

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



**Evaluación de la ocurrencia de paternidad múltiple en el tiburón azul
(*Prionace glauca*) en la costa occidental de la Península de Baja California,
México.**

TESIS

Que para obtener el título de

Oceanólogo

Presenta:

Sofía Armada Tapia

Ensenada, Baja California, México.

Marzo 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

Evaluación de la ocurrencia de paternidad múltiple en el tiburón azul (*Prionace glauca*) en la costa occidental de la Península de Baja California, México.

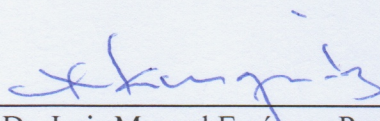
TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
OCEANÓLOGO

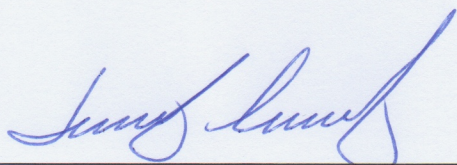
PRESENTA.

SOFÍA ARMADA TAPIA

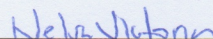
APROBADA POR.



Dr. Luis Manuel Enríquez Paredes
Director de tesis



Dr. José Leonardo Castillo Geniz
Sinodal



M.C. Nelva Lorena Victoria Cota
Secretaria

DEDICATORIA

A mis padres, Rodrigo y Gloria.

Por siempre enseñarme a dar lo mejor de mí en todo lo que hago.

Gracias por su apoyo, amor y esfuerzo.

RESUMEN

El comercio internacional de aletas, tanto legal como ilegalmente, ha sido responsable de la pesca de hasta 100 millones de individuos anualmente. El tiburón azul, *Prionace glauca*, una de las especies de tiburón más abundantes y con mayor distribución a nivel mundial, representa alrededor del 10-20% de la captura global anual de tiburones gracias a su alta demanda para el comercio de aletas de tiburón. El estudio de los sistemas de apareamiento y su influencia en la dinámica de las poblaciones es crítico para los programas de conservación y manejo de las pesquerías, especialmente para las especies sobreexplotadas. La paternidad múltiple (PM) es una estrategia reproductiva extensamente reconocida en varias especies de elasmobranquios, sin embargo, hasta hoy en día no ha sido reportada en el tiburón azul. Para evaluar la ocurrencia de PM en esta especie, se extrajo ADN de muestras de tejido de 12 hembras grávidas junto con sus camadas para llevar a cabo su genotipificación. Se probaron siete loci polimórficos para la identificación de múltiples padres y la estimación de su éxito reproductivo en una camada. Nuestros resultados sugieren que la PM es común en el tiburón azul, donde 83% de las camadas analizadas fueron fertilizadas por al menos dos padres. En especies altamente migratorias como el tiburón azul, la paternidad múltiple podría incrementar el tamaño efectivo poblacional, amortiguando la pérdida de variabilidad genética en poblaciones globales panmícticas, y reducir su riesgo de extinción.

ABSTRACT

The international shark-fin trade is supplied by both the legal and illegal trade of up to 100 million individuals annually. The blue shark, *Prionace glauca*, one of the most abundant and widely distributed shark species, is estimated to account for nearly 10-20% of the annual global catch in sharks and is a highly desired species for the shark fin trade. Understanding mating systems and their influence on population dynamics is critical in conservation and management programs, particularly for over-exploited species. Multiple paternity (MP), a widely recognized reproductive strategy in a variety of elasmobranch species, has not been investigated in blue sharks to date. Therefore, to assess MP in this species, DNA was extracted from muscle samples of 12 dams and their litters for further STR-genotyping. We tested seven polymorphic loci for single-sire exclusion and estimation of relative sire contribution in each litter. Our results suggest that multiple-sired litters are common in the blue shark with 83% of the litters sired by at least two individuals. In highly migratory species such as blue shark, multiple paternity might increase the effective population size and buffer the loss of genetic variability in global panmictic populations, thus reducing the risk of extinction.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, Dr. Luis Enríquez por inculcarme las bases sobre la genética y las técnicas moleculares, y tener la paciencia para hacerlo. Por apoyarme e impulsarme a participar en congresos y encaminar mi crecimiento académico, y por su apoyo en la realización de este trabajo y las horas dedicadas a ello.

A mi comité de tesis. A Dr. Leonardo Castillo quien me dio la oportunidad de participar en su proyecto “Programa Tiburón” y siempre tuvo las puertas abiertas. Estoy eternamente agradecida por su apoyo en este trabajo, su confianza, sugerencias y disposición. Gracias por su gran entusiasmo y amor hacia los tiburones, el cual me contagió. A M.C. Nelva Victoria, por toda su ayuda tanto en el laboratorio como en el escrito, por sus comentarios y conocimiento que me ha aportado.

Al “Programa Tiburón del Centro Regional de Investigación Acuícola y Pesquera de Ensenada, B. C.” del Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura (INAPESCA) por el apoyo de permitirnos realizar los muestreos de tiburón azul en sus instalaciones. Al igual que a todo el personal y estudiantes que participaron en el proyecto, gracias por los miles de sonrisas.

A los permisionarios, capitanes y tripulantes de los barcos palangreros de Ensenada, B. C. que proporcionaron gratuitamente los ejemplares de tiburón azul utilizados en este trabajo.

A André por su ayuda en el laboratorio eternamente agradecida, sin él nunca hubiera terminado de analizar las muestras. Por las palabras de apoyo, consejos, cariño, y por confiar en mí aún en los momentos donde yo no lo hice.

A mis profesores durante la carrera, por desempeñar con amor su profesión, y motivarnos para siempre ser mejores. Me han formado académicamente y personalmente.

A mis amigos que compartieron esta etapa conmigo, dentro y fuera del aula. Son personas maravillosas, con la mejor alegría y energía, que siempre me apoyan en todo lo que hago. No podría estar más agradecida, son mi segunda familia.

A mi familia por su apoyo y amor incondicional, nada de esto sería posible sin ustedes. Gracias por formarme la persona que soy hoy en día, llevo mucho de cada uno de ustedes y lo atesoraré para siempre.

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Antecedentes	4
2.1. Poliandria y paternidad múltiple en elasmobranquios	4
2.2. La biología reproductiva del tiburón azul	8
2.3. Pesquería del tiburón azul	10
2.4. Microsatélites como marcadores moleculares	12
3. Hipótesis	15
4. Objetivos	15
4.1. General	15
4.2. Específicos	15
5. Área de estudio	16
6. Metodología	17
6.1. Colecta de muestra	17
6.2. Procesamiento de muestras	19
6.3. Análisis estadístico y control de calidad de la genotipificación	24
6.4. Estimación de paternidad múltiple	25
7. Resultados	27
7.1. Genotipificación	27
7.2. Estimación de paternidad múltiple	31
8. Discusión	36
8.1. Aspectos metodológicos	36
8.2. Paternidad múltiple en el tiburón azul	38
8.3. Implicaciones en la conservación de las especies de elasmobranquios	42
9. Conclusiones	47
10. Recomendaciones	48
11. Referencias	49

Lista de tablas

Tabla I. Loci microsatélites para <i>P. glauca</i> que fueron evaluados para su optimización en amplificaciones múltiples (multiplexing PCR).....	20
Tabla II. Conjuntos de microsatélites obtenidos de Taguchi y colaboradores (2013) utilizados para la amplificación de PCR.....	27
Tabla III. Número de embriones genotipificados para cada una de las hembras grávidas. Se indica la longitud total (LT) en cm de la madre, el número de embriones y el número de éstos que fueron genotipificados.....	29
Tabla IV. Índice de diversidad genética y probabilidad de identidad de los 5 microsatélites empleados en la H01.....	30
Tabla V. Índice de diversidad genética y probabilidad de identidad del “Conjunto A” de 3 microsatélites seleccionados para la genotipificación multilocus de los especímenes de tiburón azul.....	31
Tabla VI. Genotipo estimado del padre y de la madre en los 3 microsatélites. Incluye la progeñe por padre y la probabilidad de que un padre tenga ese genotipo.	34
Tabla VII. Reportes sobre los análisis de paternidad múltiple y sus sistemas de apareamiento en los elasmobranquios.....	44

Lista de figuras

Figura 1. Área de estudio. Zonas de captura de los viajes pesqueros de *Prionace glauca*.....**18**

Figura 2. Ejemplo de las lecturas de los genotipos de tres embriones de la camada de la hembra H06.....**32**

Figura 3. Número de padres estimados por camada.**35**

Lista de anexos

Anexo 1. Tabla complementaria de datos generales para hembras grávidas.....	62
Anexo 2. Tabla complementaria de datos generales para machos.....	64
Anexo 3. Tabla complementaria de datos generales para embriones	66

1. Introducción

Los condriictios son considerados unos de los grupos taxonómicos más exitosos desde una perspectiva evolutiva, pues el desarrollo de sus adaptaciones les ha permitido sobrevivir a las extinciones que han ocurrido en los últimos 400-450 millones de años (Carrier *et al.*, 2004; Grogan y Lund, 2004). Este grupo de peces de esqueleto cartilaginoso es diverso, e incluye a los elasmobranquios (tiburones y batoideos) y los holocéfalos (quimeras) (Conrath y Musick, 2012).

A lo largo de su historia evolutiva, los elasmobranquios han desarrollado distintas y complejas estrategias reproductivas. Aunque todos los representantes del este grupo presentan fecundación interna, la estrategia reproductiva (oviparidad, ovoviviparidad o viviparidad), los periodos de gestación, sistemas de apareamiento y ciclos ováricos pueden variar entre especies e incluso dentro de la misma especie en respuesta a sus parámetros demográficos (Carrier *et al.*, 2004).

Los sistemas de apareamiento (p.e. monogamia o poligamia), influyen de manera importante en la dinámica de las poblaciones (Griffiths *et al.*, 2012), ya que pueden modificar la identidad y la estructura genética poblacional, su demografía y potencial adaptativo (Pearse y Anderson, 2009; Ashby y Gupta, 2013; Holman y Kokko, 2013; Marino *et al.*, 2015). La poliandria es una estrategia de apareamiento bastante común en los elasmobranquios, tanto en especies con reproducción vivípara como ovovivípara (Portnoy y Heist, 2012; Corrigan *et al.*, 2015; Holmes *et al.*, 2018), y puede tener como consecuencia la formación de camadas de múltiples padres; donde una hembra copula con dos o más machos, y éstos contribuyen en la producción de la progenie (Carrier *et al.*,

1994; Daly-Engel *et al.*, 2006). Pese a que la biología reproductiva de los elasmobranchios ha sido estudiada ampliamente, los aspectos relacionados con las estrategias de apareamiento no son tan conocidos. Esto debido a la dificultad de llevar a cabo observaciones directas de su comportamiento durante el cortejo y la cópula, en parte por el hecho de que, al tener un hábitat no tan accesible, se tiene un conocimiento limitado de las áreas de reproducción (Portnoy y Heist, 2012; Marino *et al.*, 2015). Sin embargo, la incorporación de marcadores genéticos moleculares ha facilitado el estudio del comportamiento reproductivo (Fitzpatrick *et al.*, 2012; Marino *et al.*, 2015), aportando información que no podría ser corroborada usando exclusivamente las observaciones de campo (Zeh y Zeh, 2001).

El uso de estos marcadores genéticos ha permitido reconocer la presencia de paternidad múltiple en especies que se creían monógamas, así como confirmar y estimar su frecuencia en especies poliándricas (Zeh y Zeh, 2001; Castillo-Páez, 2017). Las ventajas de la paternidad múltiple incluyen el aumento de la variabilidad genética y el potencial de adaptación de las poblaciones (Chapman *et al.*, 2004; Griffiths *et al.*, 2012), incrementa el éxito reproductivo de los machos (Daly-Engel *et al.*, 2010), y aumenta la tasa de supervivencia de la progenie donde la hembra es fecundada con espermatozoides de “mejor calidad” (Yasui, 1998; Zeh y Zeh, 2001).

El estudio de la biología reproductiva para estas especies es importante ya que son altamente vulnerables y tienen una baja resiliencia a la explotación por su historia de vida (Smith *et al.*, 1998). La mayoría de las especies de tiburón tienen una baja fecundidad, edad tardía de madurez y una tasa de crecimiento lenta (Chapman *et al.*, 2004; Holmes *et*

al., 2018), por lo que conocer a detalle los sistemas de apareamiento de estas especies puede contribuir a evaluar el impacto y las posibles consecuencias reproductivas de la explotación comercial (Daly-Engel *et al.*, 2006), permitiendo así la planificación de estrategias orientadas al manejo pesquero sustentable y a la conservación de la biodiversidad (Walker, 2005).

El tiburón azul es la especie de tiburón más abundante y con la distribución más amplia, razón por la que es la especie con mayor número de capturas tanto por pesca dirigida como de forma incidental (Sosa-Nishizaki *et al.*, 2008; Furlong-Estrada *et al.*, 2017). En el Pacífico Noreste de México el tiburón azul es la especie con mayor abundancia, por lo que es el principal objetivo de la captura por parte de la flota palangrera tiburonera en aguas oceánicas y la segunda especie de tiburón más importante de las capturas en aguas costeros-oceánicas (Sosa-Nishizaki *et al.*, 2002; Völger-Santos, 2011).

Pese a que el tiburón azul es una de las especies de elasmobranquios de mayor importancia comercial, se desconocen aún algunos aspectos sobre su biología reproductiva que son fundamentales para entender la dinámica de sus poblaciones y poder llevar a cabo una explotación responsable y sustentable. En particular, el presente trabajo está orientado al estudio de la estrategia de apareamiento del tiburón azul para evaluar la ocurrencia de paternidad múltiple.

2. Antecedentes

2.1. Poliandria y paternidad múltiple en elasmobranquios

La poliandria es una estrategia reproductiva común en varios taxones como los insectos, peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos, en los que como consecuencia pueden presentarse eventos de paternidad múltiple (Evans y Magurran, 2000; Adams *et al.*, 2005; Bretman y Tregenza, 2005; Daly-Engel *et al.*, 2006; Dean *et al.*, 2006; Jensen *et al.*, 2006; Daly-Engel *et al.*, 2010). En varias ocasiones la poliandria puede presentarse como consecuencia de la reproducción gregaria en la que el esperma de varios machos puede traslaparse en tiempo y espacio, fecundando el mismo conjunto de óvulos (Pizzari y Wedell, 2013). La paternidad múltiple se presenta frecuentemente en los peces donde la fertilización es interna, tal es el caso de los elasmobranquios (Feldheim *et al.*, 2001; Saville *et al.*, 2002; Chapman *et al.*, 2004; Schmidt *et al.*, 2010; Byrne y Avise, 2012; Fitzpatrick *et al.* 2012; Griffiths *et al.*, 2012; Marino *et al.*, 2015; Pirog *et al.*, 2015; Lyons *et al.*, 2017).

Se sabe que la paternidad múltiple puede afectar directamente la variabilidad genética y el potencial de adaptación de las poblaciones (Chapman *et al.*, 2004; Griffiths *et al.*, 2012), pero hasta la fecha todavía existen diversas hipótesis sobre las ventajas de esta estrategia reproductiva. En el caso de los elasmobranquios, para los machos, la ventaja de aparearse con varias hembras es bastante evidente ya que, al aparearse con múltiples parejas, su descendencia va a ser mayor y por ende su éxito reproductivo aumentaría (Daly-Engel *et al.*, 2010). Por otro lado, las hembras, por el hecho de que no reciben algún beneficio nupcial o de cuidado por parte de los machos, los beneficios son menos evidentes. Se cree

que los beneficios de aparearse con varios machos son indirectos o genéticos. (Zeh y Zeh, 2001; Daly-Engel *et al.*, 2010; Griffiths *et al.*, 2012; Pirog *et al.*, 2015).

La hipótesis sobre los beneficios intrínsecos consiste en que la cópula con varios machos puede aumentar la probabilidad de fecundar el óvulo con un espermatozoide de “buena calidad” (Watson, 1991; Madsen *et al.*, 1992; Birkhead *et al.*, 1993; Zeh y Zeh, 2001). Esto a su vez implica que el aparearse con varios machos puede compensar por una mala elección de pareja (Kempnaers *et al.*, 1992; Zeh y Zeh, 2001), al igual que disminuir la probabilidad de fecundar con espermatozoides incompatibles (Zeh y Zeh, 2001; Chapman *et al.*, 2004; Castillo-Páez, 2017). Como consecuencia la progenie de la hembra va a tener una mayor variabilidad genética, y esto puede aumentar su probabilidad de supervivencia ante una incertidumbre ambiental (Yasui, 1998; Zeh y Zeh, 2001). Además, la descendencia masculina de la hembra tendría el potencial de producir espermatozoides con mayor diversidad genética y competitivamente superior, con lo que aumentaría su éxito reproductivo (Keller y Reeve, 1995; Zeh y Zeh, 2001).

