada por presentar distintos niveles de salinidad: la región del Atlántico y la región del Mar Báltico, pero no encuentran una diferenciación significativa entre las localidades muestreadas que se incluyen dentro de cada una de estas regiones.

Los resultados de este estudio son relevantes pues soportan lo propuesto por Lineo (1761), quien consideró al arenque del Mar Báltico como una subespecie (*Clupea harengus membras*) del arenque del Atlántico (*Clupea harengus*) en base

a las distintas características morfológicas que presentan, pues la subespecie del Mar Báltico es de menor tamaño y presenta un menor contenido de grasa.

Años más tarde, estos resultados fueron confirmados por Guo *et al.* (2016) al realizar un estudio que comprendió las mismas regiones geográficas, pero incluía un mayor número de localidades y de marcadores genómicos, donde no se encontraron niveles significativos de diferenciación con marcadores neutrales, pero sí con marcadores adaptativos.

Otro ejemplo de pelágicos menores de importancia comercial en los que se han llevado a cabo estudios de diferenciación genómica poblacional es la anchoveta europea (*Engraulis encrasicolus*). Le moan *et al.* (2016) comprobaron la hipótesis propuesta anteriormente con base a datos morfológicos sobre la existencia de dos ecotipos distintos (uno costero y otro marino), identificados para esta especie en el Océano Atlántico y el Mar Mediterráneo utilizando marcadores genómicos neutrales y adaptativos. Los dos ecotipos se caracterizaron por habitar en regiones con una marcada heterogeneidad ambiental. Posteriormente, Catanese *et al.* (2017) corroboraron este hallazgo al repetir el estudio abarcando una mayor área geográfica.

## **2.5 Sardina monterrey**

La sardina monterrey (*Sardinops sagax*) también conocida como sardina del Pacífico o de California es un pez pelágico pequeño que realiza grandes migraciones a lo largo de su distribución en la costa del Océano Pacífico, que abarca desde el sureste de Alaska hasta la Península de Baja California, y el interior del Golfo de California (Culley, 1971; Parrish, 1989). La sardina monterrey tiene un papel ecológico importante, ya que al desplazarse a lo largo de una amplia área geográfica sirve como alimento a diversas especies de peces, aves y

mamíferos marinos. Además, la sardina representa un recurso pesquero relevante para Canadá, Estados Unidos y México (Martínez-Porchas, 2007).

El aprovechamiento de la sardina monterrey se remonta a las primeras décadas del siglo XX en Canadá y Estados Unidos, la cual comercializaban en su presentación enlatada. En esos países, la pesca de sardina empezó a disminuir durante los años 40's hasta desaparecer (Martínez-Porchas, 2012), lo que despertó el interés científico por entender las causas de este colapso (Radovich, 1982). Una de las hipótesis más aceptadas en ese momento sugería una potencial sobreexplotación en la zona (Radovich, 1982). Sin embargo, al estudiar los sedimentos depositados en el fondo marino (correspondientes a restos antiguos de huesos, otolitos y escamas), determinaron que la abundancia y presencia de la sardina había presentado fluctuaciones importantes durante los últimos dos siglos, cuando la pesquería de sardina no era implementada aún, y registró al menos una docena de colapsos en casi 2000 años (Soutar e Isaacs, 1969). A raíz de esto, surge la necesidad de investigar más la dinámica poblacional de la especie, con la finalidad de entender los procesos que determinan sus características demográficas, y usar este conocimiento como herramienta para establecer mejores medidas de manejo para el aprovechamiento del recurso (Martínez-Porchas, 2007). Desde entonces, se han empleado diversas metodologías en el intento de dilucidar la cantidad de stocks de sardina disponibles a lo largo de su distribución. A raíz de estos estudios, surge una gran polémica en cuanto al número de stocks existentes, las inferencias van desde la existencia de una sola población hasta tres grupos poblacionales diferentes (Hubbs, 1925; Hedgecock, 1989; Felix-Uraga *et al.*, 2004; Felix-Uraga, 2005; Cruz-Agüero y García-Rodríguez, 2005).

### **2.5.1 Identificación de stocks de sardina monterrey**

Desde los inicios de la pesquería de sardina, se reconocía la existencia de sólo una población a lo largo de toda su distribución (Hubbs, 1925). Los primeros estudios realizados con el propósito de encontrar diferenciación que sugiriera la posible existencia de dos o más poblaciones, se basaron en diferencias merísticas y morfométricas asociadas a la variación de la temperatura a lo largo del rango de distribución de la especie. Tomando como base que en peces el número de vértebras está determinado por la temperatura del medio, Hubbs (1925) realizó un conteo total de vértebras para diferenciar grupos de sardinas cuya distribución a lo largo de la costa de California, E.U.A., considera dos regiones con dos localidades cada una, la primera, en la parte central de California comprende la Bahía de San Francisco y la Bahía de Monterey, mientras que la segunda, con una ubicación más sureña, incluye San Pedro y San Diego. En este estudio, pese a encontrar diferencias significativas respecto al número de vértebras que presentan los individuos de ambas regiones, el autor menciona que las diferencias entre los individuos de las localidades sureñas son aún más significativas, por lo que se concluye, que no puede asumirse una distinción real entre las dos regiones contempladas en el estudio, pero tampoco puede negarse.

Esta metodología fue empleada nuevamente por Clark (1947) en un estudio poblacional que incluyó individuos colectados en distintas localidades a lo largo de la distribución total de la especie repartidas en cinco regiones: Noroeste del Pacífico (Sur de Alaska-Oregon), California (Bahía de Humboldt-San Diego), Norte de la Península de Baja California (frontera entre México y Estados Unidos-Punta San Eugenio), Sur de la Península de Baja California (Bahía Magdalena) y el Golfo de California, que incluye además, Cabo San Lucas, en Baja California Sur, donde se determinó que las sardinas encontradas desde Columbia Británica, en Canadá, hasta Punta San Eugenio en B.C.S., México, se componen de una mezcla de poblaciones que posiblemente utilicen las localidades dentro de ese rango para el desarrollo de las etapas juveniles, de tal forma que, la mayor contribución a la población provienen del grupo de California y el Norte de la Península de Baja

California. Además, sugiere que las sardinas que habitan al sur de la Península de Baja California y al interior del Golfo de California posiblemente conforman un grupo independiente cuyo aporte a las poblaciones norteñas sería escaso o nulo. Este último supuesto, es soportado posteriormente por diversos autores en estudios donde se compararon las tallas de los organismos colectados con respecto a su edad, encontrando diferencias entre aquellos capturados en localidades norteñas con respecto a las del sur, siendo estos últimos más pequeños que los primeros a edades similares (Phillips, 1948; Vrooman, 1964; Hedgecock, 1989).

Félix-Uraga *et al.* (2004) realizaron un estudio con base a los volúmenes de captura y temperaturas registradas durante los años 1981-2002 en cuatro localidades diferentes (San Pedro, Ensenada, Isla Cedros y Bahía Magdalena). Sus resultados sugieren la existencia de tres poblaciones de sardina separadas por barreras térmicas distribuidas a lo largo de la Corriente de California y dentro del Golfo de California, y suponen además, que las tres realizan migraciones hacia el norte en verano y hacia el sur durante el invierno. Esta hipótesis sobre la presencia de tres poblaciones es soportada un año después en dos estudios diferentes mediante el análisis morfométrico de otolitos (Felix-Uraga, 2005; Cruz-Agüero y García-Rodríguez, 2005).

Ante la hipotética existencia de tres poblaciones diferentes de sardina que presentan variaciones fenotípicas entre ellas y viven bajo la influencia de gradientes de temperatura a lo largo de su rango de distribución, surge la necesidad de incursionar en la búsqueda de diferenciación a nivel genético. Los primeros en evaluarlo fueron Sprague y Vrooman (1962) mediante el estudio de reacciones cruzadas de antígenos de eritrocitos llevado a cabo en sardinas provenientes de ocho localidades que van desde Monterey, California hasta Bahía Magdalena, B.C.S., donde sugieren la existencia de al menos dos poblaciones de sardina monterrey, una norteña que comprende cinco localidades: Monterey, Bahía Morro, San Pedro, San Diego y Ensenada, pudiendo desplazarse al sur



hasta la Bahía de San Quintín, B.C.S., y una sureña que incluye las localidades San Sebastián Vizcaíno y Bahía Magdalena, pudiendo llegar hasta San Diego, California, como límite norteño de su distribución.

Sin embargo, dos décadas después (Hedgecock *et al.* 1989) implementaron por primera vez el uso de aloenzimas como marcadores moleculares para estudiar la genética poblacional de la sardina monterrey en dos áreas geográficas dentro de su distribución, California (Bahía Tomal, Bahía Monterey, Playa Huntington y San Pedro) y México (Bahía Magdalena, B.C.S. y Guaymas, Sonora), donde no se detectó un grado de diferenciación significativo entre las localidades ni regiones comprendidas como para suponer la existencia de más de una población, y propone que las diferencias morfológicas encontradas anteriormente por otros autores son evidencia de la alta plasticidad fenotípica de la especie y no de una verdadera diferenciación genética. Esta idea fue respaldada años después por diversos autores al analizar secuencias mitocondriales correspondientes a la región control (García-Rodríguez, 2011), los genes citocromo b (Lacomte *et al.*, 2004), NAD5 y NAD6, además de marcadores de tipo microsatélite (Gutiérrez-Flores, 2007).

Las evidencias de estudios genómico poblacionales aplicados a pelágicos menores anteriormente mencionados, soportan la posibilidad de detectar niveles sutiles de diferenciación genética, tanto neutral como adaptativa, y permiten poner a prueba las hipótesis actuales del número de stocks de sardina monterrey en el noroeste de México. Por lo tanto, este estudio tiene como finalidad utilizar marcadores genómicos para identificar una estructuración poblacional en la especie, ya sea neutral y/o adaptativa, que delimite los stocks establecidos para la región.

### 3. JUSTIFICACIÓN

En México, la pesquería de pelágicos menores representa la mayor proporción (37%) de las capturas totales de todas las pesquerías en el país, y se lleva a cabo a lo largo del Golfo de California y el litoral del Océano Pacífico. El destino de las capturas de estos organismos no se limita al consumo humano, sino que también se utiliza en la producción de alimento para animales domésticos y carnada en los diferentes tipos de pesca, lo que involucra la generación de hasta 5,000 empleos directos y casi la misma cantidad de indirectos (SAGARPA, 2014). Entre las especies objetivo de esta pesquería, la sardina monterrey es la especie más importante (Cisneros-Mata *et al.*, 1991) al representar el 54.8% de las capturas.

Al ser un recurso tan importante para el país en términos alimenticios, económicos y sociales, es necesario identificar con certeza los stocks existentes dentro del rango distribución de la especie con el propósito de implementar medidas de manejo que aseguren la sostenibilidad de la pesquería y evitar la sobreexplotación.

En este sentido, la genómica poblacional podría ofrecer soluciones a la definición de stocks que, pese a que se ha venido abordando con diversas metodologías desde las primeras décadas del siglo pasado, los resultados obtenidos no han sido concluyentes.

#### 4. HIPÓTESIS

Dado que los estudios poblacionales llevados a cabo en la sardina monterrey (*Sardinops sagax*) no han encontrado pruebas de diferenciación genética, pese a observar una marcada heterogeneidad fenotípica asociada a la diversidad ambiental de la región en la que se distribuye, se espera encontrar evidencia de alto flujo genético poblacional sin descartar la detección de niveles de divergencia adaptativa que expliquen la diferenciación morfológica detectada previamente bajo la luz de la plasticidad fenotípica.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo General**

Delimitar los stocks de sardina monterrey (*Sardinops sagax*) existentes en la costa oeste de la Península de Baja California y al interior del Golfo de California.

### **5.2 Objetivos Específicos**

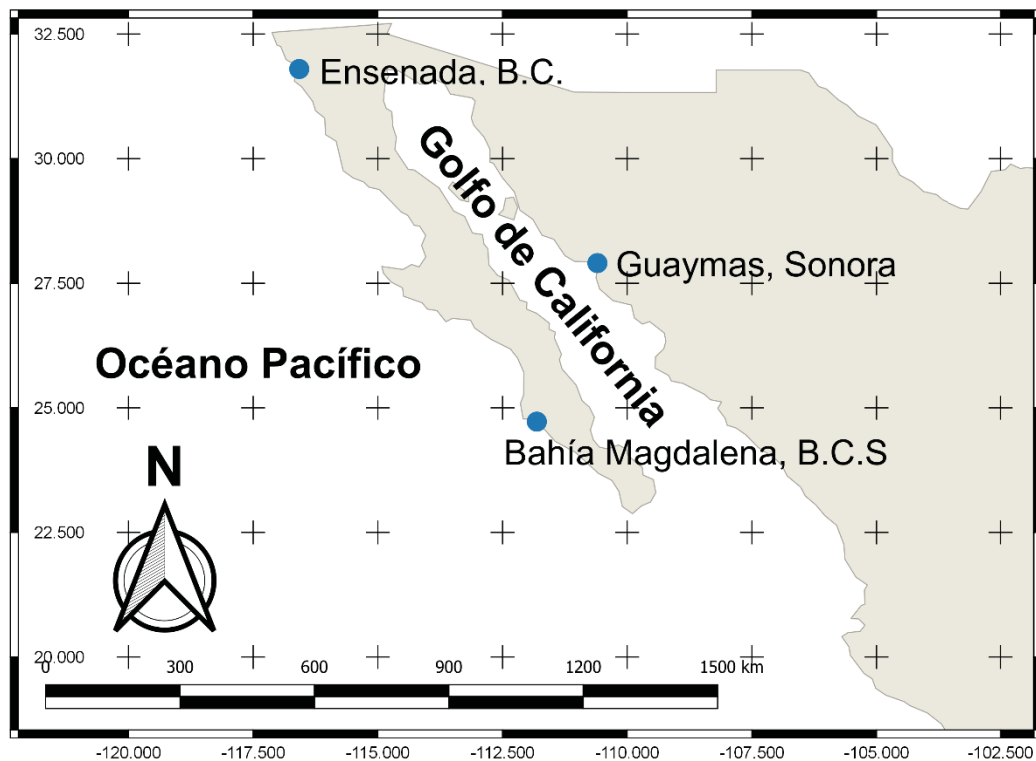
Determinar la estructura poblacional neutral de la sardina monterrey en la costa oeste de la Península de Baja California y al interior del Golfo de California.