La teoría más aceptada es que la paternidad múltiple es una consecuencia del conflicto sexual, conocido como poliandria por conveniencia. Esta teoría hipotetiza que el gasto energético para evadir cópulas múltiples sería mayor al que representa el apareamiento múltiple, por lo que es común que las hembras copulen con varios machos (DiBattista *et al.*, 2008; Griffiths *et al.*, 2012; Pirog *et al.*, 2015). Normalmente los apareamientos entre elasmobranchios son muy agresivos; los machos muerden a las hembras durante la cópula (Parsons *et al.*, 2008; Pirog *et al.*, 2015), lesionando sus costados e incluso la cloaca debido a la penetración (Pratt y Carrier, 2001).

En los sistemas donde la paternidad múltiple está presente, el éxito reproductivo de los machos va a depender del acceso y la oportunidad de fecundar a una hembra. Esto puede conllevar a la competencia entre machos, y a su vez a la evolución de varias estrategias para aumentar su éxito reproductivo (Lyons *et al.*, 2017). En las especies en las que la competencia intrasexual conlleva a que los espermias compiten para fecundar el óvulo después de la cópula (Parker, 1970; Lyons *et al.*, 2017), generalmente se presenta el desarrollo de testículos de mayores dimensiones (tamaño o peso) en relación a especies en las que la disponibilidad de parejas y el éxito reproductivo es más equitativo (Lyons *et al.*, 2017).

Por otro lado, las hembras han desarrollado una serie de estrategias reproductivas que pueden promover o inhibir el acceso de los espermias a los huevos, como la elección críptica (Lyons *et al.*, 2017). Esta estrategia permite a la hembra “elegir” los espermatozoides que van a fecundar sus huevos a través de diversos mecanismos de comportamiento, fisiológicos y/o morfológicos (Portnoy y Heist, 2012; Lyons *et al.*, 2017). La frecuencia de paternidad múltiple es, sin duda, reflejo de la probabilidad de encuentro entre individuos maduros (Daly-Engel *et al.*, 2010; Nosal *et al.*, 2013).

Ciertas especies de elasmobranquios pueden extender su periodo de ovulación (Castro, 2000), extender sus periodos de apareamiento (Kajiura *et al.*, 2000), o almacenar esperma durante periodos prolongados (Pratt, 1993). Existen además ciertos eventos que pueden aumentar la tasa de encuentro entre parejas potenciales, tales como la formación de agregaciones espacio-temporales para el apareamiento o la filopatría de las hembras a las zonas de crianza, con los que puede favorecerse la ocurrencia de poliandria (Carrier *et al.*,

1994; Whitney *et al.*, 2004; Schmidt *et al.*, 2010; Marino *et al.*, 2015; Castillo-Páez, 2017) y aumentar la probabilidad de éxito reproductivo (Daly-Engel *et al.*, 2006).

No obstante, ya que en la mayoría de los elasmobranquios la agregación durante la temporada de apareamiento no parece ser tan común (Daly-Engel *et al.*, 2006), es probable que las hembras se apareen con cualquier pareja potencial, ya que tienen poca oportunidad para evaluar al macho (Carrier *et al.*, 1994; Daly-Engel *et al.*, 2006).

Una intensa explotación pesquera pudiera tener un efecto de reducción en la tasa de encuentro entre organismos debido a la disminución global en la densidad poblacional o a una alteración en la proporción de sexos (Daly-Engel *et al.*, 2006; Castillo-Páez, 2017). Es por ello que el estudio de la biología reproductiva de los elasmobranquios, que incluye la estructura de talla y edades de los individuos maduros, comportamiento reproductivo (sistemas de apareamiento), los periodos de ovulación, zonas y temporadas de apareamiento, gestación y nacimiento, es esencial para poder llevar a cabo un manejo y conservación adecuado en especies bajo explotación comercial, especialmente en aquellas con alta vulnerabilidad (Castillo-Páez, 2017).

A pesar de que existe una gran variedad de estudios sobre la biología reproductiva en elasmobranquios, para muchas especies de tiburones no se cuenta con suficiente información sobre sus sistemas de apareamiento. Esto generalmente está asociado con la dificultad para la obtención de organismos completos a partir de las capturas comerciales, lo que limita la posibilidad de seleccionar y tomar datos de hembras grávidas y sus camadas, especialmente en especies de hábitos pelágicos (Corrigan *et al.*, 2015; Holmes *et al.*, 2018).

2.2. La biología reproductiva del tiburón azul

El tiburón azul es una especie oceánica epipelágica, perteneciente a la familia Carcharhinidae, y es una de las especies de tiburón más abundantes en el mundo. Tiene una distribución cosmopolita en los océanos tropicales y templados, en latitudes entre ~60°N hasta 50°S (Nakano y Stevens, 2008; Fujinami *et al.*, 2017). Nakano y Stevens (2008) observaron que la abundancia del tiburón azul se incrementa a mayores latitudes que el ecuador, y en aguas tropicales se encuentran a mayor profundidad. Es una especie a la que se le puede encontrar entre la superficie y los 600 m de profundidad, aunque se ha reportado que puede llegar casi hasta los 1000 m (Stevens *et al.*, 2010). Abundan en temperaturas frías entre 7° y 16°C (Compagno, 1984), pero puede tolerar temperaturas mayores a 21°C (Compagno, 1984; Nakano y Stevens, 2008).

Es una especie altamente migratoria a grande escala (Fujinami *et al.*, 2017), con patrones complejos de movimientos y distribución relacionados con su reproducción, la distribución de su alimento y las variaciones estacionales de la temperatura del agua (Kohler y Turner, 2008; Nakano y Stevens, 2008; Vögler-Santos *et al.*, 2012). Las rutas migratorias realizadas por esta especie pueden cubrir grandes distancias ya que puede cruzar cuencas oceánicas (Völger-Santos, 2011).

Por lo general las poblaciones de tiburón azul se segregan dependiendo de su tamaño y sexo (Litvinov, 2006). Normalmente los juveniles y las hembras preñadas se encuentran más cercanos a la costa, en zonas llamadas “zonas de crianza”, y los adultos machos se segregan en aguas oceánicas, en grupos conocidos como “clubes de machos” (Litvinov,

2006; Vögler-Santos *et al.*, 2012). No obstante, debido a la distancia geográfica entre ambos grupos, es común que éstos se mezclen (Litvinov, 2006). Adicionalmente se ha reportado que en la temporada de reproducción las hembras maduras migran hacia las zonas oceánicas en donde se encuentran los grupos de machos para aparearse. Las hembras pueden permanecer ahí durante la primera etapa de fertilización y posteriormente migrar hacia las zonas de crianza para dar a luz (Litvinov, 2006; Nakano y Stevens, 2008).

La reproducción del tiburón azul es vivípara placentaria (Compagno, 1984; Nakano y Stevens, 2008), con una alta fecundidad con un promedio de 30-40 embriones por camada (Stevens *et al.*, 2010), sin embargo, pueden llegar a tener hasta 135 embriones (Compagno, 1984). Se estima que su periodo de gestación se encuentra entre 9 a 12 meses (Pratt, 1979; Compagno, 1984; Nakano y Stevens, 2008; Carrera-Fernández *et al.*, 2010; Fujinami, 2017). Se ha observado una variación reproductiva en las poblaciones del tiburón azul en distintas regiones, en donde pueden presentarse ciclos reproductivos anuales o bienales. Fujinami y colaboradores (2017) estiman que el ciclo reproductivo es anual, con un pequeño porcentaje de hembras que se reproducen menos frecuentemente. En contraste, Carrera-Fernández y colaboradores (2010) llegaron a la conclusión que el tiburón azul tiene un ciclo reproductivo bienal.

Por lo general las crías nacen con una longitud precaudal (LPC) de 34-36cm (Fujinami *et al.*, 2017) y los adultos llegan a tener una longitud total de 383cm (Compagno, 1984; ISC, 2017). En el Pacífico norte el 50% de las hembras se consideran maduras a los 6.3 años con una LPC de 156.6-167.4cm, y para los machos el 50% son maduros a los 5.5 años con una LPC de 160.9cm (Fujinami *et al.*, 2017).

Una de las características reproductivas interesantes del tiburón azul es que las hembras pueden almacenar esperma en las glándulas oviducuales posteriormente a la cópula, y pueden almacenarlas de 9-12 meses, igual que el periodo de gestación. Sin embargo, es una característica en hembras maduras que copulan frecuentemente (Pratt, 1979).

El tiburón azul se podría considerar como una de las pocas especies de tiburón de tamaño grande (>2m de longitud) con una productividad biológica relativamente alta gracias a su tasa de crecimiento alta, madurez sexual entre los 4-6 años, y su alta fecundidad, con un promedio de 35 crías (Furlong-Estrada *et al.*, 2017; Rigby *et al.*, 2019). Además, es una especie clave en los ecosistemas pelágicos en aguas de todo el mundo por ser un depredador de alto nivel (Litvinov, 2006).

2.3. Pesquería del tiburón azul

Debido a su abundancia y distribución cosmopolita (Vögler-Santos *et al.*, 2012; Furlong-Estrada *et al.*, 2017), el tiburón azul representa una especie objetivo en varias pesquerías de tiburón a nivel mundial, orientadas principalmente a la comercialización de las aletas y la carne, al igual que de su piel y el aceite del hígado (Compagno, 1984; Camhi *et al.*, 2008; Vögler-Santos *et al.*, 2012; Fujinami *et al.*, 2017). Además, el tiburón azul es la especie más frecuentemente capturada de forma incidental por pesquerías de palangre y con redes de enmalle a nivel global, especialmente por pesquerías de atunes y pez espada (Nakano y Stevens, 2008; ISC, 2017).

En ciertas regiones como el Atlántico Norte y Sur, y el Océano Índico se han estimado disminuciones en su población, mientras que para el Pacífico Norte y Sur se ha reportado incrementos en su abundancia (Rigby *et al.*, 2019). El tiburón azul se encuentra clasificado

actualmente como especie “casi en riesgo” (Near Threatened) en la Lista Roja de Especies de la IUCN (International Union for Conservation of Nature). Esta categoría representa a especies con evaluaciones poblacionales inciertas, pero en las que existen evidencias de que está próxima a cumplir con los criterios para considerarla dentro de las categorías de riesgo. Para el caso del tiburón azul algunos estudios sugieren una reducción promedio de 7.3% en su población en los últimos 30 años (~3 generaciones), mientras que otras evaluaciones indican que la reducción ha sido de hasta un 20-29% (Rigby *et al.*, 2019).

En el Pacífico Noreste de México el tiburón azul es la especie con mayor número de capturas por la flota palangrera en aguas oceánicas, y la segunda especie más importante en aguas costero-oceánicas (Sosa-Nishizaki *et al.*, 2002; Völger-Santos, 2011), siendo la especie más capturada tanto por pesca dirigida como incidental (Sosa-Nishizaki *et al.*, 2008; Furlong-Estrada *et al.*, 2017). En México es la especie más importante comercialmente, siendo una fuente importante de alimento e ingresos económicos, principalmente en las comunidades costeras del Pacífico Norte, en la península de Baja California (Blanco-Parra *et al.*, 2008; Godínez-Padilla *et al.*, 2016; Furlong-Estrada *et al.*, 2017).

En el periodo de 2011-2015 Godínez-Padilla y colaboradores (2016), examinaron 683 bitácoras de pesca comercial de tiburón de la flota palangrera de Ensenada, Baja California, registrando que, de las 18 especies capturadas, el 89.25% de la captura total fue de tiburón azul. Esta proporción es similar en otras regiones, tanto en México como en el mundo, lo que ha generado una preocupación por el impacto de las capturas sobre las poblaciones del tiburón azul. Aunado a lo anterior, el notable incremento en las

capturas ilegales de elasmobranchios en todos los océanos, incluyendo una proporción importante que no puede ser cuantificada, agravan la situación (Camhi, 2008)

A pesar de que el tiburón azul representa los mayores volúmenes de captura de la pesquería legal, así como de la pesca ilegal, no declarada y no reglamentada (INDNR), aún se desconocen a detalle muchos aspectos de su biología reproductiva.

Por lo anterior, es esencial conocer el estado de salud de las poblaciones de tiburones. Para esto es importante conocer ciertos atributos, como los parámetros reproductivos, para poder evaluar las poblaciones y el riesgo ecológico que conlleva la explotación pesquera (Walker, 2004; Carrera-Fernández *et al.*, 2010). Estimar los parámetros reproductivos, como la fecundidad, proporción sexual intrauterina, relación número de crías y talla de la madre, frecuencia reproductiva, entre otros, es fundamental para establecer puntos de referencia biológicos para desarrollar estrategias de manejo pesquero apropiadas (Walker, 2005).

2.4. Microsatélites como marcadores moleculares

La genética molecular ha representado una herramienta sumamente valiosa para el estudio de los elasmobranchios, ya que a partir de una pequeña muestra de tejido se puede obtener una gran cantidad de información sobre el individuo, sus poblaciones, la especie y su historia evolutiva (Dudgeon *et al.*, 2012). Esta información es clave para conocer sus niveles de variabilidad genética, delimitar sus poblaciones y su conectividad, conocer su tamaño efectivo y estudiar sus sistemas de apareamiento y demografía histórica, aspectos fundamentales para la implementación de estrategias para la conservación y manejo de las especies (Larson *et al.*, 2017).

Los microsatélites son los marcadores genéticos más utilizados en estudios de asignación de paternidad y niveles de parentesco debido a sus altos niveles de polimorfismo y amplia distribución en el genoma (Portnoy y Heist, 2012). Los microsatélites son secuencias cortas de ADN nuclear compuestas por unidades repetitivas de nucleótidos, generalmente de entre dos y hasta seis nucleótidos repetidos en tándem (Silver, 2001; Vázquez-Lobo y Morales-García, 2014). Aunque se distribuyen en regiones codificantes y no codificantes, las últimas son particularmente abundantes y son caracterizados por tener niveles muy altos de polimorfismo, lo que los hace ideales para ser utilizados como marcadores moleculares (Zane *et al.*, 2002; Portnoy y Heist, 2012; Vázquez-Lobo y Morales-García, 2014).

El uso de los marcadores microsatélites, permite analizar la segregación de los alelos y entender los sistemas de apareamiento y la asignación parental cuando las observaciones en campo no son posibles o no aportan suficiente evidencia (Zeh y Zeh, 2001; Castillo-Páez, 2017). Estos marcadores han permitido reportar la paternidad múltiple en especies que se creían monógamas, al igual que en especies poliándricas (Zeh y Zeh, 2001; Marino *et al.*, 2015).

Mediante el uso de microsatélites se han estudiado los sistemas de apareamiento en diversas especies de elasmobranquios, lo que ha permitido determinar la ocurrencia de paternidad múltiple en especies como el tiburón gata *Ginglymostoma cirratum* (Saville *et al.*, 2002), el cazón cabeza de pala *Sphyrna tiburo* (Chapman *et al.*, 2004), la raya redonda común *Urobatis halleri* (Lyons *et al.*, 2017), el tiburón gato moteado *Scyliorhinus canicula* (Griffiths *et al.*, 2012), los tiburones sedosos *Mustelus mustelus* y *Mustelus*

punctulatus (Marino *et al.*, 2015), el tiburón toro *Carcharhinus leucas* (Pirog *et al.*, 2015) y tiburón limón, *Negaprion brevirostris* (Feldheim *et al.*, 2001), entre otros.

Bajo el escenario planteado, el presente trabajo de tesis plantea llevar a cabo, a través del uso de marcadores genéticos tipo microsatélite, un análisis de asignación parental en camadas de tiburón azul obtenidas de hembras grávidas capturadas por la flota tiburonera palangrera de la costa occidental de la Península de Baja California. A partir de la información proporcionada por el análisis se podrá conocer si la especie presenta paternidad múltiple al igual que su frecuencia, contribuyendo al conocimiento de la biología reproductiva y la planeación de las estrategias de manejo y conservación de este importante recurso pesquero de la región y del país.

3. Hipótesis

Con base en las evidencias de paternidad múltiple en otras especies de elasmobranquios, incluyendo al grupo de los carcarínidos, se espera que la mayoría de las hembras de tiburón azul (*Prionace glauca*) de la costa occidental de la Península de Baja California, exhiban esta estrategia de apareamiento.

4. Objetivos

4.1. General

Evaluar la ocurrencia de paternidad múltiple en el tiburón azul (*Prionace glauca*) en las zonas de pesca de la costa occidental de la Península de Baja California.