Determinar la estructura con potencial adaptativo de la sardina monterrey en la costa oeste de la Península de Baja California y al interior del Golfo de California.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Trabajo de campo

El muestreo de organismos se llevó a cabo en dos localidades dentro del Golfo de California pertenecientes al estado de Sonora (Guaymas) y dos más en la costa noroeste del Océano Pacífico (Ensenada, B.C. y Bahía Magdalena, B.C.S.) (Figura 1). La colecta consistió en una muestra de tejido de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> preservada en etanol al 96% para su traslado al laboratorio en microtubos con tapa de rosca.



**Figura 1.** Mapa de las localidades de muestreo para el presente estudio.

Se obtuvo una muestra de un total de 184 organismos de los cuales  $n = 47$  proceden del puerto de Ensenada, B.C.,  $n = 60$  de puerto Bahía Magdalena, La

Paz, B.C.S. y el resto (n= 74) fueron colectadas en cinco lances diferentes dentro del Golfo de California.

## **6.2 Trabajo de laboratorio**

### **6.2.1 Extracción de ADN**

Se procesaron entre 10 y 20 mg de tejido usando el método Cloroformo-Alcohol Isoamílico 24:1 de Sambrook y Russell (2001). El ADN recuperado fue cuantificado por fluorimetría mediante Qubit 4 (Thermo Scientific®). Posteriormente, se evaluó la calidad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa-synergel al 1% utilizando 5 µl de cada muestra, se empleó SYBR Gold como intercalante para su visualización en un fotodocumentador ChemiDoc™ (Bio-Rad).

### **6.2.2 Elaboración de librerías**

Se llevó a cabo mediante la técnica de Secuenciación de ADN Asociado a la Restricción de Doble Digestión (dd-RADseq por sus siglas en inglés), descrita por Peterson *et al.* (2012) con algunas modificaciones.

#### *Digestión*

Se digirió el material genómico, previamente extraído, con dos enzimas de restricción, EcoRI-HF (5'-G/AATTC-3') y MspI (5'-C/CGG-3'), para obtener fragmentos de menor tamaño. Cada reacción de digestión se llevó a cabo en un volumen total de 30 µl, conteniendo 500 ng de ADN, 10 U totales de cada enzima de restricción, 1X Buffer CutSmart® (Acetato de Potasio 50 mM, Tris-acetato 20mM, Acetato de Magnesio 10 mM, BSA 100 µg/ml, pH 7.9) y 0.1X buffer TE

(Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 0.1 mM). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente por doce horas para asegurar la digestión del material genético.

#### *Purificación de ADN con perlas*

Los productos de la digestión se purificaron con 1.5X AMPure XP Beads (Beckman Coulter®), realizándose dos lavados con 150 µl etanol grado molecular al 70% y siendo finalmente eluidos en 30 µl de 0.1X TE.

#### *Ligación de adaptadores*

De acuerdo a la técnica de dd-RADseq, se emplearon dos diferentes adaptadores denominados P1 y P2. El adaptador P1 es complementario al corte de la enzima EcoRI y contiene una secuencia corta de ADN llamada *barcode* (código de barra) que permite la identificación de los individuos dentro de un pool. El adaptador P2 es complementario al corte de la enzima MspI y se empleó para todos los individuos.

La ligación de los adaptadores a los fragmentos de ADN se realizó en reacciones con un volumen total de 40 µl dentro de los cuales se incluyen: ADN previamente digerido (500 ng) y purificado, 2 µM de Adaptador P1 y 1X Master Mix de Ligación (1X Buffer T4 Ligasa, 100 U T4 ADN Ligasa, 0.1 µM Adaptador P2). La reacción fue incubada por doce horas a temperatura ambiente y finalmente inactivada a 65 °C por diez minutos. Una vez ligados los adaptadores, se realizó una segunda purificación con perlas, para eliminar los adaptadores no ligados, siguiendo el protocolo antes descrito.

Para corroborar que la ligación fue exitosa, se llevó a cabo una reacción de PCR utilizando los iniciadores Primer Illumina Forward: PCR1 (5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACG-3') y Primer Illumina Reverse: PCR2\_idx\_1\_ATCACG (5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGTGATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTG C-3'). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 12.5 µl que contiene 1 µl de ADN ligado purificado, 1X de ADN Polimerasa GoTaq® (1X

Buffer Green GoTaq® pH 8.5, dNTPs 200 µM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 µM) y 0.8 mM de cada primer. El programa de PCR se llevó a cabo en un termociclador Biorad T100 bajo las siguientes condiciones: 94 °C, 2 min (1 ciclo), 94 °C por 30s, 60 °C por 30s, 72 °C por 45s (20 ciclos) y un ciclo a 72 °C por 10 min. Los productos de PCR se visualizaron en gel de agarosa-synergel al 2% utilizando 5 µl por cada muestra. El gel fue teñido con SYBR gold para su visualización en un fotodocumentador ChemiDoc™ (Bio-Rad), se consideró que la ligación fue exitosa en aquellas reacciones donde se observó un barrido en el gel.

#### *Elaboración de los Pools*

Una vez corroborada la correcta ligación de los adaptadores, los productos purificados de la ligación se cuantificaron en Qubit 4 (Thermo Scientific®). Posteriormente, se prepararon pools de 48 individuos usando 30 ng de ADN de cada individuo.

Posteriormente, se llevó a cabo una purificación con perlas para concentrar cada pool, usando una proporción de 1.5X AMPure XP Beads con respecto al volumen del pool, llevando a cabo un solo lavado con 500 µl de etanol al 70% y eluyendo en 30 µl de 0.1X TE. De cada pool se seleccionaron aquellos con fragmentos de 376 pb ± 50 mediante Pippin Prep™ (Sage Science).

#### *Enriquecimiento de fragmentos y adición de índice*

Para diferenciar entre pools, se hizo una amplificación de PCR usando un cebador PCR2\_idx\_1\_ATCACG (index) complementario al adaptador P2. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl por reacción, conteniendo: 3 µl ADN de pool previamente purificado, 1X Buffer Phusion HF, 0.4 µM dNTPs, 0.5 µM Primer Illumina F (PCR1), 0.5 µM Primer Illumina R (Tabla I) y 0.5 U de polimerasa TAQ Phusion ADN polymerase (NEB®). Las condiciones de PCR consistieron en: 94 °C por 2 min (1 ciclo), 94 °C por 30s, 60 °C por 30s, 72 °C por 45s (10 ciclos). Los productos de amplificación se purificaron con AMPure XP Beads y los productos purificados se separaron por electroforesis en gel de



agarosa al 2% utilizando 5 µl de cada muestra, posteriormente fue empleó SYBR gold para visualizarlo en un fotodocumentador ChemiDoc™ (Bio-Rad). El tamaño de los fragmentos obtenidos fue ~475 pb (300 pb ADN + 76 pb de *barcodes* + 53 pb PCR2+ 46 pb PCR1index).

Los pools enriquecidos fueron cuantificados con Qubit 4 (Thermo Scientific®) para combinarlos a una concentración de ~0.5 ng/µl, dando lugar a la librería final. Esta librería se concentró nuevamente utilizando perlas AMPure XP Beads en una proporción 1.5X con respecto al volumen de la librería final, se realizaron dos lavados con etanol al 70% para finalmente eluir en un volumen de 30 µl de 0.1X TE. Las librerías finales fueron enviadas a Novogene® (EE.UU.) para ser secuenciadas en un secuenciador Illumina Hiseq X con lecturas pareadas de 150 pb.

## 6.3 Análisis de información

### 6.3.1 Filtrado de datos de secuenciación

Las secuencias crudas obtenidas fueron filtradas con el pipeline Stacks 2.2 (Catchen et al. 2011), para la identificación de marcadores SNPs y la construcción de loci a partir de secuencias cortas.

Los datos crudos de la librería, comprimidos en formato FASTQ, fueron demultiplexados. Para esto, se ejecutó el programa *process\_radtags*, que reconoce la secuencia *barcode* en cada fragmento y las agrupa de acuerdo al individuo al que pertenecen. Simultáneamente, se eliminaron las secuencias de baja calidad de acuerdo al Phred score (< 10). Posteriormente, los individuos que retuvieron menos de 750,000 lecturas fueron eliminados para los pasos posteriores.

Una vez que las secuencias se ordenaron por muestra, se llevó a cabo la detección de alelos y ensamble de loci utilizando el programa **denovo\_map.pl**, que no requiere un genoma de referencia. El programa se divide en cinco componentes que se ejecutan de manera individual, los primeros dos están controlados por parámetros que requieren ser optimizados para cada conjunto de datos en específico. El primer componente (**ustacks**) se encarga de la identificación de SNPs y construcción de loci a nivel de los individuos y está regido por dos parámetros principales, el parámetro **-m** corresponde a la profundidad de cobertura y nos indica el número de secuencias idénticas que se requieren para formar los alelos putativos, mientras que el parámetro **-M** hace referencia al número máximo de diferencias puntuales permisibles entre dos alelos para conformar un loci putativo, para este trabajo se asignó un valor de 3 para ambos parámetros (**-m 3 -M 3**). El segundo componente (**cstacks**) crea un catálogo que incluye los alelos y loci presentes en toda la población de acuerdo a lo detectado en las muestras individuales. Para esto, se especificó mediante el parámetro **-n = 4**, el cual, es el número de diferencias puntuales permisibles entre las secuencias de dos individuos para ser consideradas parte del mismo loci en la población.

Para calcular la diversidad genética poblacional (heterocigosidad observada/esperada, diversidad nucleotídica, índice de fijación) se empleó el programa **-populations** que calcula parámetros de diversidad genética poblacional para cada sitio nucleotídico. Para estos análisis, se tomó en cuenta sólo el primer SNP de cada locus especificando la opción **--write\_single\_snp**, además se consideró que la frecuencia del alelo menor debía ser de al menos 5% (**--min\_maf > 0.05**) y que un locus debe encontrarse en al menos el 80% de los individuos para ser considerado como tal dentro de una misma población (**-r = 0.8**), además de encontrarse presente en la totalidad de las poblaciones que contempla el estudio (**-p = 3**). Por último, se empleó el programa VCF tools v.3.0 (Danecek et al. 2011) para identificar y descartar a los individuos que tuviesen una pérdida de información mayor al 20%.



## 6.4 Análisis de datos genómico poblacionales

### 6.4.1 Detección de outliers

La detección de marcadores candidatos a selección (o loci *outliers*) se llevó a cabo mediante dos aproximaciones diferentes con los programas ARLEQUIN 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010) y BayeScan (Foll y Gaggiotti, 2008).

Para este fin, ARLEQUIN ejecuta simulaciones coalescentes sobre los valores específicos de  $F_{ST}$  observados para cada locus, que puedan ser o no candidatos a *outliers* de acuerdo a los valores globales de  $F_{ST}$  observados. Esta aproximación asume un modelo jerárquico de islas y se llevó a cabo bajo los parámetros predeterminados sugeridos por el programa que consiste en 100,000 simulaciones y 100 repeticiones por grupo. En este caso, se consideraron como marcadores *outliers* aquellos que presentan una distribución de  $F_{ST}$  con un valor de  $p < 0.01$ .

Por otro lado, Bayescan utiliza un método bayesiano (Beaumont y Balding 2004) que descompone los coeficientes de  $F_{ST}$  en un componente locus específico, denominado alfa y uno específico poblacional, llamado beta. Los valores positivos de alfa indican una selección positiva para un locus en específico. Este análisis se ejecutó utilizando los parámetros predeterminados sugeridos por el programa, 20 corridas piloto de 5000 iteraciones de calentamiento seguidas de 5000 iteraciones. En este caso, se consideraron como marcadores *outliers* aquellos que presentaron una probabilidad superior al 95% ( $p < 0.05$ ).

### 6.4.2 Marcadores en Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW)

El equilibrio de Hardy-Weinberg se alcanza en las poblaciones cuando las frecuencias alélicas en las mismas se mantienen constantes en el tiempo al cumplirse los siguientes supuestos: números poblacionales grandes, la

reproducción entre los individuos es al azar, tres de las cuatro fuerzas evolutivas no se encuentran actuando sobre la población: mutación, migración y selección natural.

Para determinar cuáles de nuestros marcadores se encuentran en EHW se ejecutó la función `hw.test` implementada en el paquete `adegenet` v2.1.1 (Jombart et al. 2008) en R v6.3.1 (R Core Team 2008) utilizando 10,000 permutaciones y la corrección FDR. Al final, se descartaron aquellos marcadores que no se encontraban en equilibrio en al menos dos de las tres localidades contempladas, y el resto de los marcadores constituyeron el ser de marcadores neutrales.

### **6.4.3 Diversidad genética**

El análisis de diversidad genética, Heterocigocidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ), para cada una de las bases de datos obtenidas (marcadores neutrales y marcadores adaptativos), se llevó a cabo utilizando el paquete `adegenet` v2.1.1 en R v3.6.1 para determinar los valores de la población total mientras que se utilizó el programa ARLEQUIN para estimar la diversidad genética para cada localidad.