4.2. Específicos

- 4.2.1.** Cuantificar el nivel de polimorfismo de los microsatélites en las muestras de tiburón azul de la zona de estudio.
- 4.2.2.** Optimizar la amplificación múltiple de un conjunto de microsatélites informativos para identificar la presencia de paternidad múltiple en la especie.
- 4.2.3.** Estimar la frecuencia de paternidad múltiple con base en los genotipos multilocus de la progenie.
- 4.2.4.** Calcular la contribución individual de cada macho en las camadas con paternidad múltiple.

5. Área de estudio

La zona económica exclusiva de México en el Pacífico cuenta con más de 2.3 millones de km² de extensión marina. Cuenta con una batimetría sumamente variable ya que la máxima profundidad registrada, frente a las costas de Chiapas y Oaxaca, es de más de 6,000 m., sin embargo, la mayor parte de la región no sobrepasa los 2,000 m (Espinosa, 2004).

El Pacífico nororiental mexicano es una región muy dinámica, gracias a la influencia de corrientes oceánicas (Völger-Santos, 2011) y las surgencias (Parés-Sierra *et al.*, 1997). La más importante es la Corriente de California, que ingresa desde el noroeste hasta el ecuador (Kessler, 2006; Völger-Santos, 2011), caracterizada por tener agua de baja temperatura y salinidad (De la Lanza-Espino, 1991), y ser controlada por un viento dominante (Espinosa-Carreón *et al.*, 2007). Otra corriente de gran influencia, por ejemplo, es la Corriente Costera Mexicana, que proviene de la región tropical desde el sureste, y sube hasta el polo norte, paralelo a la costa (Lavín *et al.*, 2006; Völger-Santos, 2011). También se presenta una contracorriente subsuperficial con dirección hacia el polo a lo largo del talud continental, conocida como la Contracorriente de California (Durazo *et al.*, 2010). Las surgencias son resultantes del forzamiento de gran escala y del bombeo de agua fría, regidas por los vientos del NW-SE, y aportan energía al sistema (Parés-Sierra *et al.*, 1997). Además, en la capa superficial se encuentran las corrientes geostróficas a lo largo de la costa, en dirección al sur (Kessler, 2006).

6. Metodología

6.1. Colecta de muestra

La colecta de muestras fue llevada a cabo por las embarcaciones de la industria pesquera palangrera tiburonera de Ensenada, B. C., durante el periodo de enero a noviembre de 2019 en un total de 14 viajes de pesca comercial. La pesca de tiburón azul se lleva a cabo a lo largo de la costa de la Península de Baja California en el Pacífico noroeste de México, en puntos variables entre viajes de pesca y temporadas. Las zonas de captura de la temporada enero-noviembre 2019 se indican en la Figura 1.

Los individuos obtenidos fueron examinados en el Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura (INAPESCA), donde se documentó la longitud total (LT), longitud furcal (LF), longitud precaudal (LPC) y longitud interdorsal (LID), así como el peso total de cada uno de los individuos. Para las hembras y machos también se midieron sus órganos reproductores. Además, los embriones de las hembras grávidas fueron sexados, medidos, pesados y se registró el útero al que pertenecían (derecho o izquierdo) (Anexo 1, 2 y 3).

Se cortaron pequeñas muestras de tejido muscular de cada espécimen (adultos y progenie), almacenándolos de forma individual en tubos de plástico con tapa de rosca debidamente etiquetados. Para garantizar la integridad de las muestras de tejido, éstas fueron almacenadas y preservadas a -20°C hasta su procesamiento. En total se recolectaron muestras de 22 machos, 12 hembras grávidas y 246 embriones.

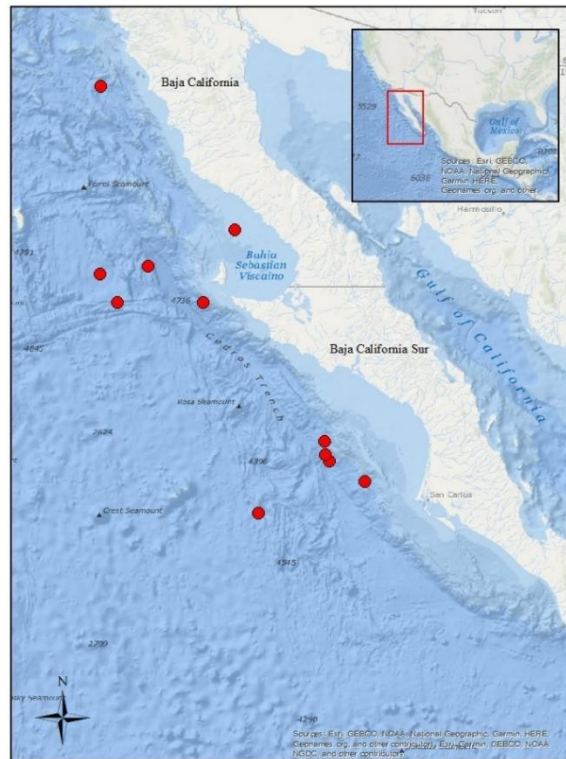


Figura 1. Área de estudio. Zonas de captura de los viajes pesqueros de *Prionace glauca*.

6.2. Procesamiento de muestras

6.2.1. Extracción de ADN

La extracción del ADN genómico fue realizada mediante la digestión del tejido muscular utilizando *proteínasa K* (20mg/ml), y *STEN* (0.4 M NaCl, 10mM Tris-HCl, 2mM EDTA pH 8, 20% SDS), y precipitando el ADN mediante el método de sales-Proteínasa K adaptada con diferencia de volúmenes de Aljanabi y Martínez (1997).

6.2.2. Optimización y control de calidad de amplificación

Para la genotipificación de las muestras, se seleccionaron 7 microsatélites altamente polimórficos desarrollados para la especie *P. glauca* (Taguchi *et al.*, 2013) con la finalidad de identificar los marcadores con mejor desempeño (reproducibilidad y eficiencia en la amplificación). La información detallada de los marcadores empleados se describe en la Tabla I.

Tabla I. Loci microsatélites para *P. glauca* que fueron evaluados para su optimización en amplificaciones múltiples (multiplexing PCR). Se indica el nombre original de cada locus y el número de alelos (NA) reportado en tiburones azules del Pacífico Norte por Taguchi y colaboradores (2013). La secuencia de cada cebador “forward” (F) incluye la secuencia de la etiqueta universal empleada para la incorporación del fluorocromo (TGTA AACGACGGCCAGT) y el fluorocromo específico.

Etiqueta de microsatélite	Locus (NA)	Secuencia 5' – 3'
		F: forward / R: reverse
TA1	EHDO8 (14)	F: TGTA AACGACGGCCAGTCCCCTCACCTATTCTTCTTTT ^{FAM} R: CCAATACATGCTTCGGGTAAAT
TA2	DZOXN (13)	F: TGTA AACGACGGCCAGTCACCAGAATCCAAAGTTTGACA ^{FAM} R: GGATGAATACTGAAGAAACGGC
TA3	BEF94 (12)	F: TGTA AACGACGGCCAGTACTGGTAGCTTCAGTTTGGGAA ^{FAM} R: CAGCATCTATCATTGTTAACGCA
TA4	CY92Z (19)	F: TGTA AACGACGGCCAGTGCCGATTGATTTTTACACATT ^{FAM} R: TCTCGATCTTTCTCTACCTCGC
TA5	A2ASY (16)	F: TGTA AACGACGGCCAGTGAAGTCCGACTGTAATCTTGCC ^{FAM} R: AGCTGCAGAGACAGTTGTAACG
TA6	DOMST(10)	F: TGTA AACGACGGCCAGTTAGACACTGATCTCATGCCTTTG ^{FAM} R: CACCATTT CAGGCTAGATCACA
TA7	D1Q4A (9)	F: TGTA AACGACGGCCAGTCACATGAGCTTCCTGCTCTAA ^{FAM} R: AGGGTTGCAGATTGGATAGAGA

La amplificación por PCR se llevó a cabo en un termociclador BioRad® C1000 Touch™, con una mezcla de reacción con una concentración final de 0.22 mM de Tris (pH 8.4), 55 mM de KCl, 0.22 mM de dNTP's, 1.2 U de *Taq* DNA polimerasa recombinante (Invitrogen™), y aproximadamente 15 – 30 ng/μl de ADN. La mezcla de cebadores incluía el cebador en sentido hacia adelante (forward) y el inverso (reverse), los cuales fueron modificados para la amplificación con base en el protocolo de marcaje universal recomendado por Shimizu y colaboradores (2002). El cebador forward de cada microsatélite fue etiquetado en el extremo 5' con una secuencia universal (M13: 5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'), con la finalidad de que el cebador reverse pueda generar la cadena complementaria para un segundo cebador forward marcado con un fluorocromo específico (p.e. 6-FAM®). De esta forma, el tamaño de los amplicones generados pueden ser detectadas en el secuenciador a través de un análisis de fragmentos automatizado. La proporción de los cebadores para la amplificación fue de 1:2:2, donde el cebador forward con la etiqueta universal tiene una concentración de 0.086 μM, el cebador reverse de 0.172 μM y el cebador forward marcado con el fluorocromo de 0.172 μM, respectivamente.

Con base en el protocolo reportado por Taguchi y colaboradores (2013), el perfil de amplificación empleado consistió en 3 min de desnaturalización inicial a 94°C, seguido por 25 ciclos a 96°C por 20 s de desnaturalización, 54°C por 40 s para la hibridación o incorporación de los cebadores y 72°C por 40 s de extensión de la cadena. Al concluir estos primeros ciclos de amplificación, se adicionaron al perfil ocho ciclos de 20 s a 95°C, 40 s a 53°C y 40 s a 72°C para favorecer la amplificación

con el cebador marcado con fluorocromo y un periodo de extensión final del programa de 15 min a 70°C.

Para garantizar que las condiciones de amplificación de cada una de las muestras sean homogéneas, se siguieron los protocolos de aseguramiento y control de calidad descritos tanto por Morin y colaboradores (2010) como por Tiedemann y colaboradores (2012), en los que se consideran controles positivos y negativos. Los controles negativos (reactivos sin ADN) se utilizaron con la finalidad de asegurar que no haya contaminación de reactivos en la mezcla de reacción, y los controles positivos (muestras por duplicado) para confirmar la reproducibilidad de la amplificación y la correcta asignación al nombrar los alelos por su tamaño en pares de base. Las reacciones de amplificación de las muestras y los controles se distribuyeron de forma aleatoria en las placas de 96 pozos para PCR.

La calidad y eficiencia de los productos de la amplificación fueron evaluadas a partir de una electroforesis en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio (0.5 µg/ µL), colocando 5 µl del producto en los pozos del gel, incluyendo una escalera como referencia para conocer el tamaño, corriendo a 80 V durante 45 minutos, y al final fueron visualizados bajo una lámpara de luz ultravioleta. Las muestras que no presentaron una amplificación eficiente o de buena calidad (banda bien definida e intensa) se volvieron a amplificar. Para aquellas muestras en las que no se obtuvieron amplicones durante la segunda amplificación, se repitieron desde el paso de la extracción del ADN.

6.2.3. Análisis automatizado de fragmentos y genotipificación.

Las placas con los productos de PCR fueron enviadas al laboratorio comercial Retrogen, Inc. (California, E.U.A.), donde se realizó el análisis de fragmentos en un secuenciador automático ABI Prism® 3100 (Applied Biosystems). Este análisis se basa en la separación de los productos de PCR en función de su peso molecular a través de una electroforesis capilar y la lectura automática del tamaño del fragmento marcado con fluorocromo en contraste con un estándar de peso molecular con fragmentos marcados de tamaño conocido (Liz®600). Los resultados fueron almacenados en archivos digitales como electroferogramas, gráficos que registran la intensidad de la señal fluorescente para cada alelo, y la estimación de su tamaño en pares de base.

Los electroferogramas fueron analizados en el programa GeneMarker V1.71 (SoftGenetics LLC). El registro del tamaño de los alelos se llevó a cabo por 4 observadores de forma independiente, y al final se compararon los resultados de los registros para evaluar la consistencia en la lectura de los alelos. Las muestras donde se detectaron ambigüedades se volvieron a amplificar y analizar para confirmar la asignación correcta de los alelos.

El registro de los alelos se llevó a cabo a partir de la lectura de las señales de los electroferogramas, donde cada señal por arriba del umbral de detección seleccionado representa un alelo. Cuando sólo hay una señal, el individuo es homocigoto para el locus ya que ambos alelos son del mismo tamaño y por lo tanto traslapan y emiten solo una señal. Por otro lado, cuando hay dos señales el individuo es heterocigoto

para el locus, donde los dos alelos son distintos y emiten señales independientes y de diferente tamaño. Los alelos de cada locus definen un genotipo, pero al combinar el conjunto de genotipos de cada locus de cada individuo se genera un genotipo multilocus.

6.3. Análisis estadístico y control de calidad de la genotipificación.

Para determinar la calidad de los resultados se llevó a cabo una fase de control para seleccionar el conjunto de microsatélites más informativos. Para ello, los genotipos multilocus fueron analizados con los programas MICRO-CHECKER V2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004), MSTOOLS V3.1.1 (Park, 2002) y GIMLET V1.3.3 (Valière, 2002).

Por un lado, el programa MICRO-CHECKER fue utilizado para identificar errores en la genotipificación calculando el número de homocigotos y heterocigotos esperados, alelos que no amplificaron (alelos nulos), amplificación diferencial de los alelos (allelic dropout), tartamudeo de polimerasa (stutter peaks), o errores tipográficos.

El programa MSTOOLS fue utilizado para detectar la presencia de genotipos incompletos, alelos raros y genotipos idénticos o casi idénticos, que pudieran presentar problemas en la calidad y reproducibilidad de la genotipificación. El programa calcula la heterocigosidad observada (H_0) y la esperada (H_e) a partir de las condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg para cada microsatélite, utilizando las frecuencias alélicas. Cuando existe una diferencia significativa entre H_0 y H_e , esto puede representar un error en la genotipificación ya sea por la presencia de alelos nulos o por una subdivisión poblacional (efecto Wahlund). Por lo tanto, estos resultados tienen

que ser tomados en cuenta para corregir o eliminar los loci problemáticos, para que los resultados de paternidad no se encuentren sesgados. También se calculó la frecuencia alélica, los alelos por microsatélite, y el índice de contenido polimórfico (PIC). El PIC evalúa la información del marcador en la población basándose en las frecuencias de los alelos y oscila entre el 1 y 0, al igual que el equilibrio de Hardy-Weinberg. Si el valor es $PIC > 0.5$ el locus es altamente informativo (mejor entre más cercano al 1), si el valor es $0.5 > PIC > 0.25$, el locus es informativo regularmente, y si el valor es $PIC < 0.25$, es poco informativo (Botstein *et al.*, 1980).

Por último, se procedió a calcular la probabilidad de identidad con el programa GIMLET, que representa el índice empleado con mayor frecuencia para cuantificar el poder informativo de cada locus microsatélite para discriminar genotipos individuales. Este índice refleja la probabilidad de que dos individuos, en función de su nivel de parentesco, exhiban exactamente el mismo genotipo.

6.4. Estimación de paternidad múltiple

Para determinar si las camadas de tiburón azul presentan paternidad múltiple se comparó el genotipo de la madre y de su camada. Cada cría tiene dos alelos por locus, donde un alelo pertenece a su madre y el otro a su padre. Al conocer el genotipo de la madre, se puede deducir el posible genotipo del padre, y así determinar si en una camada participaron dos o más padres en función del número de alelos no maternos encontrados en la progenie.

Para obtener una estimación inicial del número mínimo de padres por camada, se identificaron cuales alelos por locus en los embriones pertenecían a la madre, y cuales

al padre. Cuando una camada tenía tres o más alelos paternos en un locus se consideraba que había presencia de paternidad múltiple.

Para evaluar la participación de múltiples padres en la producción de la progenie en las camadas muestreadas se empleó el programa GERUD2.0 (Jones 2005), diseñado para analizar matrices de genotipos multilocus de progenie producida por un individuo (madre soltera o padre soltero), aun cuando se desconozca el genotipo del progenitor. Mediante una búsqueda exhaustiva, este programa produce un conjunto mínimo de padres necesarios para explicar la matriz de genotipos multilocus observados en la progenie. Esta búsqueda a menudo producirá múltiples soluciones del número mínimo de padres consistentes con la matriz de progenie analizada. GERUD calcula las probabilidades relativas para cada solución y elige la solución con la probabilidad más alta. Este enfoque utiliza una combinación de información de patrones de segregación mendeliana y frecuencias genotípicas en la población.

También se utilizó el programa GIMLET V1.3.3 (Valière, 2002) para la asignación parental. El programa compara el genotipo de cada individuo de la progenie con el genotipo de la madre y de los posibles padres (machos genotipificados). Si los individuos de la camada compartieron 50% de los alelos con uno o más de los adultos (machos y hembras) de la muestra, el programa los asigna como progenie putativa de éstos.

7. Resultados

7.1. Genotipificación

Del total de los microsatélites, dos fueron descartados debido a que hubo problemas de reproducibilidad en su amplificación (TA1 y TA6; Tabla I). Con los 5 microsatélites restantes se llevaron a cabo una serie de pruebas para optimizar la amplificación múltiple (PCR multiplexing). Se generaron dos conjuntos de microsatélites con base en el número de alelos reportados y los niveles de polimorfismo de cada locus: “Conjunto A” (TA2, TA3 y TA7) con un potencial de generar 319,410 genotipos y “Conjunto B” (TA4 y TA5) con el potencial de generar 25,840 genotipos (Tabla II).

Los dos conjuntos de microsatélites generaron una buena amplificación y una lectura clara cuando se emplearon para genotipificar a una hembra y toda su progenie (H01 y 17 embriones). A partir de las pruebas realizadas y del potencial informativo en función al número de genotipos reportados en Taguchi y colaboradores (2013) se decidió seleccionar el triplete del “Conjunto A” para genotipificar el resto de las muestras.

Tabla II. Conjuntos de microsatélites obtenidos de Taguchi y colaboradores (2013) utilizados para la amplificación de PCR.

Conjuntos	Etiqueta de microsatélite	Locus	Intervalo de tamaño (pb)	
			Taguchi y colaboradores (2013)	Este trabajo de tesis
“Conjunto A”	TA2	DZOXN	366–397	379-397
	TA3	BEF94	104–126	114-134
	TA7	D1Q4A	168–300	278-306
“Conjunto B”	TA4	CY92Z	151–193	185-201
	TA5	A2ASY	166–298	282-292

Las diferencias en los tamaños de los alelos reportados en la literatura y los del presente estudio se deben al uso de una marca universal distinta.

Del total de las muestras recolectadas, se genotipificaron 12 hembras y 246 embriones, lo que representa aproximadamente un 70% del total de la progenie para el conjunto de hembras analizadas (Tabla III). Adicionalmente se incluyeron las muestras de 22 machos adultos (Anexos 2) para obtener una estimación no sesgada del polimorfismo y poder informativo del “Conjunto A” de los microsatélites.

La hembra más grande (H07) analizada tuvo una longitud total (LT) de 271 cm y 33 crías, de las cuales se analizaron 10; la hembra más pequeña (H09) midió 196 cm LT con 21 crías, de las cuales se examinaron 10. La hembra (H11) que presentó el mayor número de crías (51) midió 215 cm LT. El tamaño de la camada varió entre 17 y 51 crías.

Tabla III. Número de embriones genotipificados para cada una de las hembras grávidas. Se indica la longitud total (LT) en cm de la madre, el número de embriones y el número de éstos que fueron genotipificados.

Madre	LT	Embriones	Embriones genotipificados
H01	209	17	17
H02	224	29	28
H03	224	29	29
H04	258	30	30
H05	216	34	28
H06	219	38	16
H07	271	33	10
H08	220	17	10
H09	196	29	10
H10	221	22	22
H11	215	51	24
H12	212	23	22
Total		352	246

7.1.1. Equilibrio de Hardy-Weinberg y probabilidad de identidad

El poder de la información alélica de los microsatélites se midió a partir de la probabilidad de identidad para distinguir los genotipos individuales. Para los 5 microsatélites empleados en la hembra H01 y su progenie, el número total de alelos observados fue de 22 (promedio de 4.4 alelos por *locus*) y una heterocigosidad promedio de 0.76 (Tabla IV). La probabilidad de que dos individuos sin parentesco tengan el mismo genotipo es de 1 en cada 9,823 ($1.018e^{-04}$), y 1 en cada 36 en individuos emparentados ($2.773e^{-04}$).

Tabla IV. Índice de diversidad genética y probabilidad de identidad de los 5 microsatélites empleados en la H01. Se indica el número de alelos (Na), la heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He), la probabilidad de identidad para individuos sin parentesco ($PI_{\text{sin parentesco}}$) y hermanos (PI_{hermanos}). El asterisco (*) marca los microsatélites que fueron seleccionados para evaluar la paternidad múltiple en las camadas de tiburón azul.

Microsatélite	Na	Ho	He	PI sin parentesco	PI hermanos
TA2*	5	1.00	0.75	8.219e-02	4.038e-01
TA3*	4	0.72	0.65	1.488e-01	4.691e-01
TA4	5	0.61	0.5	2.444e-01	5.735e-01
TA5	5	0.83	0.67	1.286e-01	4.542e-01
TA7*	3	0.61	0.53	2.646e-01	5.621e-01
Todos	22	0.76	0.62	1.018e-04	2.773e-02

Sin embargo, cuando se empleó el “Conjunto A” para las muestras analizadas de hembras grávidas y machos adultos, el total de alelos y la heterocigosidad observada promedio fue de 24 (promedio de 8 alelos por *locus*) y 0.73, respectivamente (Tabla V). La probabilidad de identidad se estimó de 1 en cada 6,124 individuos sin parentesco ($1.633e^{-04}$) y de 1 en cada 20 hermanos ($5.087e^{-02}$). Los tres marcadores se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg. El microsatélite TA2 fue el que tuvo mayor poder informativo en el caso de ambos conjuntos (H01 y progenie; hembras y machos adultos).

Tabla V. Índice de diversidad genética y probabilidad de identidad del “Conjunto A” de 3 microsatélites seleccionados para la genotipificación multilocus de los especímenes de tiburón azul. Se indica el número de alelos (Na), la heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He), el índice de contenido polimórfico (PIC), y la probabilidad de identidad para individuos sin parentesco ($PI_{\text{sin parentesco}}$) y hermanos (PI_{hermanos}).

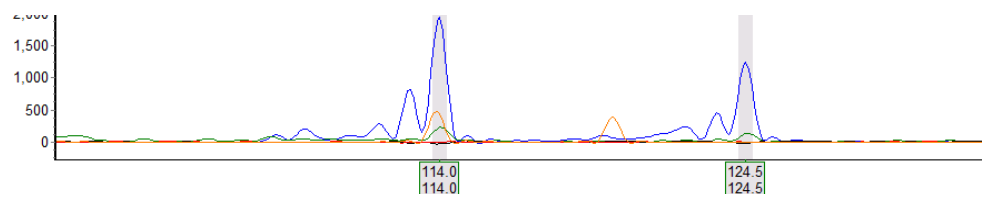
Microsatélite	Na	Ho	He	PIC	$PI_{\text{sin parentesco}}$	PI_{hermanos}
TA2	10	0.62	0.84	0.82	3.153e-02	3.406e-01
TA3	8	0.68	0.75	0.71	8.190e-02	3.983e-01
TA7	6	0.88	0.79	0.75	6.326e-02	3.751e-01
Todos	24	0.73	0.79		1.633e-04	5.087e-02

De acuerdo a los resultados de MicroChecker dentro del “Conjunto A” de microsatélites para los adultos, únicamente el microsatélite TA2 presentó evidencias de exceso de homocigosidad debido a la posible presencia de alelos nulos. El resto de los microsatélites, incluyendo los del “Conjunto B”, no presentaron evidencias de exceso de homocigosidad.

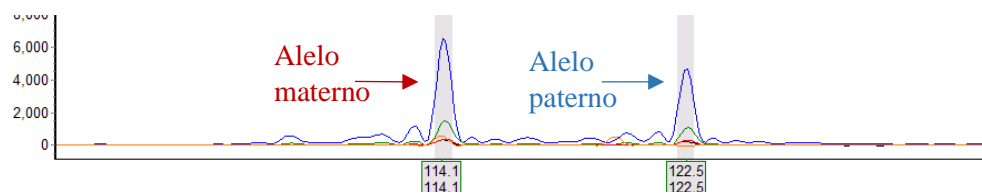
7.2. Estimación de paternidad múltiple

A partir del conjunto de microsatélites seleccionados (“Conjunto A”) se pudo identificar la ocurrencia de paternidad múltiple en las camadas. Gracias a la genotipificación de la madre y sus embriones, el número mínimo de padres pudo ser inferido con los alelos no maternos detectados en los embriones (Figura 2). La presencia de más de dos alelos paternos indica que en la formación de la camada participaron al menos dos machos.

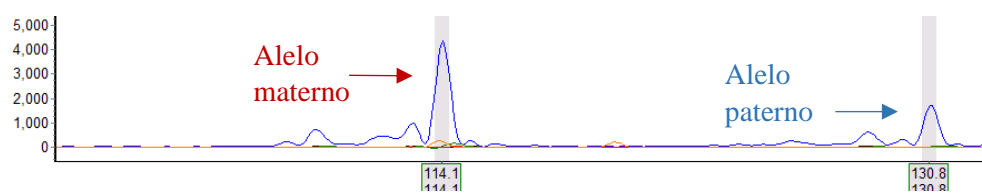
Genotipo de la madre H06



Genotipo del embrión # 2



Genotipo del embrión # 3



Genotipo del embrión # 6



Figura 2. Ejemplo de las lecturas de los genotipos de la hembra H06 y tres embriones de su camada para el microsatélite TA3. Se indican los alelos paternos (en color azul) y maternos (en color rojo).

La figura 2 muestra la presencia de al menos tres alelos paternos (122, 130, 124) para el microsatélite TA3. Si bien uno de los alelos paternos se comparte con el genotipo de la madre, ya que el embrión #6 es homocigoto (124/124), puede evidenciarse la presencia de paternidad múltiple en la camada.

Todos los embriones de cada una de las camadas compartían al menos un alelo por locus con su madre, por lo que se asignó el otro alelo al posible padre. A partir de esta premisa,

el programa GERUD 2.0 genera el genotipo multilocus más probable para el conjunto de padres que explicarían los genotipos observados en los embriones (Tabla VI).

Tabla VI. Genotipo estimado del padre y de la madre en los 3 microsatélites. Se indica el número de padres por progenie y la probabilidad de su genotipo (* Genotipo paterno único posible).

Progenitores	Alelos en microsatélites						Progenie	Probabilidad
	TA3		TA7		TA2			
H1	122	124	290	294	383	385		
P1	126	122	290	290	387	395	14	8.57E-06
P2	126	128	298	298	387	381	3	8.57E-06
H2	124	124	290	298	387	391		
P1	126	128	298	294	391	391	6	4.01E-08
P2	126	128	298	282	389	395	3	4.01E-08
P3	116	124	286	294	387	389	19	4.01E-08
H3	122	124	290	294	387	389		
P1	122	122	290	298	387	387	12	1.42E-08
P2	122	122	290	298	389	383	14	1.42E-08
P3	122	114	286	290	387	389	24	1.42E-08
H4	122	126	286	290	381	393		
P1	128	124	286	302	389	383	20	*
P2	124	118	290	282	395	379	10	*
H5	124	130	282	306	381	381		
P1	126	122	282	298	389	389	20	*
P2	126	134	282	302	389	381	16	*
H6	114	124	290	306	383	393		
P1	122	130	290	282	391	387	8	4.129E-07
P2	122	124	278	286	393	393	2	4.129E-07
P3	122	124	282	298	389	389	3	4.129E-07
P4	126	114	290	290	391	391	3	4.129E-07
H7	114	122	290	298	389	389		
P1	122	122	286	286	395	395	1	0.003056
P2	128	128	282	298	391	389	9	0.003056
H8	124	128	290	298	383	383		
P1	124	124	282	290	381	389	10	*
H9	126	126	282	286	387	389		
P1	116	122	286	286	387	385	10	0.001455
H10	124	124	286	290	385	389		
P1	124	124	290	290	383	381	8	7.50E-06
P2	124	126	282	290	395	383	21	7.50E-06
H11	124	126	282	286	389	391		
P1	124	128	290	286	387	389	19	*
P2	126	122	294	282	387	389	5	*
H12	122	126	282	290	385	391		
P1	126	126	286	290	383	381	18	2.83E-06
P2	124	124	286	290	383	387	4	2.83E-06

De las 12 camadas analizadas con tres microsatélites, 10 (83%) presentaron evidencia que la camada fue fertilizada por más de un macho. El intervalo del número mínimo de padres encontrados fue entre 2 y 4 (Figura 3), con un promedio de 2.4 padres por camada con paternidad múltiple. En el otro 17% de las camadas no se encontró paternidad múltiple, sin embargo, esto se podría deber a la falta de muestras ya que las hembras H08 y H09 fueron las que tuvieron el menor número de embriones genotipificados (10 embriones).

Para la mayoría de las camadas el éxito reproductivo de los padres se encontraba sesgado, ya que los padres que participaron en las camadas no contribuyeron con el mismo número de embriones. De las 10 camadas con paternidad múltiple, por lo menos en 7, un padre contribuyó a más del 60% de la progenie. No se encontró una correlación entre el número de padres que participaron en una camada y la longitud total de la hembra grávida.

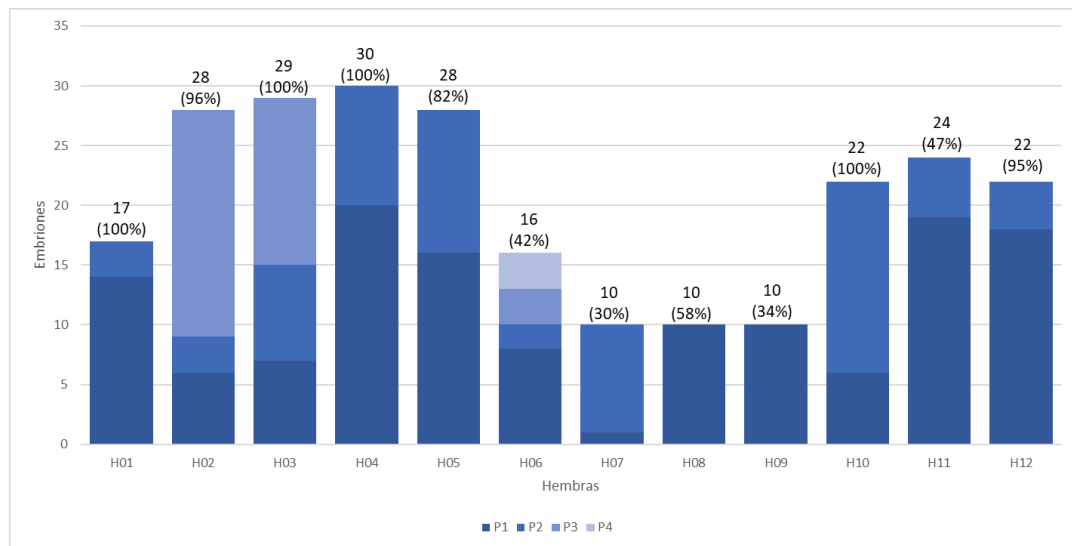


Figura 3. Número de padres estimados por camada. El número arriba de las barras indica al número de embriones genotipificados y el porcentaje que representa del total de embriones de la camada.

8. Discusión

8.1. Aspectos metodológicos

8.1.1. Microsatélites

A partir de la selección de los marcadores microsatélites específicos desarrollados para *Prionace glauca*, se pudo seleccionar dos sets con la mejor amplificación reproducible. Taguchi y colaboradores (2013) reportan que estos microsatélites son altamente polimórficos, lo cual coincide con los resultados obtenidos en este trabajo.

A partir del “Conjunto A” de microsatélites se pudo inferir el número mínimo posible de padres en las camadas muestreadas de tiburón azul, el cual fue seleccionado basándose tanto en el polimorfismo reportado en la literatura, como en la practicidad y la reducción de costos al optimizar la amplificación conjunta de los tres microsatélites. No obstante, a partir de una serie de pruebas con el “Conjunto B” de microsatélites en la hembra H01 se llegó a la conclusión que ese conjunto de microsatélites resultó más informativo para la asignación parental, ayudando a identificar un mayor número de padres participantes en la camada. Al determinar el número mínimo de padres con GERUD2.0 utilizando exclusivamente los microsatélites del “Conjunto B” el número mínimo fue de tres padres, contrario al resultado del “Conjunto A” (dos padres). Esto indica que, a pesar de que el conjunto de microsatélites seleccionados fue suficiente para identificar la presencia de paternidad múltiple, el uso de un conjunto ampliado de marcadores permitiría establecer con mayor exactitud y precisión el número total de padres que participan en una camada.

A partir de los análisis en MicroChecker, el microsatélite TA2 presentó un exceso de homocigotos, posiblemente por la presencia de alelos nulos. Sin embargo, no se

presentaron problemas en la asignación parental de ninguno de los embriones, por lo que es probable que la señal de exceso de homocigotos se deba al reducido número de muestras analizadas y al nivel de polimorfismo de los marcadores empleados.