### **6.5 Estructura genómica poblacional**

Se determinó la estructura poblacional mediante estimaciones de  $F_{ST}$ , Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC, por sus siglas en inglés), Análisis de Clústers (Structure) y Análisis de Varianza Molecular (AMOVA, por sus siglas en inglés). Estos análisis se llevaron a cabo para el grupo de marcadores neutrales y *outliers*.

Las estimaciones de  $F_{ST}$  para identificar una divergencia entre poblaciones mediante comparaciones pareadas entre heterocigocidad observada de cada población fue llevada a cabo en el programa Arlequin v 3.5 (Excoffier y Lischer,

2010). Valores de cero indica que las poblaciones son idénticas y uno indica que son totalmente diferentes y se encuentran aisladas entre sí.

Para identificar el número de grupos o *clusters* existentes genéticamente diferenciados, se realizó un Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC, por sus siglas en inglés). Para ello, se requirió conocer previamente un número de posibles agrupaciones ( $k$ ). El DAPC se llevó a cabo usando el paquete *adegenet* (Jombart et al. 2008) del programa R v6.3.1 (R Core Team 2018).

También se ejecutó el programa STRUCTURE (Pritchard et al. 2014), para asignar a cada individuo la probabilidad de pertenecer a una u otra de ellas mediante un modelo de inferencia bayesiana. Para esto, el modelo asume que los loci se encuentran en equilibrio de ligamiento, es decir, que se heredan de forma independiente, y bajo los cuatro supuestos de Hardy-Weinberg: 1) la población es panmíctica, 2) el número poblacional es grande, 3) la población no se encuentra bajo los efectos de la migración, mutación o selección natural, y por último, 4) las frecuencias alélicas y genotípicas se mantienen constantes en el tiempo.

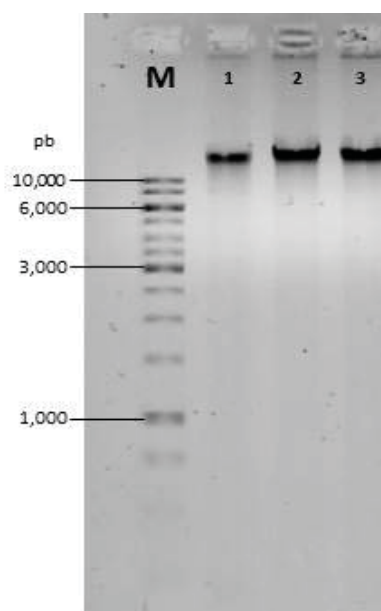
Una vez establecida una diferenciación poblacional entre los diferentes grupos, AMOVA nos permite entender de qué manera se encuentra distribuida la diversidad genética a diferentes niveles jerárquicos de organización. Este tipo de análisis requiere agrupar las poblaciones que se sospecha podrían encontrarse más relacionadas entre sí. Para esto se consideraron tres hipótesis: (1) un solo grupo que incluye a las tres poblaciones hipotéticas; (2) dos grupos, uno incluyendo a las poblaciones de Ensenada y San Carlos y el otro grupo compuesto únicamente por los individuos del Golfo de California y el último escenario (3) considerando también dos grupos, donde la localidad de Ensenada se encuentre aislada de las demás.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Trabajo de Laboratorio

#### 7.1.1 Extracción de ADN

Se extrajo ADN de XX individuos. La calidad del ADN fue en promedio de 2.0, y la integridad de las muestras se visualizó tras una corrida de electroforesis utilizando 300 ng de material genómico. En la figura 2, se observa una muestra representativa de ADN íntegro extraído de algunas de las muestras obtenidas, la ausencia de barrido indica que el material extraído no está degradado y por lo tanto es apto para llevar a cabo los siguientes pasos.



**Figura 2.** ADN genómico extraído de tres individuos diferentes de sardina monterrey (*Sardinops sagax*). **M:** Escalera GeneRuler™ 1kb. En los carriles **1**, **2** y **3** se observan tres bandas que corresponden a ADN íntegro y de alto peso molecular.

### 7.1.2 Elaboración de librerías

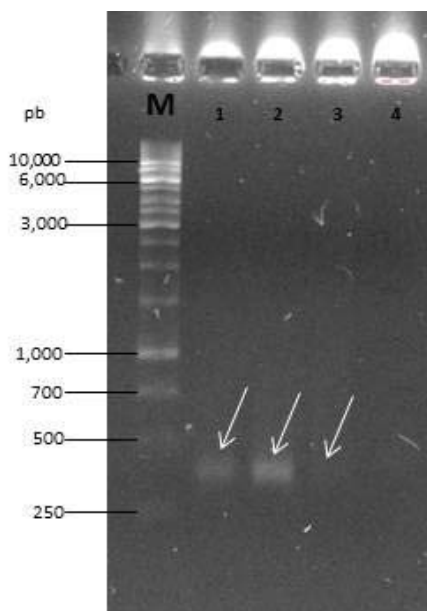
El material genómico obtenido fue procesado y combinado en cuatro diferentes pools, que a su vez conforman la librería. La librería incluyó 144 individuos, cada uno incluye una secuencia (índex) para identificar el pool al que pertenece (Tabla I).

**Tabla I.** Número de individuos que incluye cada pool e índex empleado para su identificación.

<b>Pool</b>	<b>Número de Individuos</b>	<b>Índex utilizado</b>
1	48	PCR2_idx_1_ATCACG
2	47	PCR2_idx_5_ACAGTG
3	36	PCR2_idx_3_TTAGGC
4	13	PCR2_idx_4_TGACCA

El tamaño de los fragmentos esperados posterior a la adición del *índex* fue de de 475 pb, como se puede apreciar en la figura 3. Los productos de PCR para la adición del *índex* fueron cuantificados por fluorescencia (Tabla II) y posteriormente, se emplearon 27.50 ng de ADN de cada pool y se combinaron para formar una sola librería final, que contenía los fragmentos a secuenciar de cada individuo en una concentración de 2.5 ng/ $\mu$ l en un volumen final de 32.57  $\mu$ l





**Figura 3.** Amplificación por PCR de los pools obtenidos para la inserción del index. Las flechas señalan un producto de ~400 pb. **M:** Escalera GeneRuler™ 1kb. Los carriles **1-4** corresponden a los pools de la tabla I.

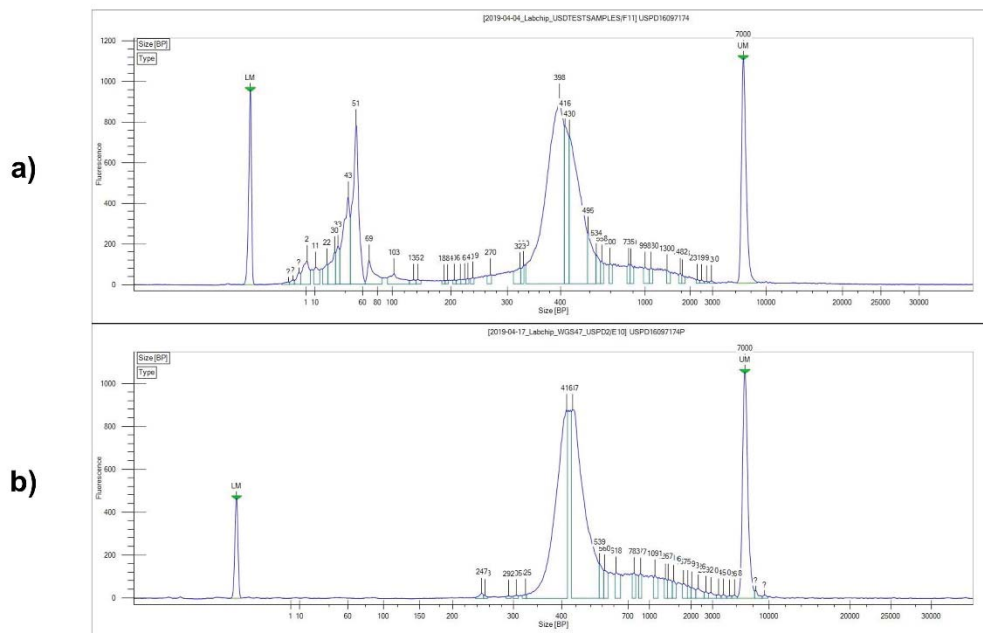
**Tabla II.** Concentraciones obtenidas para cada pool y el volumen utilizado de cada uno en la librería final.

Pool	Concentración (ng/μl)	Masa por pool (ng)	Volumen requerido (μl)
1	2.5	27.5	11
2	4.45		6.18
3	2.8		7.37
4	1		8.08

## 7.2 Análisis de información

### 7.2.1 Control de calidad de librería

Previo a la secuenciación de la librería, se realizó un análisis de control de calidad mediante electroforesis capilar en Bionalyzer (Agilent) por parte de Novogene para detectar la presencia de contaminación de dímeros y/o fragmentos fuera del rango de lo esperado (~400 pb). La librería fue purificada para eliminar fragmentos de bajo peso molecular (dímeros) considerados contaminantes (Figura 4).



**Figura 4.** Análisis de control de calidad de la librería mediante electroforesis capilar. Los picos representan fragmentos de diferente tamaño (pb) (eje de las x), la altura representa la cantidad en fluorescencia (eje de las y). a) Librería enviada, b) Librería después de la purificación.

### 7.2.2 Filtrado de datos de secuenciación

Al ejecutar el programa *process\_radtags* se obtuvieron 739,851,244 lecturas de secuenciación, de las cuales se conservaron 690,384,547, que corresponde al 93.31% del total después del demultiplexado (Tabla III). La mayor parte de las secuencias descartadas se debió a barcodes y RAD-Tags ambiguos (3.7% y 2.9%, respectivamente) y una menor cantidad a secuencias de baja calidad (0.06%).

**Tabla III.** Secuencias obtenidas y retenidas por *process\_radtags*.

	<b>Lecturas</b>	<b>% del total</b>
Total	739,851,244	100
Barcodes ambiguos	27,378,272	3.7
Baja Calidad	452,838	0.06
RAD-Tags ambiguos	21,632,587	2.9
Retenidas	690,384,547	93.3

Del total de 144 individuos incluidos en la librería, se eliminaron cinco que contaban con menos de 750,000 lecturas retenidas, restando 139 individuos para proceder. El procesamiento con *denovo\_map.pl* y *populations* se rige por distintos parámetros, cuyos valores se asignan llevando a cabo pruebas con sus distintas combinaciones y se selecciona la óptima (tabla IV). Al final se identificaron un total de 3,633 loci presentes en las tres poblaciones contempladas y 5,166 sitios variables (SNPs).

**Tabla IV.** Valores considerados en las pruebas de optimización para ejecutar `denovo_map.pl`

Prueba	PARÁMETROS			COBERTURA (X)			LOCI	Sitios Variantes
	m	M	n	Promedio	Mínimo	Máximo		
1	3	3	3	44.49	7.32	93.61	3,624	5,099
2	4	3	3	54.4	9.68	116.88	3,073	4,219
3	5	3	3	61.67	12.05	133.68	2,649	3,559
4	3	2	2	43.07	7.11	91.04	3,816	5,313
5	3	4	4	45.31	7.44	95.15	3,407	4,662
6	3	5	5	45.74	7.52	95.79	3,291	4,498
7	3	6	6	46.01	7.57	96.15	3,216	4,355
8	3	3	2	44.49	7.32	93.61	3,577	4,945
9	3	3	4	44.49	7.32	93.61	3,633	5,166
10	3	3	5	45.74	7.52	95.79	3,649	5,284

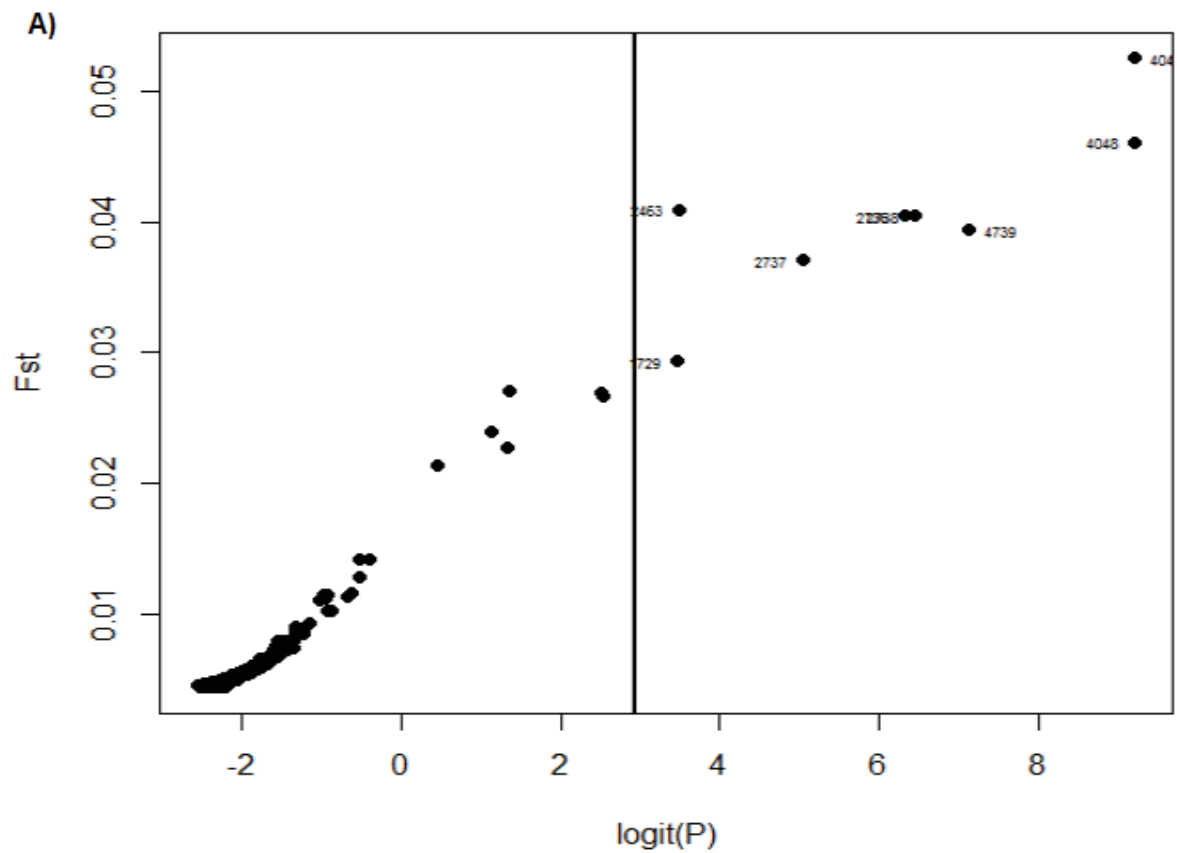
Finalmente, después del filtrado con VCF tools, se identificaron cinco individuos con >20% de datos faltantes, los cuales fueron descartados. Por lo tanto, de los 139 individuos, la base de datos final contó con 134 individuos para llevar a cabo los análisis de diversidad y estructura poblacional, así como la detección de outliers.