Los alelos nulos son aquellos alelos no funcionales que no son expresados o bien, en este caso, que no generan un producto de amplificación (Griffiths, *et. al*, 2005). Para el caso de los microsatélites, la presencia de alelos nulos puede hacer parecer que un genotipo es homocigoto cuando verdaderamente es heterocigoto. Existen tres principales razones por las cuales se generan los alelos nulos: a) alguno de los cebadores no se puede unir debido a una mutación en la secuencia complementaria, b) se amplifican preferencialmente los alelos de menor tamaño ya que se sintetizan a mayor velocidad, c) por la inconsistencia en la amplificación a causa de una calidad baja del ADN (Dakin y Avise, 2004).

Estas razones se pueden descartar ya que la evaluación de la calidad del ADN a través de la electroforesis evidenció la presencia de ADN de alto peso molecular y muy poca degradación, además de que no se presentaron inconsistencias en la amplificación de las réplicas o muestras con problemas de amplificación (homocigotos nulos). Sin embargo, aunque MSTOOLS y GIMLET sugieren que algunos loci mostraban evidencia de exceso de homocigotos, sus diferencias con respecto a lo esperado bajo el equilibrio HWE no resultaron significativas.

8.1.2. Número de embriones analizado por hembra

A pesar de que el tamaño de la muestra de embriones analizados por camada fue suficiente para detectar la paternidad múltiple en el tiburón azul y concluir que ésta se presenta en al menos el 80% de las hembras de la región, las dos hembras para las que no se encontró

evidencia de paternidad múltiple, el número de crías analizadas fue el menor (n=10). Por ende, es posible que las hembras H08 y H09 hubieran sido fertilizadas por más de un macho, pero el número de muestras no fue suficiente para detectarlo. Por otro lado, en la hembra H07 si se detectó la paternidad múltiple a pesar de que también se muestrearon a 10 crías.

Neff y Pitcher (2002), Griffiths y colaboradores (2012), y Lyons y colaboradores (2017) encontraron que la probabilidad de detectar paternidad múltiple en hembras poliándricas aumenta con un mayor número de muestras por camada. Esto indica que, si se muestrea el número total de crías en las camadas analizadas, la probabilidad de encontrar el número de machos que fecundaron a las hembras sería mayor. Encontrar una hembra con todas sus crías no siempre es fácil. Al igual que en otras especies de tiburón, el aborto inducido es un aspecto común en el tiburón azul. Las hembras preñadas pueden expulsar o “abortar” a sus crías a causa del estrés durante la captura, y por ende la fecundidad puede ser mayor a la reportada (Cruz-Ramírez *et al.*, 2012; Fujinami *et al.*, 2017). En varias ocasiones esto se puede cuantificar a partir del conteo de placentas sueltas en los úteros ya que las crías abortadas por lo general son expulsadas sin la placenta, aunque no siempre es el caso. De las hembras analizadas en 7 de 12 se encontraron placentas sueltas, lo que indica que el número total reportado de embriones por camada podría estar sesgado (Anexo 1).

8.2. Paternidad múltiple en el tiburón azul

A pesar de que el tiburón azul es una especie de gran importancia comercial en México (Godínez-Padilla *et al.*, 2016) y en otras regiones del mundo (Compagno, 1984), nunca se había reportado la paternidad múltiple en esta especie. El presente trabajo representa el

primer reporte que aporta evidencia científica de la ocurrencia de paternidad múltiple en el tiburón azul, con una frecuencia aparentemente alta.

Aunque no se encontró una aparente correlación entre el tamaño de la hembra y el número de padres participantes en la camada o el número de embriones, el reducido tamaño de muestra no permite profundizar sobre este aspecto. Para poder establecer si las hembras muestran o no un patrón de apareamiento asociado con su talla o edad en función de su experiencia, se requiere de un mayor muestreo estructurado por tallas, así como de una mayor cobertura espacial y temporal de las zonas de reproducción. Los apareamientos múltiples aseguran la reproducción en esta especie epipelágica, contribuyendo a la nueva población con nuevos reclutas.

La paternidad múltiple puede ser alta cuando las poblaciones son grandes con una alta probabilidad de encuentro con machos (Daly-Engel *et al.*, 2007). Además, la frecuencia de paternidad múltiple podría estar regida por las proporciones de machos y hembras durante los encuentros, al igual que las condiciones ecológicas. Si los encuentros donde el número de machos es superior al de hembras, los machos podrían cooperar entre ellos para inducir a las hembras para aparearse (Feldheim *et al.*, 2001; Daly-Engel *et al.*, 2010).

La cópula entre tiburones suele ser muy agresiva, creando un gran desgaste físico para las hembras debido a las heridas externas e internas generadas durante el apareamiento. Aunque estas heridas rara vez son mortales, pueden dejar a la hembra vulnerable (Pratt y Carrier, 2001; Daly-Engel *et al.*, 2010). Se ha planteado que el desgaste energético de evasión por parte de la hembra es mayor al desgaste físico ocasionado por la cópula con múltiples parejas (poliandria por conveniencia) (Griffiths *et al.*, 2012; Pirog *et al.*, 2015).

Esto puede ser una gran ventaja para los machos ya que su éxito reproductivo aumenta en proporción directa al número de hembras que fecunda (Daly-Engel *et al.*, 2010).

Crear que los machos son los únicos que reciben beneficios con los múltiples apareamientos parece poco probable si se toma en cuenta la energía que las hembras invierten en la producción de embriones. El hecho de que la hembra de tiburón azul tenga la capacidad de almacenar espermatozoides en sus glándulas oviducuales (Pratt, 1979), permite que las hembras tengan un mayor potencial para concretar no solo la fecundación, sino la posibilidad de hacerlo con el esperma de “mejor calidad” al contar con una reserva de material genético de diferentes machos (selección de esperma post-copulatoria) (Zeh y Zeh, 2001, Chapman *et al.*, 2004; Castillo-Páez, 2017; Lyons *et al.*, 2017). Como consecuencia la progenie tendría una mayor variabilidad genética, aumentando la tasa de supervivencia al compensar la inestabilidad ambiental con una mayor cantidad y diversidad de genotipos, así como con un potencial aumento en su plasticidad fenotípica (Yasui 1998; Zeh y Zeh, 2001). Esta selección podría derivar en una descendencia masculina que ha heredado ese potencial de producir esperma o eyaculaciones competitivamente superior, aumentando su éxito reproductivo (Keller y Reeve, 1995; Zeh y Zeh, 2001). Por otro lado, la paternidad múltiple amortigua de manera importante la reducción del tamaño efectivo de la población por efecto de la deriva génica (Pearse y Anderson, 2009).

Para la mayoría de las camadas analizadas el éxito reproductivo de los padres estaba sesgado hacia uno de ellos; más del 60% de las crías de una camada correspondieron a uno sólo padre. En varias especies donde la hembra tiene la capacidad de almacenar

esperma, los procesos post-copulatorios, como una fuerte competencia espermática, la selección críptica por parte de la hembra, o simplemente la cronología de la cópula, podrían ser los responsables de una paternidad sesgada (Marino *et al.*, 2015). Esto podría llevar a la coevolución entre la calidad y competencia entre espermias, y la complejidad morfológica de los órganos reproductores de la hembra (Keller y Reeve, 1995; Fitzpatrick *et al.*, 2012). Existe evidencia, por ejemplo, de que las especies de elasmobranquios con altos índices de paternidad múltiple invierten más energía en la construcción del tejido testicular, posiblemente porque la competencia espermática es mayor (Fitzpatrick *et al.*, 2012).

La paternidad múltiple es una característica reproductiva común en los elasmobranquios (Portnoy y Heist, 2012; Holmes *et al.*, 2018), y ha sido reportada en especies con reproducción vivípara y ovovivípara. Dentro de los estudios realizados, incluyendo tiburones y rayas, la mayoría están enfocados en las especies pertenecientes a la familia Carcharhinidae. En comparación con otros 21 estudios enfocados en la paternidad múltiple en los elasmobranquios, el porcentaje de camadas con paternidad múltiple estimado en este estudio para el tiburón azul se encuentra entre los valores más altos (Tabla VII). De las 24 especies de elasmobranquios reportadas en la literatura, 21 presentaron paternidad múltiple. El número de padres involucrados en la producción de la progenie con múltiples padres que se observó para el tiburón azul, resulta similar al reportado en otras especies de tiburón (1-4 padres), dónde el máximo encontrado fue de 4-6 padres por camada.

Dentro de las especies de la familia Carcharhinidae, incluyendo al tiburón azul, el promedio de padres por camada de 11 estudios fue de 1.8, lo que indica que por lo general las hembras son fecundadas por dos machos. Esto refleja que la paternidad múltiple es común en los individuos de la familia Carcharhinidae, sin embargo, existen especies que no lo presentan. En los estudios analizados para el tiburón de Galápagos (*Carcharhinus galapagensis*) (Daly-Engel *et al.*, 2006) y el tiburón tigre (*Galeocerdo cuvier*) (Holmes *et al.*, 2018) no se encontraron camadas con más de un padre, lo cual se puede deber al número de muestras. Como se mencionó anteriormente, a mayor número de hembras y de embriones analizados, se incrementa la probabilidad de detección de paternidad múltiple. Basándose en los datos de los 21 artículos revisados, en promedio se utilizaron 7.3 microsatélites, sin embargo, el número de microsatélites no tiene que ser tan grande para encontrar paternidad múltiple en los elasmobranquios, ya que esto va a depender de su polimorfismo. Por ejemplo, el estudio del tiburón toro (*Carcharhinus leucas*) utilizó 21 microsatélites, y a pesar del gran número de marcadores sólo encontraron un máximo de dos padres. Por otro lado, el estudio de la raja común (*Raja clavata*) utilizó únicamente 5 microsatélites, y con ellos identificaron hasta 6 padres en una camada.

8.3. Implicaciones en la conservación de las especies de elasmobranquios

Las especies de elasmobranquios son altamente vulnerables a la perturbación y tienen una baja resiliencia a la explotación debido a su historia de vida (Smith *et al.*, 1998; Daly-Engel *et al.*, 2006). La mayoría de los condriictios son de selección-K con un crecimiento lento, maduración tardía, baja fecundidad, y periodos de gestación largos, por mencionar algunos (Chapman *et al.*, 2004; Cailliet *et al.*, 2005; Holmes *et al.*, 2018). Su historia de

vida combinada con la tendencia a agruparse de acuerdo a su edad, sexo y maduración reproductiva, limitan a estas especies para mantenerse y recuperarse de las disminuciones poblacionales debido a la actividad humana (Cailliet *et al.*, 2005).

Debido a su versatilidad en productos, las pesquerías han explotado a las poblaciones de rayas y tiburones en las últimas décadas. Las capturas reportadas de elasmobranchios, a partir de 1985, han incrementado anualmente un 2% y en el 2000 se reportó una captura anual de 828,364 toneladas, lo que representa aproximadamente 41 millones de individuos (FAO, 2002). Sin embargo, las capturas por lo general son mayores a lo reportado debido a la falta de captura de datos o al registro erróneo (Clarke *et al.*, 2005).

Tabla VII. Reportes sobre los análisis de paternidad múltiple y sus sistemas de apareamiento en los elasmobranchios.

Familia	Especie	Artículo	microsatélites	No. camadas analizadas	No. promedio crías por camada	No. progenie analizada	paternidad			% camadas con PM
							promedio	min	max	
Carcharhinidae	<i>Priorace glauca</i>	tesis	3	12	20.5	246	2.4	1	4	83
Carcharhinidae	<i>Carcharhinus plumbeus</i>			1	NA	7	2	NA	NA	NA
Carcharhinidae	<i>Carcharhinus altimus</i>	Daly-Engel et al. (2006)	8	1	NA	9	2	NA	NA	NA
Carcharhinidae	<i>Carcharhinus galapagensis</i>			1	NA	7	1	NA	NA	NA
Carcharhinidae	<i>Carcharhinus plumbeus</i>	Daly-Engel et al. (2007)	6	20	5.5	110	1.4	1	2	40
Carcharhinidae	<i>Negaprion brevirostris</i>	Feldheim et al. (2001)	3	1	NA	11	3	NA	NA	NA
Carcharhinidae	<i>Galeocerdo cuvier</i>	Holmes et al. (2018)	9	4	28	112	1	NA	NA	0
Carcharhinidae	<i>Carcharhinus leucas</i>	Piróg et al. (2015)	21	4	8.2	33	1.5	1	2	50
Carcharhinidae	<i>Carcharhinus plumbeus</i>	Portnoy et al. (2007)	5	20	9.4	187	2.3	1	4	85
Carcharhinidae	<i>Negaprion brevirostris</i>	Feldheim et al. (2004)	9	97	6.7	707	2	1	4	87
Carcharhinidae	<i>Negaprion brevirostris</i>	DIBattista et al. (2008)	11	85	4.3	408	2	1	4	81
Ginglymostomatidae	<i>Ginglymostoma cirratum</i>	Saville et al. (2002)	1	1	NA	32	4	NA	NA	NA
Rajidae	<i>Raja clavata</i>	Chevolat et al. (2007)	5	4	43.2	173	4.5	4	6	100
Rhinobatidae	<i>Zapteryx exasperata</i>	Castillo-Páez (2017)	7	12	8.2	78	1.5	1	3	41.6
Rhincodontidae	<i>Rhincodon typus</i>	Schmidt et al. (2010)	9	1	NA	29	1	NA	NA	NA
Scyliorhinidae	<i>Scyliorhinus canicula</i>	Griffiths et al. (2012)	12	13	NA	150	2.3	1	3	92
Squalidae	<i>Squalus mitsukurini</i>	Daly-Engel et al. (2010)	8	27	6.6	178	1.1	1	2	11
Squalidae	<i>Squalus acanthias</i>	Lage et al. (2008)	7	10	NA	50	1.3	1	2	30
Squalidae	<i>Squalus acanthias</i>	Verissimo et al. (2011)	7	29	NA	NA	NA	1	2	17
Sphyrnidae	<i>Sphyrna tiburo</i>	Chapman et al. (2004)	4	22	8.5	188	1.2	1	3	18
Triakidae	<i>Mustelus henlei</i>	Byrne y Avise (2012)	4	14	13.2	185	2.1	1	3	93
Triakidae	<i>Mustelus punctulatus</i>	Marino et al. (2015)	9	13	23.3	303	1.5	1	3	54
Triakidae	<i>Mustelus mustelus</i>			19	10.7	204	1.5	1	3	47
Triakidae	<i>Triakis semifasciata</i>	Nosal et al. (2013)	4	22	20.4	449	1.3	1	2	36.6
Urotrygonidae	<i>Urobatis halleri</i>	Lyons et al. (2017)	5	20	4.3	86	2.1	1	3	90

La sobreexplotación conlleva a una serie de consecuencias biológicas en las poblaciones afectadas, que a su vez podría afectar las estructuras tróficas y las cadenas alimenticias, llevando a los ecosistemas marinos a un estado frágil (Rowe y Hutchings 2003). Por ejemplo, la explotación pesquera pudiera reducir la tasa de encuentro entre organismos debido a la disminución en la abundancia de la proporción de sexos en individuos maduros o al reducir el tamaño poblacional (Rowe y Hutchings, 2003; Daly-Engel *et al.*, 2006; Castillo-Páez, 2017). Como consecuencia existiría una reducción en el tamaño efectivo de la población (Chapman *et al.*, 2004).

Los sistemas de apareamiento de los elasmobranchios han recibido una gran atención en los últimos años debido a la divulgación sobre la sobreexplotación de estas especies mundialmente y la vulnerabilidad de sus poblaciones (Daly-Engel *et al.*, 2006). Esto es principalmente porque la capacidad de recuperación de una especie ante una reducción en su población está ligada a su potencial reproductivo (Holmes *et al.*, 2018). Por lo tanto, identificar las estrategias reproductivas puede ser clave para generar planes de manejo pesquero y conservación adecuados, especialmente en especies explotadas o con alta vulnerabilidad, ya que permiten conocer las consecuencias reproductivas causadas por una explotación comercial (Walker, 2005; Daly-Engel *et al.*, 2006; Castillo-Páez, 2017).

La paternidad múltiple observada en el tiburón azul podría tener implicaciones importantes para el manejo y conservación de la especie, ya que como fue mencionado anteriormente incrementa el tamaño efectivo de la población, con lo que se pueden mantener los niveles de diversidad genética y el potencial evolutivo a largo plazo, mitigando con ello el impacto de la sobreexplotación. La paternidad múltiple genera una

mayor probabilidad de que las crías tengan un mayor potencial adaptativo a los cambios ambientales (Yasui 1998). Por el contrario, en un apareamiento monógamo, una hembra se aparearía con sólo un macho, donde las crías sólo tendrían los genes de un padre y como consecuencia la diversidad genética de cada generación sería reducida, al igual que el tamaño efectivo poblacional (Chapman *et al.*, 2004).

Si la paternidad múltiple en el tiburón azul es tan frecuente como aquí se reporta, está podría amortiguar la pérdida de diversidad genética asociada a la sobreexplotación, y explicar la panmixia genética del tiburón azul a nivel mundial que se ha hipotetizado (Bailleul *et al.*, 2018). De igual forma, este sistema de apareamiento podría ser la razón de su productividad y resiliencia (Campana *et al.*, 2006; Fujinami *et al.*, 2017; Furlong-Estrada *et al.*, 2017).

A pesar de ser una de las especies de tiburón más impactadas por la pesca legal e ilegal a nivel global, las poblaciones de tiburón azul han persistido en niveles aparentemente estables. Es por ello que el estudio de las estrategias reproductivas, que moldean los niveles de diversidad genética e influyen en la capacidad de recuperación y adaptación de una especie ante los cambios ambientales y el impacto antropogénico, son factores que deben de tomarse en cuenta para los planes de manejo y conservación de las especies sujetas a explotación.

9. Conclusiones

- A partir del genotipo multilocus con tres loci microsatélites fue posible detectar la presencia de paternidad múltiple en el tiburón azul (*Prionace glauca*) de las aguas de la costa occidental de la península de Baja California, México.
- La paternidad múltiple representa una estrategia reproductiva frecuente en el tiburón azul en el Pacífico mexicano.
- Aunque el número mínimo de padres identificados por camada varía entre 2 y 4, la representación sesgada de uno de los parentales sugiere diferencias en el éxito reproductivo de los machos.

10. Recomendaciones

La información del presente trabajo de tesis aporta suficiente información para concluir que la paternidad múltiple es una estrategia reproductiva común en el tiburón azul. No obstante, no es concluyente para afirmar el número de padres participantes por camada, debido al número reducido de muestras al igual que de microsatélites. El siguiente paso sería ampliar el análisis con un mayor número de marcadores microsatélites polimórficos y, con el total de embriones por camada para estimar con precisión el número de padres que contribuyen. Asimismo, sería conveniente analizar distintas regiones y temporadas para identificar si la frecuencia de paternidad múltiple cambia de acuerdo al tamaño de las agregaciones o a la proporción de sexos.

11. Referencias

- Adams, E. M., Jones, A. G., Arnold, S. J. 2005. Multiple paternity in a natural population of a salamander with long-term sperm storage. *Molecular Ecology* 14: 1803–1810. (doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02539.x)
- Aljanabi, S. M., Martínez, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high-quality genomic DNA for PCR-base techniques. *Nucleic Acid Research*, 25: 4692-4693
- Ashby, B., Gupta, S. 2013. Sexually transmitted infections in polygamous mating systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368: 20120048. (doi: 10.1098/rstb.2012.0048)
- Bailleul, D., Mackenzie, A., Sacchi, O., Poisson, F., Bierne, N., Arnaud-Haond. 2018. Large-scale genetic panmixia in the blue shark (*Prionace glauca*): A single world-wide population, or a genetic lag-time effect of the “grey zone” of differentiation? *Evolutionary Applications* 11: 614-630. (DOI: 10.1111/eva.12591)
- Blanco-Parra, M. P., Márquez-Farías, F., Galván-Magaña, F. 2008. Age and growth of the blue shark (*Prionace glauca*) Linnaeus, 1758, in the northwest coast off Mexico. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 43(3): 513-520 (<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572008000300010>)
- Bretman, A., Tregenza, T. 2005. Measuring polyandry in wild populations: a case study using promiscuous crickets. *Molecular Ecology* 14: 2169–2179 (<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02556.x>)
- Birkhead, T. R., Møller, A. P., Sutherland, W. J. 1993. Why do females make it so difficult for males to fertilize their eggs? *Journal of Theoretical Biology* 161: 51–60. (<https://doi.org/10.1006/jtbi.1993.1039>)
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., Davis, R. W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32: 314-331

- Byrne, R. J., Avise, J. C. 2012. Genetic mating system of the brown smoothhound shark (*Mustelus henlei*), including a literature review of multiple paternity in other elasmobranch species. *Marine Biology* 159: 749-756 (DOI 10.1007/s00227-011-1851-z)
- Cailliet, G. M. Musick, J. A., Simpfendorfer, C. A., Stevens, J. D. 2005. Ecology and life characteristics of Chondrichthyan fish. En Flower, S. L., Cavanagh, R. D., Camhi, M., Burgess, G. H., Cailliet, G. M., Fordham, S. V., Simpfendorfer, C. A., Musick, J. A. (Eds.) *Sharks, Rays and Chimaeras: The Status of the Chondrichthyan Fishes*. IUCN/SSC Shark Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- Camhi, M. D. 2008. Conservation status of pelagic elasmobranchs. En: Camhi, M. D., Pikitch, E. K., Babcock, E. A. (Eds.) *Sharks of the Open Ocean: Biology, Fisheries and Conservation*. Blackwell Scientific. Oxfordm U. K.
- Camhi, M. D., Lauck, E., Pilitch, E. K., Babcock, E. A. 2008. A global overview of commercial fisheries for open ocean sharks. En Camhi, M. D., Pikitch, E. K., Babcock E. A. (Eds.) *Sharks of the Open Ocean: Biology, Fisheries and Conservation*. Blackwell Scientific. Oxford, U. K.
- Campana, S. E., Marks, L., Joyce, W., Kohler, N. E. 2006. Effects of recreational and commercial fishing on blue sharks (*Prionace glauca*) in Atlantic Canada, with inferences on the North Atlantic population. *The Canadian Journal of Fishes and Aquatic Sciences* 63: 670-682
- Carrera-Fernández, M., Galván-Magaña, F., Ceballos-Vázquez, B. P. 2010. Reproductive biology of the blue shark *Prionace glauca* (Chondrichthyes: Carcharhinidae) off Baja California Sur, Mexico. *Aqua, International Journal of Ichthyology* 16 (3): 101-110
- Carrier J. C., Pratt H. L., Castro J. I. 2004. Reproductive biology of elasmobranchs. In: Carrier J. C., Musick J. A., Heithaus M. R. (Eds.). *Biology of sharks and their relatives*. Boca Raton, Florida: C. R. C. Press. p. 269–286.

- Carrier J. C., Pratt H. L. J., Martin L. K. 1994. Group reproductive behaviors in free-living nurse sharks, *Ginglymostoma cirratum*. *Copeia* 1994(3): 646–656 (DOI: 10.2307/1447180)
- Castillo-Páez, A. Y. 2017. Influencia del comportamiento reproductivo en la distribución de la variabilidad genética en la guitarra rayada, *Zapteryx exasperate* en el Pacífico mexicano. (Tesis de doctorado). CICESE, Ensenada, B. C.
- Castro, J. I. 2000. The biology of the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*, off the Florida east coast and the Bahama Islands. *Environmental Biology of Fishes* 58: 1-22 (<https://doi.org/10.1023/A:1007698017645>)
- Chapman, D. D., Prodöhl, Gelsleichter, J., Manire, C. A., Shivji, M. S. 2004. Predominance of genetic monogamy by female in hammerhead shark, *Sphyrna tiburo*: implications for shark conservation. *Molecular Ecology* 13: 1965-1974. (DOI: 10.1111/j.1365-294X.2004.02178.x)
- Clarke, S., Burgess, G. H., Cavanagh, R. D., Crow, G., Fordham, S. V., McDavitt, M. T., Rose, D. A., Smith, M., Simpfendorfer, C. A. 2005. Socio-economic significance of Chondrichthyan fish. En Flower, S. L., Cavanagh, R. D., Camhi, M., Burgess, G. H., Cailliet, G. M., Fordham, S. V., Simpfendorfer, C. A., Musick, J. A. (Eds.) *Sharks, Rays and Chimaeras: The Status of the Chondrichthyan Fishes*. IUCN/SSC Shark Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- Compagno, L. J. V. 1984. *FAO Species Catalogue. Sharks of the world. An annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. Vol. 4. Part 2. Carcharhiniformes*. *FAO Fisheries Synopsis, Rome*. 125 (4): 251-655
- Conrath, C. L., Musick, J. A. 2012. Reproductive biology of elasmobranchs. En Carrier, J. C., Musick, J. A. y Heithaus, M. R. (Eds.) *Biology of sharks and their relatives* (291-306). Florida, E. U. A.: C. R. C. Press. Taylor & Francis Group

- Corrigan, C., Kacev D., Werry J. M. 2015. A case of genetic polyandry in the short fin mako *Isurus oxyrinchus*. *Journal of Fish Biology* 87: 794–798. (<https://doi.org/10.1111/jfb.12743>)
- Cruz-Ramírez, A., Soriano-Velásquez, S. R., Santana-Hernández, H., Ramírez-Santiago, C. E., Acal-Sánchez, D. E. 2012. Aspectos reproductivos del tiburón azul *Prionace glauca* capturado por la flota palangrera de mediana altura del Puerto de Manzanillo, Colima. *Ciencia Pesquera* 20 (1): 39-48
- Dakin, E. E., Avise, J. C. 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93: 504-509
- Daly-Engel, T. S., Grubbs, R. D., Feldheim, K. A., Bowen, B. W., Toonen, R. J. 2010. Is multiple mating beneficial or unavoidable? Low multiple paternity and genetic diversity in the shortspine spurdog *Squalus mitsukurii*. *Marine Ecology Progress Series* 403: 255-267. (DOI: <https://doi.org/10.3354/meps08417>)
- Daly-Engel, T. S., Grubbs, R. D., Holland, K. N., Toonen, R. J., Bowen, B. W. 2006. Assessment of multiple paternity in single litters from three species of carcharhinid sharks in Hawaii. *Environmental Biology of Fishes* 76: 419-424. (DOI 10.1007/s10641-006-9008-5)
- Daly-Engel, T. S., Grubbs, R. D., Bowen, B. W., Toonen, R. J. 2007. Frequency of multiple paternity in an unexploited tropical population of sandbar sharks (*Carcharhinus plumbeus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 64: 198-204 (doi:10.1139/F07-005)
- Dean, M. D., Ardlie, K. G., Nachman, M. W. 2006. The frequency of multiple paternity suggests that sperm competition is common in house mice (*Mus domesticus*). *Molecular Ecology* 15: 4141–4151 (doi: 10.1111/j.1365-294X.2006.03068.x)
- De la Lanza-Espino, G. J. 1991. Oceanografía de mares mexicanos. A. G. T. Editor, S. A., Cd. de México, México. 569 pp.

- DiBattista, J. D., Feldheim, K. A., Thibert-Plante, X., Gruber, S. H., Hendry, A. P. 2008. A genetic assessment of polyandry and breeding-site fidelity in lemon shark. *Molecular Ecology* 17: 3337-3351. (doi:10.1111/J.1365-294X.2008.03833.X)
- Dudgeon, C. L., Blower, D. C., Broderick, D., Giles, J. L., Holmes, B. J., Kashiwagi, T., Krück, N. C., Morgan, J. A. T., Tillett, B. J., Ovenden, J. R. 2012. A review of the application of molecular genetics for fisheries management and conservation of sharks and rays. *Journal of Fish Biology* 80: 1788-1843. (doi: 10.1111/j.1095-8649.2012.03265.x.)
- Durazo, R., Ramírez-Manguilar, A. M., Miranda, L. W., Soto-Mardones, L. A. 2010. Climatología de variables hidrográficas. En Gaxiola-Castro, G., Durazo, R. (Eds.) *Dinámica del ecosistema pelágico frente a Baja California, 1997-2007. Diez años de investigaciones mexicanas de la Corriente de California*. D. F., México. SEMARNAT/INE/CICESE/UABC
- Espinosa-Carreón, T. L., Cepeda-Morales, J., Gaxiola-Castro, G. 2007. Influencia de los procesos físicos en la producción de carbono orgánico frente a Baja California. En Hernandez de la Torre, B., Gaxiola-Castro, G. *Carbono en Ecosistemas Acuáticos de México*. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto de Ecología, Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, México.
- Espinosa, H. 2004. El Pacífico mexicano. *Ciencias* 76: 14-21.
- Evans, J. P., Magurran, A. E. 2000. Multiple benefits of multiple mating in guppies. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97: 10074-10076. (<https://doi.org/10.1073/pnas.180207297>)
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2002. FISHSTAT Plus (v. 2.30), Capture Production Database, 1970-2000, and Commodities Trade and Production Database 1976-2000.
- Feldheim, K. A., Gruber, S. H., Ashley, M. V. 2001. Multiple Paternity of a Lemon Shark Litter (Chondrichthyes: Carcharhinidae) *Copeia* 3: 781-786

- Fitzpatrick, J. L., Kempster, R. M., Daly-Engel, T. S., Collin, S. P., Evans, J. P. 2012. Assessing the potential for post-copulatory sexual selection in elasmobranchs. *Journal of Fish Biology* 80: 1141–1158. (<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2012.03256.x>)
- Fujinami, Y., Semba, Y., Okamoto, H., Ohshimo, S., Tanaka, S. 2017. Reproductive biology of the blue shark (*Prionace glauca*) in the western North Pacific Ocean. *Marine and Freshwater Research* 68: 2018-2027 (<https://doi.org/10.1071/MF16101>)
- Furlong-Estrada, E., Sosa-Nishizaki, O., García-Rodríguez, E. 2017. Caracterización de la pesquería del tiburón azul (*Prionace glauca*) en el Pacífico Norte mexicano: un antecedente histórico. *Ciencia Pesquera* 25(1): 15-25
- Godínez-Padilla, C. J., Castillo-Géniz, J. L., Ortega-Salgado, I. 2016. Diversidad y abundancia relativa de tiburones pelágicos capturados por la flota industrial palangrera de Ensenada, Baja California, México. *Ciencia Pesquera* 24: 97-111
- Griffiths, A. J. F., Wessler, S. R., Lewontin, R. C., Gelbart, W. M., Suzuki, D. T., Miller, J. H. 2005. *Introduction to Genetic Analysis*. Nueva York. W. H. Freeman and Company.
- Griffiths, A. M., Jacoby, D. M. P., Casane, D. McHuch, M., Croft, D. P., Genner, M. J., Sims, D. W. 2012. First analysis of multiple paternity in an oviparous shark, the small-spotted catshark (*Scyliorhinus canicula* L.). *Journal of Heredity* 103(2): 166-173. (<https://doi.org/10.1093/jhered/esr112>)
- Grogan, E. D., Lund, E. 2004. The origin and relationships of early chondrichthyes. En Carrier, J. C., Musick, J. A. y Heithaus, M. R. (Ed.) *Biology of sharks and their relatives* (3-31). Florida, E. U. A.: CRC Press LLC.
- Holman, L., Kokko, H. 2013. The consequences of polyandry for population viability, extinction risk and conservation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368: 201220053. (<https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0053>)

- Holmes, B. J., Pope, L. C., Williams, S. M., Tibbetts, I. R., Bennett, M. B., Ovenden, J. R. 2018. Lack of multiple paternity in the oceanodromus tiger shark (*Galeocerdo cuvier*). Royal Society Open Science 5: 171385. (<https://doi.org/10.1098/rsos.171385>)
- ISC (International Scientific Committee for Tuna and Tuna-like Species in the North Pacific Ocean). 2017. Annex 13. Stock assessment and future projections of blue shark in the North Pacific Ocean through 2015 (Report of the Shark Working Group). WCPFN-NC13-2017/IP-06. Vancouver, Canada.
- Jensen, M. P., Abreu-Grobois, F. A., Frydenberg, J., Loeschcke, V. 2006. Microsatellites provide insight into contrasting mating patterns in arribada vs. non-arribada olive ridley sea turtle rookeries. Molecular Ecology 15: 2567–2575. (DOI: 10.1111/j.1365-294X.2006.02951.x)
- Jones, A. G. 2005. GERUD 2.0: a computer program for the reconstruction of parental genotypes from half-sib progeny arrays with known or unknown parents. Molecular Ecology Notes 5: 708-711
- Kajiura, S. M., Sebastian, A. P., Tricas, T. C. 2000. Dermal bite wounds as indicators of reproductive seasonality and behaviour in the Atlantic stingray, *Dasyatis sabina*. Environmental Biology of Fishes 58 (1): 23-31. (<https://doi.org/10.1023/A:1007667108362>)
- Keller, L., Reeve, H. K. 1995. Why do females mate with multiple males? The sexually-selected sperm hypothesis. Advanced Studies in Behavior 24: 291–315.
- Kempenaers, B., Verheyen, G. R., van der Broeck, M., Burke, T., van Broeckhoven, C., Dhondt, A. A. 1992. Extra-pair paternity results from female preference for high quality males in the blue tit. Nature 357: 494–496. (<https://doi.org/10.1038/357494a0>)
- Kessler, W. S. 2006. The circulation of the eastern tropical Pacific: a review. Progress in Oceanography 69: 181-217.