### 7.3 Obtención de marcadores *outliers* y neutrales

#### 7.3.1 Detección de marcadores *outliers*

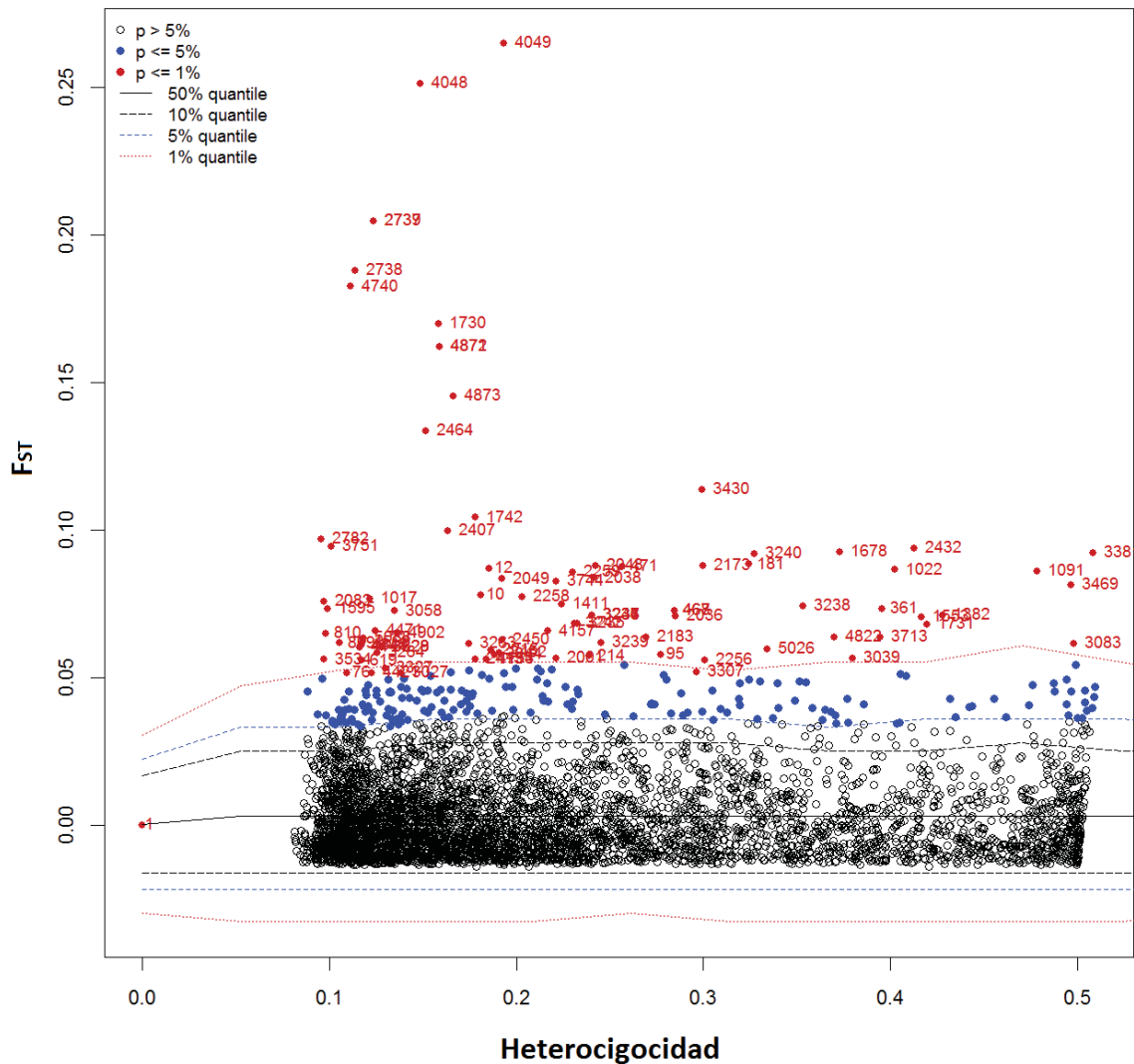
La búsqueda de *outliers* a partir de nuestra base de 5,166 marcadores, el programa BAYESCAN identificó ocho marcadores *outliers* (Figura 5a) y el

programa ARLEQUIN detectó 73 *outliers* (Figura 5b). Los ocho marcadores detectados por Bayescan fueron compartidos por Arlequin, por lo que, estos marcadores constituyeron la base de datos de marcadores *outliers* (candidatos a selección).



B)

### Detección de loci bajo selección basado en $F_{ST}$



**Figura 5.** Detección de marcadores SNP candidatos a selección para la sardina monterrey (*Sardinops sagax*). A) Bayescan. Después de la línea se muestran los marcadores considerados *outliers* de acuerdo a sus indicadores de  $F_{ST}$ , con una probabilidad de  $p \leq 0.05$ . B) ARLEQUIN. Para cada locus se muestra la heterocigocidad observada en la población total sobre el eje de las x, mientras que el eje de las y representa el nivel observado de  $F_{ST}$ . Los puntos en color negro se distribuyen en el cuantil del 10% con un nivel de  $p > 0.05$ . Los puntos en color azul se encuentran en el cuantil del 5% con un nivel de  $p \leq 0.05$ . Por último, los puntos en color rojo se encuentran en el cuantil del 1% con un nivel de  $p \leq 0.01$ , estos últimos corresponden a los marcadores considerados como *outliers*.

### 7.3.2 Marcadores en Equilibrio de Hardy-Weinberg

Excluyendo el grupo de 8 SNPs candidatos a selección detectados en los análisis anteriores, se evaluó si los marcadores restantes se encontraban en Equilibrio de Hardy-Weinberg. Se identificaron un total de 277 SNPs en desequilibrio en al menos dos de las tres poblaciones comprendidas en el estudio, por lo que fueron descartados en análisis posteriores, conservando un grupo de 4881 SNPs que se consideraron como neutrales.

### 7.4 Diversidad genética

La evaluación de la diversidad genética en términos de heterocigocidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ) se llevó a cabo con base a la población total y a cada una de las localidades comprendidas en este estudio, analizando por separado el grupo de marcadores neutrales del de outliers, los resultados se muestran en la Tabla V.

**Tabla V.** Evaluación de la heterocigocidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ) para la sardina monterrey (*Sardinops sagax*) utilizando dos grupos de marcadores diferentes: Neutrales (4881 SNPs) y Outliers (8 SNPs).

<b>Población</b>	<b>Marcadores</b>	<b><math>H_o</math></b>	<b><math>H_e</math></b>
<b>Total</b>	Neutrales	0.19	0.22
	Outliers	0.11	0.14
<b>Ensenada, B.C.</b>	Neutrales	0.17	0.22
	Outliers	0.19	0.21
<b>Bahía Magdalena, B.C.S.</b>	Neutrales	0.17	0.22
	Outliers	0.19	0.21
<b>Golfo de California</b>	Neutrales	0.02	0.04
	Outliers	0.33	0.34

En los análisis de diversidad genética llevados a cabo en base a la población total, se obtuvieron valores de  $He = 0.22$  para los marcadores neutrales, mientras que se observaron valores menores de  $He = 0.14$  para los marcadores outliers. La heterocigocidad observada presentó valores de  $H_o = 0.11$  para marcadores outliers y de  $H_o = 0.19$  para el grupo de marcadores neutrales.

Por otro lado, el análisis de diversidad llevado a cabo en cada una de las localidades arroja los mismos valores de  $H_o$  y  $He$  en las localidades de Ensenada, B.C. y San Carlos, B.C.S, donde se observan valores de  $He = 0.22$  en marcadores neutrales y  $He = 0.21$  con el grupo de marcadores outliers, mientras que los valores de  $H_o$  son de 0.17 para marcadores neutrales y 0.19 en marcadores outliers. Sin embargo, estos valores contrastan respecto a los obtenidos entre los individuos colectados dentro del Golfo de California, donde se observó una heterocigocidad esperada de  $He = 0.04$  para marcadores neutrales y 0.34 en marcadores outliers. Así mismo, la heterocigocidad observada en marcadores neutrales fue de  $H_o = 0.02$  y de 0.33 en marcadores outliers.

## **7.5 Diferenciación y estructura poblacional**

### **7.5.1 Estructura genómica neutral**

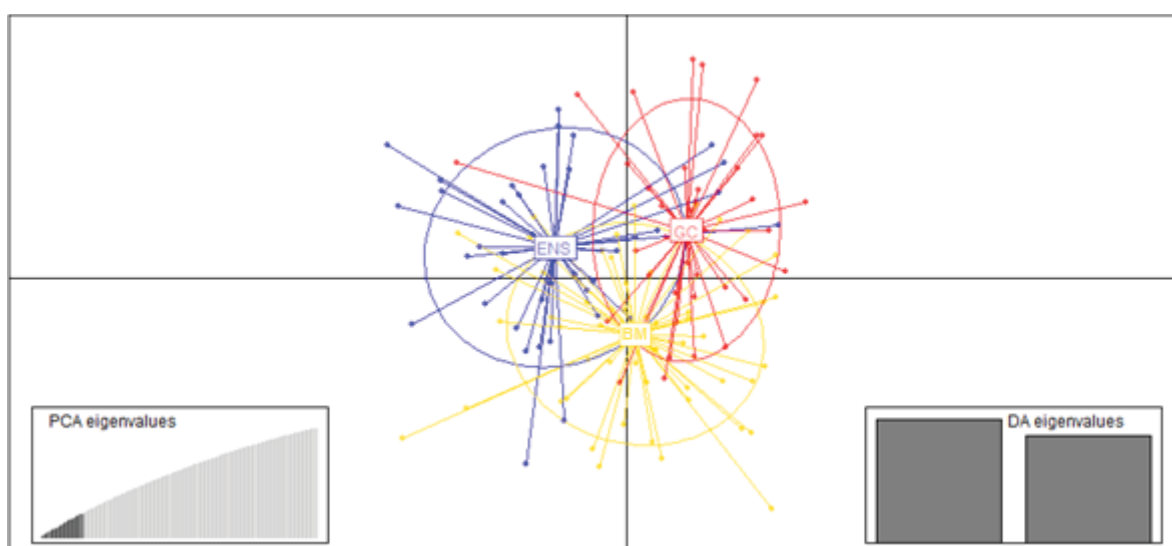
Al analizar las diferencias pareadas de  $F_{ST}$  con el grupo de marcadores neutrales (SNPs = 4,881) no se detectaron valores significativos de diferenciación ( $p > 0.05$ ) entre ninguna de las tres localidades que contempla el estudio (Tabla VI).



**Tabla VI.** Análisis de diferencias pareadas para el grupo de marcadores neutrales (4,881 SNPs) de la sardina monterrey (*Sardinops sagax*). Por debajo de la diagonal se muestran los valores de  $F_{ST}$  para cada comparación, mientras que por arriba de la diagonal se encuentra el respectivo de probabilidad.

Diferencias Pareadas ( $F_{ST}$ )			
	ENS	BM	GC
ENS	-	0.331	0.076
BM	0.00131	-	0.099
GC	0.00126	0.00125	-

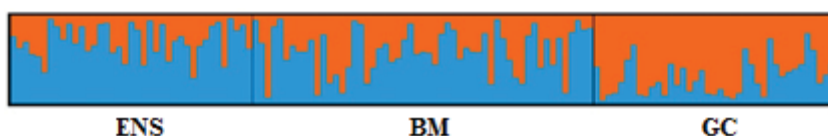
Al llevar a cabo el ADCP con el conjunto de marcadores neutrales (Fig. 6), se encontró un traslape entre las localidades contempladas en el estudio, lo que sugiere que las tres pertenecen a un mismo grupo. Se retuvieron un total de 20 componentes principales y 2 funciones discriminantes.



**Figura 6.** Análisis Discriminante de Componentes Principales (ADCP) para marcadores neutrales de sardina monterrey. Se retuvieron un total de 20

componentes principales. Cada elipse representa una localidad (ENS = Ensenada, BM = Bahía Magdalena, GC = Golfo de California) mientras que los puntos representan a los individuos que corresponden a cada una de ellas.

De igual forma, el análisis de clusters coincide con los resultados previos, al llevarse a cabo tanto con el grupo de marcadores globales como con el de neutrales, donde se aísla al Golfo de California como un grupo independiente de aquél que comprende los puertos de Ensenada, B.C. y Bahía Magdalena, B.C.S. (Figura 7).