- Kohler, N. E., Turner, P. A. 2008. Stock structure of the blue shark (*Prionace glauca*) in the North Atlantic Ocean based on tagging data. En: Camhi, M. D., Pikitch, E. K., Babcock, E. A. (Eds.), *Sharks of the Open Ocean: Biology, Fisheries and Conservation*. Blackwell Publishing, Oxford, U. K.
- Larson, S. E., Daly-Engel, T. S., Phillips, N. M. 2017. Review of current conservation genetic analyses of Northeast Pacific sharks. En: Larson, S. E., Lowry, D. (Eds.). *Advances in marine biology. Northeast Pacific shark biology, research and conservation, part A. Vol 77*. Oxford: Academic Press.
- Lavín, M. F., Beier, J., Gómez-Valdés, V. M. Godínez, García, J. 2006. On the summer poleward coastal current off SW México. *Geophysical Research Letters* 33: 2.
- Litvinov, F. F. 2006. On the role of dense aggregations of male and juveniles in the functional structure of the range of the blue shark *Prionace glauca*. *Journal of Ichthyology* 46 (8): 613-624
- Lyons, K., Chabot, C. L., Mull, C. G., Paterson-Holder, C. N., Lowe, C. G. 2017. Who's my daddy? Considerations for the influence of sexual selection on multiple paternity in elasmobranch mating systems. *Ecology and Evolution* 7: 5603-5612. (DOI: 10.1002/ece3.3086)
- Madsen, T., Shine, R., Loman, J., Håkansson, T. 1992. Why do female adders copulate so frequently? *Nature* 355: 440–441. (<https://doi.org/10.1038/355440a0>)
- Marino, I. A. M., Riginella, E., Gristina, M., Rasotto, M. B., Zane, L., Mazzoldi. 2015. Multiple paternity and hybridization in two smooth-hound sharks. *Scientific Reports* 5: 12919. (DOI: 10.1038/srep12919)
- Morin, P. A., Martien, K. K., Archer, F. I., Cipriano, F., Steel, D., Jackson, J., & Taylor, B. L. 2010. Applied conservation genetics and the need for quality control and reporting of genetic data used in fisheries and wildlife management. *Journal of Heredity* 101(1), 1-10. doi:10.1093/jhered/esp107

- Nakano, H., Stevens, J. D. 2008. The Biology and Ecology of the Blue Shark, *Prionace glauca*. En Camhi, M. D., Pikitch, E. K., Babcock, E. A. (Eds.). Sharks of the Open Ocean. Biology, Fisheries & Conservation. Blackwell Publishing. Oxford, U. K.
- Neff, B. D., Pitcher, T. E. 2002. Assessing the statistical power of genetic analyses to detect multiple mating in fishes. *Journal of Fish Biology* 61: 739-750 (doi:10.1006/jfbi.2002.2101)
- Nosal, A. P., Lewallen, E. A., Burton, R. S. 2013. Multiple paternity in leopard shark (*Triakis semifasciata*) litters sampled from a predominantly female aggregation in La Jolla, California, U. S. A. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 446: 110-114 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2013.05.002>)
- Park, S. D. E. 2002. Trypanotolerance in west african cattle and the population genetic effects of selection. Tesis de doctorado. University of Dublin.
- Parker, G. A. 1970. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biological Reviews* 45 (4): 525-567. (<https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1970.tb01176.x>)
- Parés-Sierra, A., López, M., Pavía, E. G. 1997. Oceanografía física del océano Pacífico nororiental. En: Lavin, M. G. (Ed.). Contribuciones a la oceanografía física de México, monografía No. 3. Unión Geofísica Mexicana, pp. 1-24
- Parsons, G. R., Hoffmayer, E. R., Frank, J., Bet-Sayad, W. V. 2008. A review of shark reproductive ecology: life history and evolutionary implications. En: Rocha, M. J., Aruke, A., Kapoor, B. G. (Eds.). *Fish Reproduction*. C. R. C. Press: Boca Raton. Florida, U. S. A.
- Pearse, D. E., Anderson, E. C. 2009. Multiple paternity increases effective population size. *Molecular Ecology* 18: 3124-3127 (DOI: 10.1111/j.1365-294X.2009.04268.x)

- Pirog, A., Jaquemet, S., Soria, M., Magalon, H. 2015. First evidence of multiple paternity in the bull shark (*Carcharhinus leucas*). *Marine and Freshwater Research* 68: 195-201 (doi:10.1071/mf15255)
- Pizzari, T., Wedell, N. 2013. The polyandry revolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 368: 20120041. (doi: 10.1098/rstb.2012.0041)
- Portnoy, D., Heist E. J. 2012. Molecular markers: progress and prospects for understanding reproductive ecology in elasmobranchs. *Journal of Fish Biology* 80: 1120–1140. (<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2011.03206.x>)
- Pratt, Jr., H. L. 1979. Reproduction in the blue shark, *Prionace glauca*. *Fishery Bulletin* 77(2): 445-470
- Pratt, Jr., H. L. 1993. The storage of spermatozoa in the oviductal glands of western North Atlantic sharks. *Environmental Biology of Fishes* 38: 139-149. (<https://doi.org/10.1007/BF00842910>)
- Pratt, H. L., Carrier, J. C. 2001. A review of elasmobranch reproductive behaviour with a case study on the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*. *Environmental Biology of Fishes* 60: 157-188. (doi:10.1023/A:1007656126281)
- Rigby, C. L., Barreto, R., Carlson, J., Fernando, D., Fordham, S., Francis, M. P., Herman, K., Jabado, R. W., Liu, K. M., Marshall, A., Pacoureaux, N., Romanov, E., Sherley, R. B., Winker, H. 2019. *Prionace glauca*. The IUCN Red List of Threatened Species 2019: e.T39381A2915850. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-3.RLTS.T39381A2915850.en>.
- Rowe, S., Hutchings, J. A. 2003. Mating systems and the conservation of commercially exploited marine fish. *Trends in Ecology and Evolution* 18 (11): 567-572
- Saville, K. J., Lindley, A. M., Maries E. G., Carrier, J. C., Pratt Jr., H. L. 2002. Multiple paternity in the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*. *Environmental Biology of Fishes* 6: 347-351

- Schmidt, J. V., Chen, C., Sheikh, S. I., Meekan, M. G., Norman, B. M., Joung, S. 2010. Paternity analysis in a litter of whale shark embryos. *Endangered Species Research* 12: 117-124. (doi: 10.3354/esr00300)
- Shimizu, M. M., Kosaka, N., Shimada, T., Nagahata, T., Iwasaki, H., Nagai, H., Shiba, T., Emi, M. 2002. Universal fluorescent labeling (UFL) method for automated microsatellite analysis. *DNA Research* 9:173-178
- Silver, L. 2001. Microsatellite. En Brenner, S., y Miller, J. H. (Eds.) *Encyclopedia of Genetics*. Academic Press.
- Smith, S. E., Au, D. W., Show, C. 1998. Intrinsic rebound potentials of 26 species of Pacific sharks. *Marine and Freshwater Research* 49: 663-678. (DOI: 10.1071/MF97135)
- Sosa-Nishizaki, O., Fulong-Estrada, E., Reyes-Gonzales, J. A., Perez-Jimenez, J. C. 2002. Blue shark (*Prionace glauca*) fishery in Baja California, Mexico: an example of artisanal and middle scale fisheries interaction. *Scientific Council Meeting Research*. NAFO, No. 02/140.
- Sosa-Nishizaki, O., Márquez-Farías, J. F., Villavicencio-Garayzar, C. J. 2008. Case study: pelagic shark fisheries along the west coast of Mexico. En Camhi, M. D., Pikitch, E. K., Babcock, E. A. (Eds.) *Sharks of the open ocean: biology, fisheries and conservation*. Blackwell Publishing Ltd. Oxford, U. K.
- Stevens, J. D., Bradford, R. W., West, G. J. 2010. Satellite tagging of blue sharks (*Prionace glauca*) and other pelagic sharks off eastern Australia: depth behaviour, temperature experience and movements. *Marine Biology* 157: 575-591.
- Taguchi, M., Shigenobu, Y., Ohkubo, M., Yanagimoto, T., Sugaya, T., Nakamura, Y., Saitoh, K., Yokawa, K. 2013. Characterization of 12 polymorphic microsatellite DNA loci in the blue shark, *Prionace glauca*, isolated by next generation sequencing approach. *Conservation Genetic Resources* 5: 117-119 (DOI 10.1007/s12686-012-9746-y)

- Tiedemann, R., Cipriano, F., Morin, P., Hoelzel, A., Palsbøll, P., Waples, R., . . . Double, M. 2012. Updated guidelines for DNA data quality control and error rate estimation, for genetic studies relevant to IWC management advice. Report to the Scientific Committee of the International Whaling Commission.
- Valière, N. 2002. Gimlet: a computer program for analyzing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes* Doi: 10.1046/j.1471-8278.2002.00228.x
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P., Shipley, P. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535-538
- Vázquez-Lobo, A., Morales-García, A. E. 2014. Microsatélites. En Cornejo-Romero, A., Serrato-Díaz, A., Rendón-Aguilar, B., Rocha-Munive, G. R. (Eds.) *Herramientas Moleculares Aplicadas En Ecología: Aspectos Teóricos y Prácticos*. México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- Völger-Santos, R. E. 2011. *Ecología especial, estructura poblacional y dinámica espacio-temporal de *Prionace glauca* (Chondrichthyes, Carcharhinidae) en la zona de transición tropical-subtropical del Pacífico nororiental*. (Tesis de doctorado). CICIMAR-IPN, La Paz, B. C. S.
- Vögler-Santos, R., Beier, E., Ortega-García, S., Santana-Hernández, H., Valdez-Flores, J. J. 2012. Ecological patterns, distribution and population structure of *Prionace glauca* (Chondrichthyes: Carcharhinidae) in the tropical-subtropical transition zone of the north-eastern Pacific. *Marine Environmental Research* 73: 37-52. (doi: 10.1016/j.marenvres.2011.10.009)
- Walker, T. I. 2004. Management measures. En Musick, J. A., Bonfil R. (Eds.) *Technical Manual for the management of elasmobranchs*. (285-32). Asia Pacific Economic Cooperation Secretariat, Singapore.

- Walker, T. I. 2005. Reproduction in fisheries science. En Hamlett, W. C. (Ed.) Reproductive biology and phylogeny of Chondrichthyes: sharks, batoids and chimaeras. Science Publishers Inc., Enfield, New Hampshire, E. U. A.
- Watson, P. J. 1991. Multiple paternity as genetic bet-hedging in female sierra dome spiders, *Linyphia litigosa* (Linyphiidae). *Animal Behaviour* 41: 343–360. ([https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(05\)80486-5](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(05)80486-5))
- Whitney, N. M., Pratt, H. L., Carrier, J. C. 2004. Group courtship, mating behaviour and siphon sac function in the whitetip reef shark, *Triaenodon obesus*. *Animal Behaviour* 68: 1435-1442 (doi:10.1016/j.anbehav.2004.02.018)
- Yasui, Y. 1998. The ‘genetic benefits’ of female multiple mating reconsidered. *Trends in Ecology & Evolution* 13 (6): 246-250 (DOI: 10.1016/S0169-5347(98)01383-4)
- Zane, L., L. Bargelloni, and T. Patarnello. 2002. Strategies for Microsatellite Isolation: A Review. *Molecular Ecology* 11: 1–16.
- Zeh, J. A., and Zeh, D. W. 2001. Reproductive mode and the genetic benefits of polyandry. *Animal Behaviour* 61: 1051–1063. (doi: 10.1006/anbe.2000.1705)

Anexo 1. Tabla complementaria de datos generales para hembras grávidas

La tabla presenta la longitud total (LT), longitud furcal (LF), longitud precaudal (LPC), longitud interdorsal (DI) de cada hembra grávida en cm, y su peso (kg). Además, se incluye el largo y ancho del ovario (cm) y su peso (g), el ancho de su útero (derecho e izquierdo) y ancho de las glándulas oviducales (GO) derecha e izquierda en cm. El ovario se clasificó de acuerdo a su estado de maduración. Los criterios de maduración son los siguientes: 1) ovario muy pequeño, 2) ovario en desarrollo, pero sin folículos ováricos maduros, 3) ovario agrandado con folículos desarrollados, 4) ovario en reposo.

Código	LT	LF	LPC	DI	Peso	Ovario			Útero		GO		Maduración de ovario
						Long	Ancho	Peso	Izq	Der	Izq	Der	
H01	209	170	157	56	42	15.6	6	85.8	22	20	2.7	3.3	3
H02	224	182.2	169	63	53	17.5	9.3	128.6	29	10.5	3.3	3.3	NA
H03	224	182	167	61	50.6	15	7	90.8	19.5	18	3.5	3.4	3
H04	258	215	174	62	74.6	16.6	7.5	37	21.8	17	3	2.9	4
H05	216	178	163	60	36	18	7.9	51	23	19	4.2	3.7	3
H06	219	180	167	60	40	21.4	7.3	32	NA	19.2	NA	4.1	3
H07	271	211	199	70	65	NA	NA	56.6	19	16.5	3.1	4	3
H08	220	165	150	40	34	13.8	7.9	30.4	19.3	13.7	3.1	3.4	4
H09	196	155	144	43	43.5	15.3	7	34	14.7	16.5	3.2	3.3	NA
H10	221	183	170	64	35	9.9	5.1	11	19.6	17.9	2.9	3.2	1
H11	215	175	162	57	40	16	10	29.2	NA	NA	NA	NA	NA
H12	212	173	163	56	NA	8	4	NA	NA	NA	3.5	3	NA

La continuación de la tabla contiene los huevos no desarrollados y las placentas sueltas encontradas en el útero izquierdo (UI) y derecho (UD) de las hembras grávidas analizadas.

Código	Huevos no desarrollados		Placentas sueltas	
	UI	UD	UI	UD
H01	NA	NA	NA	NA
H02	5	NA	NA	NA
H03	3	4	NA	NA
H04	1	1	1	NA
H05	NA	NA	12	6
H06	NA	3	2	4
H07	NA	NA	8	3
H08	NA	NA	NA	NA
H09	6	NA	NA	NA
H10	NA	NA	9	2
H11	NA	NA	4	21
H12	5	1	4	11

Anexo 2. Tabla complementaria de datos generales para machos

La tabla presenta la longitud total (LT), longitud furcal (LF), longitud precaudal (LPC), longitud interdorsal (DI) de cada macho en cm, y su peso (kg). Además, se incluye el largo de los clasps izquierdo y derecho (cm), y el ancho (AI, AD), largo (LI, LD) y peso (PI, PD) de los testículos derecho e izquierdo en cm y g.