**Figura 7.** Análisis de agrupamiento de la sardina monterrey (*Sardinops sagax*) para el grupo de marcadores neutrales (4881 SNPs). Se sugieren dos grupos ( $k = 2$ ). ENS: Ensenada, B.C., BM: Bahía Magdalena, B.C.S., GC: Golfo de California. Cada columna representa a un individuo en la población mientras las barras en azul y naranja representan la probabilidad de cada individuo de pertenecer a cualquiera de los dos posibles grupos existentes.

Se llevó a cabo un AMOVA jerárquico bajo el supuesto de tres hipótesis de agrupamiento mostradas en la tabla VII. En todos los casos, la mayor parte de la varianza (85%) se encuentra explicada hacia el interior de los individuos, sin embargo, con base al índice de fijación ( $F_{ST}$ ), las diferencias encontradas a los distintos niveles de organización jerárquica entre poblaciones no son significativas ( $p > 0.05$ ) para cada hipótesis evaluada.

**Tabla VII.** Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) de marcadores neutrales (4,881 SNPs) de sardina monterrey (*Sardinops sagax*), bajo el supuesto de tres hipótesis de agrupamiento, donde ENS = Ensenada, BM = Bahía Magdalena, GC = Golfo de California. En negritas se muestran los valores significativos ( $p \leq 0.05$ ).

<b>Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)</b>				
<b>HIPÓTESIS 1:</b>		<b>1 Grupo, 3 Poblaciones</b>		
<b>Fuente de variación</b>	<b>% de variación</b>	<b>Índice de fijación</b>	<b>p-value</b>	
<b>Entre poblaciones</b>	0.13	FST	0.0012	0.0731
<b>Entre individuos al interior de las poblaciones</b>	99.87			
<b>HIPÓTESIS 2:</b>		<b>DOS GRUPOS, 1: ENS + BM y 2: GC</b>		
<b>Fuente de variación</b>	<b>% de variación</b>	<b>Índice de fijación</b>	<b>p-value</b>	
<b>Entre grupos</b>	-0.06	FCT	-0.0006	1
<b>Entre poblaciones dentro de los grupos</b>	0.17	FSC	0.0016	0.3259
<b>Entre individuos al interior de las poblaciones</b>	99.90	FST	0.0010	0.0725
<b>HIPÓTESIS 3:</b>		<b>DOS GRUPOS, 1: ENS y 2: BM + GC</b>		
<b>Fuente de variación</b>	<b>% de variación</b>	<b>Índice de fijación</b>	<b>p-value</b>	
<b>Entre grupos</b>	0.04	FCT	0.0004	0.3334
<b>Entre poblaciones dentro de los grupos</b>	0.10	FSC	0.0010	0.0979
<b>Entre individuos al interior de las poblaciones</b>	99.86	FST	0.0014	0.0726

Para la hipótesis 1, donde se considera que las tres localidades de las que se obtuvieron las muestras de los individuos forman parte de un mismo conjunto, no se detectaron valores significativos de diferenciación entre las tres localidades ( $F_{ST} = 0.0012$ ;  $p > 0.05$ ).

La hipótesis 2 considera dos grupos, (1) el de la costa occidental de la península, que incluye las localidades de Ensenada, B.C. y Bahía Magdalena, B.C.S. y (2) el que incluye a los individuos provenientes del Golfo de California. Bajo esta hipótesis, no se detectaron valores significativos de diferenciación entre grupos ( $F_{CT} = -0.0006$ ;  $p > 0.05$ ), y no se detectaron diferencias entre las poblaciones al interior de los grupos ( $F_{SC} = 0.0016$ ;  $p > 0.05$ ).

Al igual que en el caso anterior, la hipótesis 3 supone la existencia de dos grupos: (1) Ensenada como un grupo independiente y (2) el que comprende a Bahía Magdalena y Golfo de California. No se detectaron valores significativos de diferenciación entre estos dos grupos ( $F_{CT} = 0.00004$ ;  $p > 0.05$ ), ni entre las localidades al interior de los grupos ( $F_{SC} = 0.0010$ ;  $p > 0.05$ ), específicamente, Bahía Magdalena y Golfo de California.

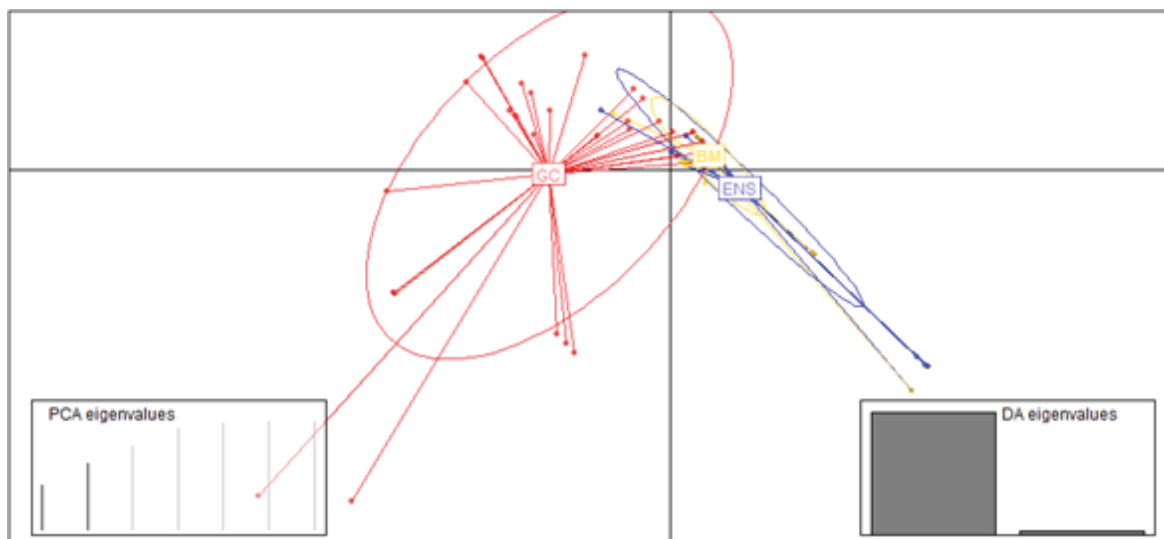
### **7.5.2 Estructura genómica *outliers***

Finalmente, para el grupo de datos *outliers* que comprende 8 marcadores candidatos a selección, el análisis de diferencias pareadas de  $F_{ST}$  detectó diferencias significativas entre todas las localidades (Tabla VIII). Sin embargo, al ajustar por el método de Bonferroni, la única comparación significativa que se observó fue entre el Golfo de California con respecto a Bahía Magdalena ( $F_{ST} = 0.21634$ ;  $p \leq 0.016$ ) y Ensenada ( $F_{ST} = 0.05873$ ;  $p \leq 0.016$ ), pero éstas últimas no fueron distintas entre sí (Tabla VIII).

**Tabla VIII.** Análisis de diferencias paradas para el grupo de marcadores outliers de la sardina monterrey (*Sardinops sagax*). Por debajo de la diagonal se muestran los valores de FST para cada comparación mientras que por encima de la diagonal se encuentra el respectivo valor de  $p$ . Los valores significativos para  $p \leq 0.05$  se muestran en sombreado, mientras que aquellos significativos de acuerdo al ajuste de Bonferroni ( $\alpha \leq 0.016$ ) se muestran en negritas. ENS: Bahía de Ensenada B.C., BM: Bahía Magdalena, B.C.S., GC: Golfo de California.

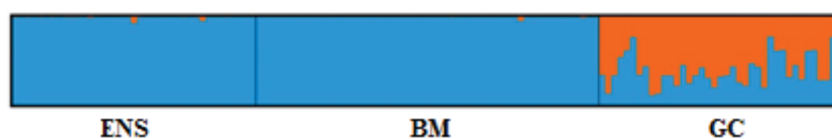
<b>Diferencias Pareadas (<math>F_{ST}</math>)</b>			
	<b>ENS</b>	<b>BM</b>	<b>GC</b>
<b>ENS</b>	-	0.0425	<b>0.0000</b>
<b>BM</b>	0.05873	-	<b>0.0000</b>
<b>GC</b>	0.21634	0.27826	-

El ADGP aplicado con SNPs *outliers*, muestra claramente la distinción de dos grupos, quedando el Golfo de California como una localidad independiente mientras que las localidades de Ensenada y Bahía Magdalena se agrupan, como se observa en la figura 8.



**Figura 8.** Análisis Discriminante de Componentes Principales (ADCP) para marcadores outliers de sardina monterrey (*Sardinops sagax*). Se retuvieron un total de 2 componentes principales. Cada elipse representa una localidad (ENS = Ensenada, BM = Bahía Magdalena, GC = Golfo de California) mientras que los puntos representan a los individuos que corresponden a cada una de ellas.

Se observa de igual forma al realizar el análisis de clusters, que nos indica un valor de  $k = 2$  como la mayor probabilidad de agrupamiento, donde las localidades de Ensenada y Bahía Magdalena pertenecen a un mismo grupo distinto al de los individuos en el Golfo de California (Figura 9).



**Figura 9.** Análisis de agrupamiento de la sardina monterrey (*Sardinops sagax*) para el grupo de marcadores *outliers*. Se sugieren dos grupos ( $K = 2$ ). ENS: Bahía de Ensenada, B.C., BM: Bahía Magdalena, B.C.S., GC: Golfo de California. Cada columna representa a un individuo en la población mientras las barras en azul y naranja representan la probabilidad de cada individuo de pertenecer a cualquiera de los dos posibles grupos existentes.

Para el grupo de marcadores candidatos a selección se consideraron las mismas tres hipótesis de agrupamiento que para el grupo de marcadores neutrales. En los tres casos, la mayor parte de la varianza se encuentra explicada hacia el interior de los individuos, desde un 63% para la hipótesis 2 hasta un 75% en la hipótesis 3 (Tabla IX), el porcentaje de varianza explicada es menor que con el análisis de marcadores neutrales.

**Tabla IX.** Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) de marcadores outliers de sardina monterrey (*Sardinops sagax*) bajo el supuesto de tres hipótesis de agrupamiento. En negritas se muestran los valores significativos ( $p \leq 0.05$ ). ENS: Ensenada, B.C., BM: Bahía Magdalena, B.C.S., GC: Golfo de California.

<b>Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)</b>				
<b>HIPÓTESIS 1:</b>		<b>1 GRUPO, 3 POBLACIONES</b>		
<b>Fuente de variación</b>	<b>% de variación</b>	<b>Índice de fijación</b>	<b>p-value</b>	
<b>Entre poblaciones</b>	20.37	FST	0.2037	<b>0.0254</b>
<b>Entre individuos al interior de las poblaciones</b>	9.01	FIS	0.1132	<b>0.0000</b>
<b>HIPÓTESIS 2:</b>		<b>DOS GRUPOS, 1: ENS + BM y 2: GC</b>		
<b>Fuente de variación</b>	<b>% de variación</b>	<b>Índice de fijación</b>	<b>p-value</b>	
<b>Entre grupos</b>	27.33	FCT	0.2733	<b>0.0003</b>
<b>Entre poblaciones dentro de los grupos</b>	1.28	FSC	0.0176	<b>0.0061</b>
<b>Entre individuos al interior de las poblaciones</b>	8.08	FIS	0.1132	<b>0.0274</b>
<b>Al interior de los individuos</b>	63.29	FIT	0.3670	<b>0.0000</b>
<b>HIPÓTESIS 3:</b>		<b>DOS GRUPOS, 1: ENS y 2: BM + GC</b>		
<b>Fuente de variación</b>	<b>% de variación</b>	<b>Índice de fijación</b>	<b>p-value</b>	
<b>Entre grupos</b>	-17.51	FCT	-0.1751	0.9612
<b>Entre poblaciones dentro de los grupos</b>	32.75	FSC	0.2787	<b>0.0000</b>
<b>Entre individuos al interior de las poblaciones</b>	9.6	FIS	0.1132	<b>0.0218</b>
<b>Al interior de los individuos</b>	75.16	FIT	0.2483	<b>0.0000</b>



Bajo la hipótesis 1, que considera a todos los individuos del estudio como parte de un mismo grupo, se detectan niveles de diferenciación significativos entre las localidades que conforman en grupo ( $F_{ST} = 0.2037$ ;  $p \leq 0.05$ ).

De igual forma, el análisis llevado a cabo bajo la segunda hipótesis de agrupamiento, también detecta niveles de diferenciación significativos entre los dos grupos que considera ( $F_{CT} = 0.2733$ ;  $p \leq 0.05$ ), (1) el de las localidades peninsulares versus (2) el Golfo de California como grupo aislado. Además, bajo esta hipótesis de agrupamiento también se detectaron niveles de diferenciación significativas entre las poblaciones dentro de los grupos ( $F_{SC} = 0.0176$ ;  $p \leq 0.05$ ), es decir, entre las localidades de Ensenada y Bahía Magdalena.

Por último, para la hipótesis tres se consideraron igualmente dos grupos: (1) Ensenada y (2) Bahía Magdalena y Golfo de California. En este caso, no se detectaron niveles significativos de diferenciación entre estos dos grupos ( $F_{CT} = 0.1751$ ;  $p \geq 0.05$ ), pero sí entre las localidades que los comprenden ( $F_{SC} = 0.2787$ ;  $p \leq 0.05$ ), es decir, entre Bahía Magdalena y Golfo de California.

## 8. DISCUSIÓN

El estudio genómico poblacional de la sardina monterrey (*Sardinops sagax*) llevado a cabo en dos localidades costeras de la península de Baja California y una más dentro del Golfo de California sugiere una estructura poblacional de tipo panmixia mediante el análisis de marcadores moleculares de naturaleza neutral, sin embargo, el empleo de marcadores *outliers* considerados candidatos a selección, sugiere la posible existencia de dos grupos con posible adaptación local, uno en la Costa Occidental de la Península de Baja California y otro dentro del Golfo de California.

### 8.1 Obtención de genotipos

El pipeline Stacks se emplea para llevar a cabo la construcción de los genotipos *de novo* a través de distintas fases, cada una controlada por parámetros específicos. Dos de las etapas más relevantes son las que comprenden la creación de los loci *de novo* que se rige por los parámetros  $-m$  y  $-M$  para formar el catálogo de loci de acuerdo a lo especificado por el parámetro  $-n$  en la siguiente etapa (Catchen *et al.*, 2013).

Durante esta etapa se busca obtener el mayor número de sitios variantes posible sin sacrificar la calidad de los datos obtenidos, para lo cual diversos autores recomiendan llevar a cabo pruebas de parametrización, que consisten en variar de manera individual los valores de cada parámetro manteniendo valores fijos para los otros dos, y determinar así, la combinación óptima para cada caso en particular (Mastretta-Yanes *et al.*, 2015; Miller *et al.*, 2016; Paris *et al.*, 2017).

En el presente estudio, al parámetro  $-m$  se le asignó un valor de 3, siendo este el más utilizado en estudios de este tipo por diversos autores (Benestan *et al.*, 2015; Saenz-Agudelo *et al.*, 2015; Miller *et al.*, 2016; Drinan *et al.*, 2017), ya que

corresponde al valor default sugerido por los desarrolladores del programa (Catchen *et al.*, 2013), quienes además recomiendan, no aumentar demasiado el valor de este parámetro cuando se tienen profundidades de lectura menores a 20X, pues de otra forma disminuiría el número de alelos putativos identificados. En nuestro caso, la profundidad de lectura promedio es de 44X, sin embargo, para los individuos de la localidad del Golfo de California, se obtuvieron profundidades menores a 20X, por lo que no se aumentó el valor de este parámetro.

Para el parámetro  $-M$ , se sugiere un valor default de 2 siendo también el más utilizado en la literatura (Benestan *et al.*, 2015; Rodríguez-Ezpelta *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2018), encargado de restringir el número máximo de diferencias entre dos alelos considerados para la construcción de los loci. Sin embargo, para este estudio se aplicó un criterio menos estricto asignándole un valor de 3 a este parámetro, puesto que considerar valores muy bajos hace más probable la construcción de loci falsos, mientras que asignarle valores demasiado altos aumenta el riesgo de la pérdida de loci al considerarlos erróneamente como parte de uno mismo (Paris *et al.*, 2017).

Se consideró un valor de 4 para el parámetro  $-n$ , que indica al programa el número máximo de diferencias permitidas entre loci para formar el catálogo de la población total, aunque a este parámetro comúnmente se asignan valores entre 2 (Saenz-Agudelo *et al.*, 2015; Paris *et al.*, 2017) y 3 (Miller *et al.*, 2016; Drinan *et al.*, 2017; Martínez *et al.*, 2017), en este estudio se aplica un criterio más estricto para disminuir el riesgo del llamado de loci falsos, que dificulta la identificación de loci fijos en la población en caso de estar presentes (Paris *et al.*, 2017).

Finalmente, el parámetro  $-r$ , que determina el porcentaje de individuos en el que debe estar presente un loci a considerar dentro de la población y el parámetro  $-p$ , que indica el número de poblaciones en el que debe encontrarse un loci, toman valores que van del 70% al 80% para el primero (Benestan *et al.*, 2015; Rodríguez-Ezpelta *et al.*, 2016; Martínez *et al.*, 2017; Van Wyngaarden *et al.*, 2017; Sandoval-Castillo *et al.*, 2018), y cerca del 60% para el segundo (Saenz-

Agudelo *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2018). Para el presente estudio se consideró un valor de  $-r$  del 80%, dentro del rango observado en la literatura, sin embargo, para el parámetro  $-p$  se consideró que los loci deben estar presentes en el 100% de las localidades, tomando en cuenta que sólo se contemplan tres en el estudio. El número de sitios variantes obtenidos (5166) está dentro del rango de lo obtenido por otros autores, por lo que se considera que se cuenta con la robustez suficiente para continuar con los análisis siguientes.

## 8.2 Detección de marcadores candidatos a selección (*outliers*)

La identificación de marcadores *outliers* en estudios de genómica poblacional, comúnmente es abordada desde distintas aproximaciones con la finalidad de disminuir la posibilidad de errores de tipo I (falsos positivos) y II (falsos negativos) durante la detección (Narum y Hess, 2011; Benestan *et al.*, 2016; Carreras *et al.*, 2017). En el presente estudio la detección se llevó a cabo desde una aproximación bayesiana utilizando el programa Bayescan que implementa el método descrito en Beaumont y Balding (2004), reconocido por tener la menor tasa de errores tipo I y II (Narum y Hess, 2011) que identificó un total de 8 loci *outliers*, mientras que con el programa Arlequin que emplea el método de Beaumont y Nichols (1996) basado en las distancias de  $F_{ST}$  se detectaron 73 loci *outliers*, donde se incluyen los 8 identificados por Bayescan, por lo cual se consideró a estos para formar la base de marcadores *outliers*.

El número de loci *outliers* detectados puede variar dependiendo de la frecuencia del alelo menor (MAF, por sus siglas en inglés) permitida durante la creación de los genotipos, ya que el valor de MAF para un loci en particular presente en una región puede fluctuar de acuerdo a las condiciones ambientales (Dalongeville *et al.*, 2018). En estudios llevados a cabo en distintas especies, como la anguila europea (*Anguilla anguilla*) y la almeja del Atlántico (*Placopecten magellanicus*), la

proporción de marcadores outliers detectados generalmente toma valores cercanos al 1% - 2%, respecto al total de marcadores obtenidos (Pujolar *et al.*, 2014; Van Wyngaarden, 2016; Carreras *et al.*, 2017). Sin embargo, en algunos casos estos representan porcentajes muy bajos como en el caso del estudio llevado a cabo por Xuereb *et al.* (2016) donde los marcadores outliers representan el 0.15%, o el realizado por Benestan (2016) donde la proporción de marcadores outliers detectados corresponde al 0.28% del total. En el presente estudio para la sardina monterrey se detectaron un total de 5166 marcadores SNPs de los cuales sólo 8 fueron considerados como candidatos a selección, representando el 0.15% del total, por lo que el porcentaje de marcadores outliers obtenidos, aunque es bajo, se encuentra dentro del rango de lo observado anteriormente en la literatura.

### **8.3 Estructura genómica poblacional**

#### **8.3.1 Estructura poblacional con marcadores neutrales**

El análisis de estructura poblacional con marcadores neutrales llevados a cabo para la sardina monterrey en la costa occidental de la península de Baja California y el Golfo de California, no encuentra evidencia estadística significativa que descarte una estructura de tipo panmíctica en la región, sugiriendo que los individuos colectados en las tres diferentes localidades que comprende el presente estudio pertenecen a la misma población biológica.

Al abordar el tema de estructura poblacional en especies marinas desde una perspectiva genómica, es común enfrentarse a un escenario de nula o poca diferenciación genética, debido a que algunas de las características biológicas y demográficas (tamaño poblacional, migraciones estacionales, etc.) que presentan disminuyen el efecto de la deriva génica en las poblaciones, sobre todo en aquellas especies cuyo tamaño efectivo poblacional es muy elevado (Guo *et al.*, 2016), como es el caso de la sardina monterrey y otros peces marinos. Además,

se sabe que en el medio marino es poco común encontrar barreras físicas que impidan el contacto y consecuente entrecruzamiento de las poblaciones, por lo que existe un alto flujo genético entre ellas aún si se consideran extensas áreas de distribución geográfica (Waples, 1998; Baldwin *et al.*, 2012).

En la sardina monterrey, la hipótesis respecto a la existencia de una única población es la que se consideró originalmente ante el interés por aprovechar la sardina como recurso por primera vez (Hubbs, 1925), sin embargo, ésta fue descartada con los primeros estudios poblacionales llevados a cabo para la especie empleando principalmente metodologías de análisis morfométricos, merísticos y de distribución por temperaturas, que sugerían la existencia de dos (Phillips, 1948; Vrooman, 1964) a tres poblaciones (Felix-Uraga, 2004, 2005; Cruz-Agüero y García-Rodríguez, 2005) con base a diferencias morfológicas encontradas en distintas regiones.

Sin embargo, la existencia de una sola población fue propuesta nuevamente por Hedgecock *et al.* (1989) al utilizar por primera vez marcadores moleculares, particularmente aloenzimas, como herramienta de diferenciación poblacional en esta especie. En otros estudios se emplearon genes mitocondriales como citocromo B (Lacomte *et al.*, 2004), NAD5 y NAD6 (Gutiérrez-Flores, 2007) y región control o *D-loop* (García-Rodríguez, 2011), así como marcadores de tipo microsatélite (Gutiérrez-Flores, 2007), y en ninguno de ellos se encuentra evidencia genética significativa que soporte la existencia de más de una población de sardina monterrey a lo largo de su distribución. Resultados que concuerdan con los de la presente investigación, y que es la existencia de panmixia para la población de sardina monterrey en el área de distribución que abarco el estudio, es decir, costa occidental de la Península de Baja California y Golfo de California.

### **8.3.2 Estructura poblacional con marcadores *outliers***

Las especies que cuentan con un amplio rango de distribución, como es el caso que se presenta en este estudio con la sardina monterrey (*Sardinops sagax*), deben enfrentarse a la heterogeneidad ambiental que caracteriza al medio marino (Hemmer-Hansen *et al.*, 2014), por lo que, a pesar de la ausencia de diferenciación encontrada al analizar el genoma en su totalidad, es posible encontrar un grado de divergencia significativo al enfocarse únicamente en pequeñas regiones genómicas correspondientes a caracteres fenotípicos, sobre las cuales el efecto de la selección natural, sea tal que, se encuentren adaptaciones locales a distintos factores ambientales (Guo *et al.*, 2016), como son la salinidad, temperatura, corrientes, surgencias, disponibilidad de alimento, etc.

Los análisis de estructura poblacional para sardina monterrey con el grupo de marcadores *outliers*, indican una divergencia significativa entre los organismos colectados en el Golfo de California con respecto al grupo que habita la costa oeste de la Península de Baja California, correspondiente a las localidades de Ensenada, B.C. y Bahía Magdalena, B.C.S, mientras que entre estas dos localidades no presentan divergencia entre sí.

La distribución de la sardina monterrey en México comprende dos regiones con características distintivas respecto a los factores ambientales y dinámicas oceanográficas que presentan: la Corriente de California y el Golfo de California (Parrish *et al.*, 1989).

En primer lugar, la Corriente de California es una corriente superficial de hasta 300 m de profundidad que transporta agua a lo largo de la costa oeste de norteamérica hasta la corriente norecuatorial, extendiéndose a una distancia de entre 200 y 400 km de la costa, y fluye a una velocidad promedio de 25 cm/s pudiendo alcanzar los 50 cm/s, la cuál se caracteriza por presentar baja temperatura, baja salinidad y una alta concentración de oxígeno disuelto (Lynn, 1987).

Las condiciones ambientales en este sistema varían estacionalmente, de tal manera que en invierno, la temperatura superficial ronda los 13 °C, mientras que

en verano llega hasta los 20 °C (Winant y Bratkovich, 1982). Las variaciones de temperatura determinan la densidad de la columna de agua y la concentración de oxígeno disuelto, que aumenta entre más baja sea la temperatura. Además, durante todo el año, el oxígeno disuelto es mayor al acercarse a la costa y disminuye en la superficie ante la presencia de surgencias (Checkley y Barth, 2009).

Por su parte, el Golfo de California es uno de los ecosistemas oceánicos más productivos, presenta una variación estacional e interanual bien marcada (Escalante *et al.*, 2013), y se divide en tres regiones: norte, central y sur, donde, al igual que en la Corriente de California, las condiciones de temperatura, salinidad y productividad primaria varían de forma estacional o interanual. La circulación superficial del golfo es estacional, el agua entra durante primavera y verano y sale durante otoño e invierno (Soto-Maradones *et al.*, 1999).

La región norte presenta altas salinidades superficiales y temperaturas que van de 10 °C a 32 °C en invierno y verano, respectivamente (Sverdrup, 1941), está delimitada al sur por las grandes islas, una de las características topográficas más destacadas del golfo, donde la temperatura superficial es más baja debido a la intensa mezcla por marea que se genera (Soto-Maradones *et al.*, 1999), lo que a su vez tiene como consecuencia un incremento en la productividad primaria. La región central posee temperaturas que van de 16 °C en invierno a 31 °C en verano (Robles y Marinone, 1987), y la salinidad en la capa superficial es mínima debido a una corriente que fluye a lo largo de la costa este hacia el noroeste (Roden, 1964). Por último, la región sur se caracteriza porque está en comunicación con el Océano Pacífico a través de la boca, y en ella confluyen distintas masas de agua. Aquí, las condiciones de temperatura y salinidad corresponden a las que se encuentran en el Océano Pacífico (Soto-Maradones *et al.*, 1999).

Existen evidencias que la temperatura superficial del mar es la principal fuerza que moldea la divergencia adaptativa en varias especies como la merluza europea (Milano *et al.*, 2014), la sardina del Mar Báltico (Guo *et al.*, 2016) y la anchoveta



europaea (Ruggeri *et al.*, 2016), y se ha observado que la estructura genética adaptativa de múltiples especies coinciden espacialmente en las zonas de transición térmica, tanto en el Atlántico (Stanley *et al.* 2018) como en el Sur de África (Teske *et al.*, 2019). El factor físico más contrastante entre la costa oeste de la Península de Baja California (PBC) y el Golfo de California (GC) es la temperatura superficial del mar, debido a que la costa oeste de la PBC es de naturaleza templada (aguas frías) y el GC más de afinidad tropical (aguas cálidas), en especial el rango y temperatura máxima.

Estos dos sistemas oceanográficos concuerdan con la distribución de los dos grupos divergentes detectados con base al análisis poblacional llevado a cabo con el grupo de marcadores *outliers*, por lo que, es posible que la heterogeneidad ambiental entre las dos regiones explique las diferencias significativas encontradas entre las sardinas de la Península de Baja California y las del Golfo de California bajo el umbral de la selección adaptativa.

Los casos en los que se presentan grupos con adaptaciones locales ante un escenario de panmixia son pocos, pero se han visto en varias especies marinas en el mundo, como es el caso del abulón rojo (De Wit y Palumbi, 2012), la anguila europea (Pujolar *et al.*, 2014), la langosta espinosa (Al-Breiki *et al.*, 2018), el lenguado del verano (Hoey y Pinsky, 2018) y la langosta verde de las rocas (Woodings *et al.*, 2018). La presencia de grupos con adaptación local dentro de una población panmíctica se explica por la variación del efecto de la selección espacialmente, es decir, el efecto de la selección natural en los organismos podría ser distinto si éstos se distribuyen en áreas con distintas condiciones ambientales, incluso si comparten un mismo pool genético (Gagnaire *et al.*, 2012; Woodings *et al.*, 2018), esta parece la explicación más parsimoniosa para el patrón genómico poblacional detectado.

#### **8.4 Implicaciones para el manejo de la sardina monterrey como recurso pesquero**

El aprovechamiento de la sardina monterrey en México se contempla como parte de la pesquería multiespecífica de pelágicos menores regida por la NOM-003-PESC-1993 (DOF, 1993), para la que se consideran cuatro zonas de pesca que operan en el noroeste mexicano: (1) Ensenada, B.C., (2) Bahía Magdalena, B.C.S., (3) Guaymas y Yavaros, Sonora y (4) Mazatlán, Sinaloa, aunque la sardina monterrey sólo es capturada dentro de las primeras tres.

A pesar de que las zonas de pesca están bien delimitadas y cada una cuenta con una flota asignada para su explotación, el Plan de Manejo Pesquero para la Pesquería de Pelágicos Menores (sardinias, anchovetas, macarela y afines) del Noroeste de México (DOF, 2012) no concluye el número de stocks considerados en la región con base a los cuales establece sus medidas de manejo, sino que menciona la incertidumbre respecto a la posible existencia de dos o tres de ellos, de acuerdo a lo propuesto por Smith (2005) y Felix-Uraga *et al.* (2005) en sus respectivos estudios. El plan de manejo indica una talla mínima de captura de 155 mm para todos los organismos, sin importar la zona en la que fueron capturados, y establece una veda temporal en la zona del Golfo de California durante los meses de agosto y septiembre.

El presente estudio aporta información valiosa para el manejo de la pesquería de sardina monterrey, ya que los resultados del análisis con base a marcadores neutrales indica la existencia de una sola población en el noroeste de México, a diferencia de lo considerado por la NOM que actualmente establece las implicaciones en el manejo de esta pesquería.

Sin embargo, el análisis de marcadores *outliers* sugiere la existencia de dos grupos con adaptación local, uno a lo largo de la costa occidental de la Península de Baja California y otro en el interior del Golfo de California. La ubicación de estos dos potenciales grupos con adaptación local concuerda con aquella de los

dos centros de distribución propuestos por Lluch-Belda *et al.* (1995) que también se consideran en el plan de manejo de la pesquería de sardina monterrey, de los cuales uno se localiza frente a Punta Eugenia, B.C.S. y el segundo en las grandes islas dentro del Golfo de California. A partir de estos centros de distribución, la sardina se expande o contrae como respuesta a las variaciones ambientales.

Los estudios de genómica que tienen como objetivo la identificación de stocks, se ha llevado a cabo en diversas especies en pesquerías, en ocasiones con importantes implicaciones respecto al manejo. Russello *et al.* (2011) sugieren en su estudio llevado a cabo en salmón rojo (*Oncorhynchus nerka*), que al no encontrar una estructura poblacional neutral, pero sí una diferenciación adaptativa con marcadores *outliers*, las estrategias de manejo deben basarse en los ecotipos presentes en las zonas de captura, considerando cada ecotipo como una población o stock.

Tomando en cuenta la heterogeneidad ambiental entre la Corriente de California y el Golfo de California, los antecedentes de diferenciación morfológica encontrados entre las sardinias que se distribuyen en ambos sistemas, y la evidencia de diferenciación genómica adaptativa entre las dos regiones contempladas en el presente estudio, el manejo de la pesquería de sardina monterrey podría optimizarse si se establecen medidas que consideren los dos ecotipos mencionados y su distribución, de acuerdo a lo sugerido por Russello *et al.* (2011). Sin embargo, es necesario conocer exactamente el mecanismo selectivo al que las especies se sujetan antes de realizar cualquier cambio en su manejo (Bernatchez *et al.*, 2018).

El presente estudio soporta la hipótesis de la existencia de una sola población de sardina monterrey en la región, y coincide con lo sugerido en trabajos realizados con base a marcadores moleculares, respecto a que las diferencias morfológicas detectadas en las distintas localidades donde se distribuye la especie podrían ser resultado de su plasticidad fenotípica y no de una diferenciación genética poblacional (Hedgecock *et al.*, 1989, García-Rodríguez, 2011). Si bien, los análisis

con marcadores neutrales no indican una diferenciación significativa como para considerar grupos aislados, el estudio de marcadores candidatos a selección sugiere la posible existencia de grupos con adaptaciones locales en la región.

## 9. CONCLUSIONES

El análisis con marcadores genómicos de naturaleza neutral indican una estructura de tipo panmixia para la sardina monterrey (*Sardinops sagax*) en el noroeste de México.

El análisis con marcadores genómicos candidatos a selección u *outliers* detectan la existencia de dos grupos con potencial adaptativo, el primero se localiza en la costa occidental de la Península de Baja California y contempla las localidades de Ensenada, B.C. y Bahía Magdalena, B.C.S., mientras que el segundo corresponde a los individuos dentro del Golfo de California.

## 10. LITERATURA CITADA

- Al-Breiki R. D., S. R. Kjeldsen, H. Afzal, M. S. Al Hinai, K. R. Zenger, D. R. Jerry, M. Delghandi. 2018. Genome-wide SNP analyses reveal high gene flow and signatures of local adaptation among the scalloped spiny lobster (*Panulirus homarus*) along the Omani coastline. *BMC Genomics*. 19(690):1-13.
- Baldwin R. E., M. Banks, K. Jacobson. 2012. Integrating fish and parasite data as a holistic solution for identifying the elusive stock structure of Pacific sardines (*Sardinops sagax*). *Rev. Fish Biol. Fisheries*. 22:137-156.
- Beaumont M. A., D. J. Balding. 2004. Identifying adaptive genetic divergence among populations from genome scans. *Mol. Ecol.* 13:969-980.
- Benestan L., T. Gosselin, C. Perrier, B. Sainte-Marie, R. Rochette, L. Bernatchez. 2015. RAD genotyping reveals fine-scale genetic structuring and provides powerful population assignment in a widely distributed marine species, the American lobster (*Homarus americanus*). *Mol. Ecol.* 24:3299–3315.
- Benestan L., B. K. Quinn, H. Maaroufi, M. Laporte, F. K. Clark, S. J. Greenwood, L. Bernatchez. 2016. Seascape genomics provides evidence for thermal adaptation and current-mediated population structure in American lobster (*Homarus americanus*). *Mol. Ecol.* 25:5073–5092.
- Bernatchez S., A. Xuereb, M. Laporte, L. Benestan., R. Steeves, M. Laflamme, L. Bernatchez, M. A. Mallet. 2018. Seascape genomics of eastern oyster (*Crassostrea virginica*) along the Atlantic coast of Canada. *Evol. Appl.* 12(3):587-609.
- Booke H. E. 1981. The Conundrum of the Stock Concept—Are Nature and Nurture Definable in Fishery Science? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 38(12):382-393.
- Booke H. E. 1999. The stock concept revisited: perspectives on its history in fisheries. *Fish. Res.* 43(1-3):9–11.

- Cadrin S., L. Kerr, S. Mariani. 2014. Stock Identification Methods: Applications in Fishery Science. Elsevier Academic Press. Segunda edición. Estados Unidos de América. 566p.
- Carreras-Huergo C., V. Ordóñez-Sánchez, L. Zane, C. Kruschel, I. Nasto, E. Macpherson, M. Pascual-Berniola. 2017. Population genomics of an endemic Mediterranean fish: differentiation by fine scale dispersal and adaptation. *Sci. Rep.* 7(43417):1-12.
- Catchen J., P. A. Hohenlohe, S. Bassham, A. Amores, W. A. Cresko. 2013. Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Mol. Ecol.* 22(11):3124–3140.
- Checkley D. M., J. A. Barth. 2009. Patterns and processes in the California Current System. *Prog. Oceanogr.* 83(1-4):49–64.
- Cisneros-Mata M. A., M. O. Nevárez-Martínez, G. Montemayor-López, J. P. Santos-Molina, R. Morales-Azpeitia. 1991. Pesquería de sardina en el Golfo de California 1988/89 -1989/90. Instituto Nacional de la Pesca-CRIP Guaymas, Sonora, México. 80p.
- Clark F. N. 1947. Analysis of populations of the Pacific sardine on the basis of vertebral counts. *Calif. Div. Fish and Game, Fish. Bull.* 65:26.
- Corander J., K. K. Majander, L. Cheng, J. Merilä. 2013. High degree of cryptic population differentiation in the Baltic Sea herring *Clupea harengus*. *Mol. Ecol.* 22(11):2931–2940.
- Cushing D. H. 1968. Fisheries biology: a study in population dynamics. Universidad de Wisconsin. Madison, Wisconsin. 200p.
- Culley M. 1972. The pilchard: biology and exploitation. Editorial Pergamon. Primera edición. Oxford, Inglaterra. 775p.

Danecek P., A. Auton., G. Abecasis, C. A. Albers, E. Banks, M. A. DePristo, R. E. Handsake, G. Lunter, G. T. Marth, S. T. Sherry, G. McVean, R. Durbin. 2011. The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*. 27(15):2156–2158.

De la Cruz-Aguero J., F. J. García-Rodríguez. 2005. Morphometric stock structure of the Pacific sardine *Sardinops sagax* (Jenyns, 1842) of Baja California, México. En: Elewa A. M. T. (ed). *Morphometrics: Applications in Biology and Paleontology*. Editorial Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Primer edición. Nueva York, Estados Unidos de América. pp 115-125.

De Wit P., S. R. Palumbi. 2012. Transcriptome-wide polymorphisms of red abalone (*Haliotis rufescens*) reveal patterns of gene flow and local adaptation. *Mol. Ecol.* 22(11):2884–2897.

Dizon A. E., C. Lockyer, W. F. Perrin, D. P. Demaster, J. Sisson. 1992. Rethinking the Stock Concept: A phylugeographic Approach. *Conserv. Biol.* 6(1):24-36.

Diario Oficial de la Federación, 1993. Norma Oficial Mexicana NOM-003-PESC-1993. Para regular el aprovechamiento de las especies de sardina Monterrey, piña, crinuda, bocona, japonesa y de las especies anchoveta y macarela, con embarcaciones de cerco, en aguas de Jurisdicción Federal del Océano Pacífico, incluyendo el Golfo de California. México., D.F. 31 de diciembre de 1993.

Diario Oficial de la Federación, 2010. Acuerdo por el que se da a conocer el Plan de Manejo Pesquero para la Pesquería de Pelágicos Menores (sardinias, anchovetas, macarela y afines) del Noroeste de México. México, D.F. 8 de noviembre de 2012.

Drinan D. P., K. M. Gruenthal, M. F. Canino, D. Lowry, M. C. Fisher, L. Hauser. 2018. Population assignment and local adaptation along an isolation-by-distance gradient in Pacific cod (*Gadus macrocephalus*). *Evol. Appl.* 11(8):1448–1464.



Escalante-Almazán, F., J. E. Valdez-Holguín, S. Álvarez-Borrego, J. R. Lara-Lara. 2013. Temporal and spatial variation of sea surface temperature, chlorophyll a, and primary productivity in the Gulf of California. *Cienc. Mar.* 39(2):203–215.

Excoffier L., T. Hofer, M. Foll. 2009. Detecting loci under selection in a hierarchically structured population. *Heredity.* 103:285-298

Excoffier L., H. E. L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10(3):564-567.

Excoffier L., P. E. Smouse, J. M. Quattro. 1992. Analysis of Molecular Variance Inferred from Metric Distances among DNA Haplotypes-Application to Human Mitochondrial-DNA Restriction Data. *Genetics.* 131(2):479-491.

Excoffier L., P. E. Smouse, J. M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.

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

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

Foll M., O. E. Gaggiotti. 2008. A genome scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: A Bayesian perspective. *Genetics.* 180:977-993.

Gagnaire P. A., E. Normandeau, C. Côté, M. M. Hansen, L. Bernatchez. 2012. The genetic consequences of spatially varying selection in the panmictic american eel (*Anguilla rostrata*). *Genetics* 190:725–736

García-Rodríguez F., S. García-Gasca, J. Cruz-Agüero, V. Cota-Gómez. 2011. A study of the population structure of the Pacific sardine *Sardinops sagax* (Jenyns, 1842) in Mexico based on morphometric and genetic analyses. *Fish. Res.* 107(1-3): 169-176.

Guo B., Z. Li, J. Merilä. 2016. Population genomic evidence for adaptive differentiation in the Baltic Sea herring. *Mol. Ecol.* 25(12):2833-2852.

Gutiérrez-Flores C.. 2007. Estructura genética poblacional de la sardina del pacífico nororiental *Sardinops sagax caeruleus* (Tesis de Maestría). Ensenada, B. C. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 112p.

Hedgecock D., E. S. Hutchinson, G. Li, F. L. Sly, K. Nelson. 1989. Genetic and morphometric variation in the Pacific sardine, *Sardinops caerulea*: comparisons and contrasts with historical data and with variability in the northern anchovy, *Engraulis mordax*. *Fish. Bull.* 87:63–671.

Heincke, F. 1898. Naturgeschichte des Herings. *Abh. Dtsch. Seefish.* 11:217.

Hemmer-Hansen J., N. Overgaard, J. Pujolar. 2014. Population Genomics of Marine Fishes: Next-Generation Prospects and Challenges. *Biol. Bull-US.* 227(2):117-132.

Hoey J. A., M. L. Pinsky. 2018. Genomic signatures of environmental selection despite near-panmixia in summer flounder. *Evol. Appl.* 11(9):1732-1747.

Hozel A. R., G. A. Dover. 1989. Molecular techniques for examining genetic variation and stock identity in cetacean species. *Rep. Int. Whal. Comm.* 11:81-120.

Hubbs C. L. 1925. Fish Bulletin No. 8. Racial and seasonal variation in the Pacific herring, California sardine and California anchovy. UC San Diego, Estados Unidos de América.

Catchen J., A. Amores, P. Hohenlohe, W. Cresko, J. Postlethwait. 2011. Stacks: building and genotyping loci de novo from short-read sequences. *G3: Genes Genom. Genet.* 1:171-182.

Jombart T. 2008. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics.* 24:1403-1405.

Lamichhane S., A. M. Barrio, N. Rafati, G. Sundström, C. J. Rubin, E. R. Gilbert, J. Berglund, N. Ryman, L. Andersson. 2012. Population-scale sequencing reveals genetic differentiation due to local adaptation in Atlantic herring. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 109(47):19345–19350.

Larkin P. A. 1972. The stock concept and management of Pacific salmon. En Simon R. C. y P. A. Larkin (ed.). *The stock concept in Pacific salmon.* Universidad de Columbia Británica. Primer edición. Vancouver, Columbia Británica. pp11-15.

Le Moan A., P. A. Gagnaire, F. Bonhomme. 2016. Parallel genetic divergence among coastal-marine ecotype pairs of European anchovy explained by differential introgression after secondary contact. *Mol. Ecol.* 25(13):3187–3202.

Lecomte F., W. Grant, J. Dodson, R. Rodríguez-Sánchez, B. Bowen. 2004. Living with uncertainty: genetic imprints of climate shifts in East Pacific anchovy (*Engraulis mordax*) and sardine (*Sardinops sagax*). *Mol. Ecol.* 13(8):2169-2182.

Lluch-Cota S. E., E. A. Aragón-Noriega, F. Arreguín-Sánchez, D. Aurioles-Gamboa, J. Bautista-Romero, R. C. Brusca, A. P. Sierra-Beltrán. 2007. The Gulf of California: Review of ecosystem status and sustainability challenges. *Prog. Oceanogr.* 73(1):1–26.

Luikart G., P. England, D. Tallmon, S. Jordan, P. Taberlet. 2003. The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. *Nat. Rev. Genet.* 4(12):981-994.

Lynn R. J., J. J. Simpson. 1987. The California Current system: The seasonal variability of its physical characteristics. *J. Geophys. Res.* 92(12):12,947-12,966.

Mantel N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27:209-220.

Martinez Barrio A., S. Lamichhane, G. Fan, N. Rafati, M. Pettersson, H. Zhang, J. Dainat, D. Ekman, M. Höpper, P. Jern, M. Martin, B. Nystedt, X. Liu, W. Chen, X. Liand, C. Shi, Y. Fu, K. Ma, X. Zhan, C. Feng, U. Gustafson, C. J. Rubin, M. S. Almén, M. Blass, M. Casinii, A. Folkvord, L. Laikre, N. Ryman, S. M. Y. Lee, X. Xu, L. Andersson. 2016. The genetic basis for ecological adaptation of the Atlantic herring revealed by genome sequencing. *eLife.* 5:1-32.

Martinez E., V. Buonaccorsi, J. R. Hyde, A. Aguilar. 2017. Population genomics reveals high gene flow in grass rockfish (*Sebastes rastrelliger*). *Mar. Gen.* 33:57–63.

Martínez-Porchas M. 2012. Estudios de la distribución de la sardina del pacífico *Sardinops sagax caeruleus* (*Clupeiformes: Clupeidae*): Historia, estado actual y perspectivas. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios.* 28(3):285-300.

Mastretta-Yanes A., N. Arrigo, N. Alvarez, T. H. Jorgensen, D. Piñero, B. C. Emerson. 2014. Restriction site-associated DNA sequencing, genotyping error estimation and de novo assembly optimization for population genetic inference. *Mol. Ecol. Resour.* 15(1):28–41.

Miller A. D., A. Van Rooyen, G. Rašić, D. A. Ierodiaconou, H. K. Gorfine, R. Day, A. R. Weeks. 2016. Contrasting patterns of population connectivity between regions in a commercially important mollusk *Haliotis rubra*: integrating population genetics, genomics and marine LiDAR data. *Mol. Ecol.* 25(16):3845–3864.

- Morin P., G. Luikart, R. Wayne. 2004. SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends Ecol. Evol.* 19(4):208-216.
- Narum S. R., J. E. Hess. 2011. Comparison of FST outlier tests for SNP loci under selection. *Mol. Ecol. Resour.* 11:184–194.
- Nei M., W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76(10):5269-5273.
- Nevárez-Martínez M. O., Ma. A. Martínez-Zavala, M. L. Jacob-Cervantes, C. E. Cotero-Altamirano, J. P. Santos-Molina, A. Valdez-Pelayo. 2014. Peces Pelágicos Menores. 87-142. En: Beléndez-Moreno L. F., E. Esoino-Barr, G. Galindo-Cortés, Ma. T. Gaspar-Dillanes, L. Huidobro-Campos, E. Morales-Bojórquez (ed.) *Sustentabilidad y Pesca Responsable en México*. Editorial de la noche. Primer edición. Guadalajara, Jalisco. pp87-142.
- Oksanen J., G. F. Blanchet, R. Kindt. 2015 *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.2-1. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Paris J. R., J. R. Stevens, J. M. Catchen. 2017. Lost in parameter space: a road map for stacks. *Methods Ecol. Evol.* 8(10):1360–1373.
- Parrish R., R. Serra, W. Grant. 1989. The Monotypic Sardines, *Sardina* and *Sardinops*: Their Taxonomy, Distribution, Stock Structure, and Zoogeography. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46(11):2019-2036.
- Peterson B. K., J. N. Weber, E. H. Kay, H. S. Fisher, H. E. Hoekstra. 2012. Double Digest RADseq: An Inexpensive Method for *De Novo* SNP Discovery and Genotyping in Modern and Non-Model Species. *PlosOne*. 7(5):1-11.
- Phillips J. 1948. Growth of the sardine *Sardinops caerulea*, 1941-42 through 1946 47. *Fish Bulletin* 71:33.
- Pritchard J. K., M. Stephens, P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155:945–959.

Pujolar J. M., M. W. Jacobsen, T. D. Als, J. Frydenberg, K. Munch, B. Jónsson, M. M. Hansen. 2014. Genome-wide single-generation signatures of local selection in the panmictic European eel. *Mol. Ecol.* 23(10):2514–2528.

R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

Radovich J. 1982. The collapse of the California sardine Fishery. What have we learned? *CalCOFI Reports.* 8:56-78.

Ricker W. E. 1972. Hereditary and environmental factors affecting certain salmonid populations. En Simon R. C., P. A. Larkin (ed.). *The stock concept in Pacific salmon.* Universidad de Columbia Británica. Primer edición. Vancouver, B.C. pp19-160.

Robles J. M., S. G. Marinone. 1987. Seasonal and interannual thermohaline variability in the Guaymas Basin in the Gulf of California. *Cont. Shelf Res.* 7:715–733.

Roden G. I. 1964. Oceanographic aspects of the Gulf of California. En: Van Andel T. H., G. G. Shor Jr. (ed.). *Marine Geology in the Gulf California.* Mem. Am. Petrol. Geol. 3:30–58.

Rodríguez-Ezpeleta N., I. R. Bradbury, I. Mendibil, P. Álvarez, U. Cotano, X. Irigoien. 2016. Population structure of Atlantic mackerel inferred from RAD-seq-derived SNP markers: effects of sequence clustering parameters and hierarchical SNP selection. *Mol. Ecol. Resour.* 16(4):991–1001.

Ruggeri P., A. Splendiani, G. Occhipinti, T. Fioravanti, A. Santojanni, I. Leonori, A. de Felice, E. Arneri, G. Procaccini, G. Catanese, V. Ticina, A. Bonanno, P. Cerioni, M. Giovannotti, W. Grant, V. Caputo. 2016. Biocomplexity in Populations of European Anchovy in the Adriatic Sea. *Plos One.* 11(4):1-21.

- Russello M. A., S. L. Kirk, K. K. Frazel, P. J. Askey. 2011. Detection of outlier loci and their utility for fisheries management. *Evol. Appl.* 5:39-52.
- Saenz-Agudelo P., J. D. Dibattista, M. J. Piatek, M. R. Gaither, H. B. Harrison, G. B. Nanniga, M. L. Berumen. 2015. Seascape genetics along environmental gradients in the Arabian Peninsula: Insights from ddRAD sequencing of anemone fishes. *Mol. Ecol.* 24:6241-6255.
- Schlötterer C. 2004. Opinion: The evolution of molecular markers — just a matter of fashion? *Nat. Rev. Gene.* 5(1):63-69.
- Sinclair M. 1988. Marine populations. An essay on population regulation and speciation. *J. Anim. Ecol.* 59(2):800-801.
- Sokal R. R. 1979. Testing statistical significance of geographic variation patterns. *Syst. Zool.* 28:227-232.
- Soutar A., J. D. Isaacs. 1969. History of fish populations inferred from fish scales in anaerobic sediments of California. *CalCOFI Reports.* 13:63-70.
- Sprague L. M., A. M. Vrooman. 1962. A racial analysis of the Pacific sardine *Sardinops caeruleus* based on studies of erythrocyte antigens. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 97:131-138.
- Stanley R. R. E., C. DiBacco, B. Lowen, R. G. Beiko, N. W. Jeffery, M. Van Wyngaarden, P. Bentzen, D. Brickman, L. Benestan, L. Bernatchez, C. Johnson, P. V. R. Snelgrove, Z. Wang, B. F. Wringe, I. R. Bradbury. 2018. A climate-associated multispecies cryptic cline in the northwest Atlantic. *Sci. Adv.* 4(3):1-7
- Sverdrup H.U. 1941. The Gulf of California: preliminary discussion on the cruise of the E.W. Scripps in February and March 1939. *Proc. 6th Pac. Sci. Congr.* 3:161–166.

Teske P. R., J. Sandoval-Castillo, T. R. Golla, A. Emami-Khoyi, M. Tine, S. V. D. Heyden, L. B. Beheregaray. 2019. Thermal selection as a driver of marine ecological speciation. *P. Roy. Soci. B-Biol. Sci.* 286(1896):2018-2023.

Van Wyngaarden M., P. V. R. Snelgrove, C. DiBacco, L. C. Hamilton, N. Rodríguez-Ezpeleta, N. W. Jeffery, I. R. Bradbury. 2016. Identifying patterns of dispersal, connectivity and selection in the sea scallop, *Placopecten magellanicus*, using RADseq-derived SNPs. *Evol. Appl.* 10(1):102–117.

Vrooman A. (1964). Serologically Differentiated Subpopulations of the Pacific Sardine, *Sardinops caerulea*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada.* 21(4):691-701.

Waldman J. R. 2005. Definition of stocks: an evolving concept. En: Cadrin S. X., K. D. Friedland, J. R. Waldman. (ed.). *Stock identification methods. Applications in fisheries science.* Elsevier Academic Press. Primer edición. San Francisco, California. pp7–16.

Waples R. 1998. Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *J. Hered.* 89(5):438-450.

Winant C. D., A. W. Bratkovich. 1981. Temperature and Currents on the Southern California Shelf: A Description of the Variability. *J. Phys. Oceanogr.* 11(1):71–86.

Woodings L. N., N. P. Murphy, S. R. Doyle, N. E. Hall, A. J. Robinson, G. W. Liggins, B. S. Green, I. R. Cooke, J. J. Bell, J. M. Strugnell. 2018. Outlier SNPs detect weak regional structure against a background of genetic homogeneity in the Eastern Rock Lobster, *Sagmariasus verreauxi*. *Mar. Biol.* 165(12):1-17.

Wright S. 1951. The genetical structure of populations. *Ann. Eugen.* 15:323-354.

Xuereb A., L. Benestan, É. Normandeau, R. M. Daigle, J. M. Curtis, L. Bernatchez, M. J. Fortin. 2018. Asymmetric oceanographic processes mediate connectivity and population genetic structure, as revealed by RADseq, in a highly dispersive marine invertebrate (*Parastichopus californicus*). *Mol. Ecol.* 27(10):2347–2364.



Zhao Y., W. Peng, H. Guo, B. Chen, Z. Zhou, J. Xu, P. Xu. 2017. Population Genomics Reveals Genetic Divergence and Adaptive Differentiation of Chinese Sea Bass (*Lateolabrax maculatus*). Mar. Biotechnol. 20(1):45–59.