Código	LT	LF	LPC	DI	Peso	Claspers		Testículos					
						Izq	Der	LI	LD	AI	AD	PI	PD
M01	167	132	122	51	16	13.5	11	11.5	14	2.8	3.6	NA	NA
M02	249	201	185	66	47.6	24	24	13.2	14.4	3.7	4.5	80.2	97
M03	212	174	159	59	31	22.5	21	17.2	15	3.4	2.5	NA	NA
M04	221	180	167	61	35.4	13.5	14	14.8	13.5	5	3.7	71.4	37
M05	242	194	182	78	49.4	24	22.5	13.8	14.3	3.8	4.1	67	68.4
M06	210	169	156	53	29	20	19	11	20	5	2.9	NA	55.8
M07	228.2	182	166.5	62.5	47	18.5	17	19.5	22.5	8.8	8.6	104.6	134.4
M08	211	170	155	57	28	18	17.3	8.7	11	3.2	4.8	37.2	45.8
M09	253	205	193	70	70.4	21.8	22.3	15.5	18	8	9	120.4	145.4
M10	199.4	162.8	150	53.3	13	14.1	10.3	13	12.8	4.6	3.9	68.8	53.2
M11	253	205	193	70	70.4	21.7	22.3	15.5	18	8	9	120.4	145.4
M12	158	128	118	48	NA	13	12.5	9	8.8	3.3	3.6	NA	NA
M13	289	237	176	70	46	22.5	24	13	15.3	5	5.5	NA	NA
M14	287	231	214	82	87	28	25.5	20	28	6	6.5	NA	NA
M15	226	185	172.5	64	35	20	21	12.8	14.1	3.3	3.8	NA	NA
M16	202	163	149	60	35	21	23.5	20	15	7.5	3.9	NA	NA
M17	154	126	116	39	25	11.2	10.5	11	11.5	4.8	4.5	32	33
M18	208	170	156	55.5	32	22.1	23	10	16.4	5	5.3	58.6	89.4
M19	223	183.4	168.2	58.7	34	22	20.9	18.2	16.3	5.8	5	78.4	60.4
M20	210	170	157	56	30	18.9	17.8	14.4	13.7	5	4.9	96.4	91
M21	220	178	164	56	32.8	18.8	19.9	12.9	12.6	3.8	3.2	53	49
M22	221	179	163	58	35	19.5	20	12.1	12.7	3.9	5.1	79.8	75.4

La continuación de la tabla contiene el estado de maduración de los claspers (C), testículos (T) y el individuo (I). Los criterios de maduración fueron los siguientes de acuerdo a Fujinami y colaboradores (2017):

Claspers (C): 1) claspers no calcificados, 2) claspers parcialmente calcificados, 3) claspers rígidos, completamente calcificados; testículos (T): 1) testículos delgados, 2) testículos engrosados, 3) testículos agrandados y predominantes; individuo (I): 1) neonato, 2) juvenil, 3) pre-adulto, 4) adulto

Código	Maduración		
	C	T	I
M01	1	NA	2
M02	3	3	4
M03	3	NA	4
M04	2	2	3
M05	3	2	4
M06	3	2	4
M07	1	3	3
M08	1	1	2
M09	3	3	4
M10	1	1	2
M11	3	3	4
M12	1	NA	2
M13	3	2	4
M14	3	3	4
M15	3	3	4
M16	3	2	4
M17	1	1	2
M18	3	3	4
M19	3	2	4
M20	2	NA	3
M21	3	2	4
M22	2	3	3

Anexo 3. Tabla complementaria de datos generales para embriones

En la siguiente tabla se presentan los datos tomados para cada uno de los embriones de las hembras grávidas. La tabla incluye la hembra a la cual pertenece el embrión, su respectiva etiqueta, sexo, longitud total (LT), longitud furcal (LF) y longitud precaudal (LPC) en cm, peso con y sin placenta (gr), y el útero en el cual se encontraba. Los embriones que presenten un asterisco (*) son aquellos que no estaban desarrollados.

Código Madre	Etiqueta embrión	Sexo	LT	LF	LPC	Peso	Peso con placenta	Útero
H01	TA02-H01	H	38.7	32	29	164.8	NA	Izq
	TA03-H01	M	40	33	28.8	180.2	NA	Izq
	TA04-H01	M	37.1	30.5	27	160	153.6	Izq
	TA05-H01	H	42.3	35	30.8	232.6	NA	Izq
	TA06-H01	M	41.2	35	31.2	221	229	Izq
	TA07-H01	M	43	35.1	31.5	240.2	NA	Izq
	TA08-H01	H	42	35.2	32	243.2	NA	Izq
	TA09-H01	M	45	35	32	252.4	NA	Izq
	TA10-H01	M	40.3	34.3	30	213.8	NA	Izq
	TA11-H01	M	42	34.5	31.5	220	NA	Izq
	TA12-H01	H	40.5	33.3	30	194.4	NA	Izq
	TA13-H01	H	39	32.1	29.4	171.4	NA	Izq
	TA14-H01	H	40.8	34	31	220	NA	Izq
	TA15-H01	M	42.6	34.5	31.4	198.6	NA	Izq
	TA16-H01	M	40.2	32.8	30.2	202.8	NA	Izq
	TA17-H01	M	42	35.7	32	230.2	NA	Izq
	TA18-H01	H	40.2	33	30	204	NA	Izq

Código Madre	Etiqueta embrión	Sexo	LT	LF	LPC	Peso	Peso con placenta	Útero
	TA02-H02	M	32.1	26.4	23.7	130	136.4	Izq
	TA03-H02	M	33.3	28.2	24.8	137.6	144.2	Izq
	TA04-H02	H	35	30.8	27.4	180.4	188.2	Izq
	TA05-H02	H	32.2	27.3	24.4	126.6	130.2	Izq
	TA06-H02	H	34.4	28.7	25.4	148	153.6	Izq
	TA07-H02	H	36.5	30.3	26.5	200.4	208.8	Izq
	TA08-H02	H	35.5	30.4	27.4	182.6	191.4	Izq
	TA09-H02	M	32.7	27	24.6	125.4	130.6	Izq
	TA10-H02	H	33.5	28.2	24.8	133.4	143.4	Izq
	TA11-H02	M	38.3	31.4	28.4	191.4	197.6	Izq
	TA12-H02	H	35.2	30	26.7	162.4	169.2	Izq
	TA13-H02	M	31.5	26.3	23.6	96.8	101	Izq
	TA14-H02	H	37	31.4	27.7	180.4	190	Izq
	TA15-H02	M	37	30.4	27.6	191.6	196.8	Izq
H02	TA16-H02	H	35.4	30.4	26.9	216	226	Izq
	TA17-H02	H	36.2	32.3	28.8	186.2	194.4	Izq
	TA18-H02	H	35	28.9	26.1	174.4	181.6	Izq
	TA19-H02	M	34.9	29.3	26.3	169.8	175.8	Izq
	TA20-H02	M	36.5	30	27	205.4	214	Izq
	TA21-H02	H	37.5	31	28	177.8	186.2	Izq
	TA22-H02	H	36	30.2	27.4	183.2	191.8	Izq
	TA23-H02	M	34	27.5	24.1	151	158.2	Izq
	TA24-H02	H	39.3	32.3	29.5	233.6	246	Izq
	TA25-H02	M	36	30	27.6	173.4	181.8	Izq
	TA26-H02	H	31	25.2	20.5	95.8	104	Izq
	TA27-H02	M	36.8	30.6	27.3	192.8	196.6	Izq
	TA28-H02	M	32.9	27.2	24.5	119.4	124	Izq
	TA29-H02	M	38.3	31.6	28.3	207	215.2	Izq
	NA*	M	17.9	14.6	12.8	21.6	13.2	Izq

Código Madre	Etiqueta embrión	Sexo	LT	LF	LPC	Peso	Peso con placenta	Útero
H03	TA02-H03	H	29.7	24	21.6	107.2	132.4	Der
	TA03-H03	M	30.1	24.7	22.4	111.2	136.8	Izq
	TA04-H03	M	29.6	23.9	21.4	116.4	134.4	Der
	TA05-H03	M	30.7	29.9	22.5	120.6	138.4	Izq
	TA06-H03	H	30.5	24.7	22.4	120.9	139.4	Izq
	TA07-H03	H	30.2	25.7	22.7	120.2	142.2	Der
	TA08-H03	M	30.1	24.3	21.9	108.8	141.2	Der
	TA09-H03	M	30.6	24.8	22.5	116.4	141.8	Izq
	TA10-H03	M	31.2	25.4	23.2	117	136.4	Der
	TA11-H03	H	30.2	24.8	22.3	116.2	135.8	Izq
	TA12-H03	M	30.6	24.7	22.4	109.8	127.8	Izq
	TA13-H03	M	32.5	26.2	23.7	130.4	146.4	Der
	TA14-H03	H	32.6	26.1	23.7	140.4	168.8	Der
	TA15-H03	H	33	26.6	24.5	137.7	154.6	Izq
	TA16-H03	H	28.6	23.5	21	93.2	106.8	Der
	TA17-H03	H	31.7	26	23.1	116.6	133.2	Izq
	TA18-H03	H	29.9	24.5	21.8	110.2	135.8	Der
	TA19-H03	M	29.2	23.8	21.3	97.6	114.4	Der
	TA20-H03	M	29.5	24.3	21.7	102.2	116.6	Izq
	TA21-H03	H	31	25.9	22.8	114.6	146	Izq
	TA22-H03	M	31	25.5	23.1	115	136.8	Izq
	TA23-H03	M	29.5	24.4	21.9	107.8	126.2	Izq
	TA24-H03	M	29.5	23.8	21.5	111	134.6	Der
	TA25-H03	H	32.1	26.1	23.3	134.4	151.2	Der
	TA26-H03	M	29.9	24.3	21.7	110.4	133	Der
	TA27-H03	M	29.8	24.6	22.2	111.4	122.4	Izq
	TA28-H03	M	29.8	24.6	22	116	133.8	Izq
	TA29-H03	M	30.3	25.6	21.8	114.2	135.8	Der
	TA30-H03	M	31.6	25.8	23.3	123.2	144	Der

Código Madre	Etiqueta embrión	Sexo	LT	LF	LPC	Peso	Peso con placenta	Útero
	TA02-H04	M	23.3	18.8	16.7	47	55.6	Izq
	TA03-H04	H	22.9	18.9	16.5	46	NA	Izq
	TA04-H04	H	22.1	17.9	16.2	42.2	NA	Izq
	TA05-H04	M	22.7	18.1	16.2	44.6	51.2	Izq
	TA06-H04	H	22.9	18.3	16.4	43.8	49.6	Der
	TA07-H04	M	23.4	18.8	16.7	47.2	53.4	Izq
	TA08-H04	H	23.6	18.1	16	40.4	50.4	Izq
	TA09-H04	M	22.8	18.3	16.4	46.2	55.4	Der
	TA10-H04	H	23.6	18.8	16.9	49.2	58.8	Izq
	TA10-H04	H	24.9	19.7	17.8	57	66	Der
	TA11-H04	M	24.1	20	17.4	55.6	61.2	Der
	TA13-H04	M	23.8	19.1	16.8	46.2	54.2	Der
	TA14-H04	M	23.8	19.1	17.1	NA	50.8	Der
	TA15-H04	M	24.5	19.7	18	50.6	57.6	Izq
H04	TA16-H04	M	22.1	17.7	15.7	38.6	51.2	Izq
	TA17-H04	M	23.4	19.1	17.1	45	51.4	Izq
	TA18-H04	H	21.3	17.1	15.2	38.8	46.2	Izq
	TA19-H04	H	20.1	16.2	14.7	30.4	35.8	Izq
	TA20-H04	M	22.5	18.1	15.9	43.4	51.8	Der
	TA21-H04	H	23.7	17.8	16.1	45.2	NA	Izq
	TA22-H04	M	22.2	17.7	15.8	45.6	55.4	Izq
	TA23-H04	M	21.7	17.7	15.7	39.6	44	Der
	TA24-H04	M	22.8	18.5	16.5	42	49.4	Izq
	TA25-H04	H	23.9	19.1	17.1	46.6	53.2	Izq
	TA26-H04	M	21.2	17.1	15.4	38.8	45.8	Izq
	TA27-H04	H	23.4	18.6	16.6	51.6	61.2	Izq
	TA28-H04	M	22.9	18.8	16.7	46.4	52.6	Der
	TA29-H04	H	21.6	16.4	15.6	40.6	46	Der
	TA30-H04	M	21.4	17.1	15.4	41.8	47.6	Der
	TA31-H04	H	22.4	18.3	16.3	44.4	50.4	Izq

Código Madre	Etiqueta embrión	Sexo	LT	LF	LPC	Peso	Peso con placenta	Útero	
H05	TA02-H05	M	17	14.1	12.7	24.8	NA	Der	
	TA03-H05	H	16.8	13.1	11.8	18.8	NA	Der	
	TA04-H05	H	16.4	13.8	12.3	22.6	NA	Der	
	TA05-H05	H	15.6	12.8	11.5	20.8	25.8	Der	
	TA06-H05	H	15.7	12.9	11.5	19.6	NA	Der	
	TA07-H05	M	17.4	14.1	13.8	25.4	NA	Izq	
	TA08-H05	M	16.5	13.6	12.3	21	NA	Izq	
	TA09-H05	M	15.7	13.1	11.8	18.6	NA	Izq	
	TA10-H05	H	15.6	13.2	12.1	18.18	23.4	Izq	
	TA11-H05	H	16.9	13.4	12.3	20.6	NA	Izq	
	TA12-H05	M	17.4	14.2	13	25.2	32.4	Izq	
	TA13-H05	M	16.1	13.4	12.4	20.4	NA	Izq	
	TA14-H05	M	14.7	12.2	11	16.2	NA	Izq	
	TA15-H05	M	17.3	14.6	13.1	25.6	NA	Izq	
	TA16-H05	M	15.1	12.5	11.4		NA	Izq	
	TA17-H05	H	16	13.4	12.2	21.6	26.2	Izq	
	TA18-H05	H	15.8	13.1	12	18.6	24.4	Izq	
	TA19-H05	M	16.7	13.1	12.8	19.2	NA	Izq	
	TA20-H05	M	17.2	14	12.8	25	NA	Izq	
	TA21-H05	M	17.1	13.9	12.6	24	NA	Izq	
	TA22-H05	M	17	14.4	12.9	24.4	NA	Izq	
	TA23-H05	H	16.2	13.4	12.1	20.8	NA	Izq	
	TA24-H05	H	16.9	14	13.6	22.4	NA	Izq	
	TA25-H05	H	15.6	13.1	12	17.8	NA	Izq	
	TA26-H05	H	17.3	14.5	13	26	NA	Izq	
	TA27-H05	M	17	14.1	13.8	21.6	NA	Izq	
	TA28-H05	H	16.4	13.5	12.4	21.4	NA	Izq	
	TA29-H05	M	16.5	13.4	12	21.4	NA	Izq	
		NA	M	15.8	13.1	11.7	17.6	NA	Der
		NA	M	17.3	14.2	12.7	21.4	NA	Der

NA	H	16.6	13.7	12.3	21.4	31.4	Der
NA	M	18	14.6	13.1	25.8	NA	Der
NA	H	17.4	14.2	12.7	23	NA	Der
NA	H	15.4	12.6	11.5	20.6	28	Der

Código Madre	Etiqueta embrión	Sexo	LT	LF	LPC	Peso	Peso con placenta	Útero
	TA02-H06	H	24	198	17.6	54.6	63.2	Izq
	TA03-H06	M	24.3	19.8	17.9	59.2	66.6	Izq
	TA04-H06	H	25.4	21.1	18.5	62	NA	Izq
	TA05-H06	H	28.7	23.5	20.9	85	100.8	Izq
	TA06-H06	M	26.7	21.6	19	67.8	NA	Izq
	TA07-H06	H	27.5	22.3	19.8	79	89.2	Izq
	TA08-H06	H	25.9	20.8	18.7	64.8	NA	Izq
	TA09-H06	H	24.4	19.9	17.8	52.6	61.4	Izq
	TA10-H06	M	25.5	21.5	19.6	59.8	70.4	Der
	TA11-H06	H	27	22.2	19.7	68.4	NA	Der
	TA12-H06	H	25.5	21.4	19.5	79.8	NA	Der
	TA13-H06	M	26.2	21.4	19.3	62.6	70.8	Der
	TA14-H06	M	26	21.7	19.5	67	74.8	Der
	TA15-H06	H	26.5	21.4	19.2	61.8	67.2	Der
	TA16-H06	M	24.5	20.5	18.8	54	61.2	Der
	TA17-H06	H	23.3	19.3	17.4	47.2	51.6	Der
H06	NA	H	26.6	21.8	19.2	70.4	77	Izq
	NA	H	23.3	18.8	16.7	54.4	62.8	Izq
	NA	M	25.6	21	18.6	67	75.6	Izq
	NA	M	23.9	19.2	17.6	57	67.6	Izq
	NA	H	25	20.2	18.3	55.8	63.6	Izq
	NA	H	25.7	21	18.7	53.2	64.2	Izq
	NA	H	26.2	21.3	19.2	69.2	77.2	Izq
	NA	H	25	20.1	18.1	59.6	68.6	Izq
	NA	H	26.3	21.3	19.2	65.4	72.2	Izq
	NA	M	23.8	19.1	17	55.4	61.8	Izq
	NA	M	24.3	19.6	17.6	58.4	69.4	Izq
	NA	M	27.2	23	21.8	74.4	NA	Der
	NA	M	27.1	21.4	19.3	65.8	NA	Der
	NA	M	27.5	22.3	20.9	80	91.2	Der
	NA	M	26.6	21.2	19	62.2	NA	Der
	NA	M	27.7	22.2	20	67.8	74	Der
	NA	M	25	21	19.4	56.8	62.8	Der
	NA	M	26	22.3	20	67.2	74.8	Der

NA	M	25.7	21.4	19.5	64.2	NA	Der
NA	M	25	21.5	19.9	58.8	65.2	Der
NA	H	25.5	21.2	19.5	54.6	60	Der
NA	H	23.8	20.1	19.4	51	56.6	Der

Código Madre	Etiqueta embrión	Sexo	LT	LF	LPC	Peso	Peso con placenta	Útero
	TA02-H07	M	19.9	16.6	14.4	33.2	42.2	Izq
	TA03-H07	H	21.8	18.1	16.8	37.4	NA	Der
	TA04-H07	H	23.2	18.7	16.9	41.2	NA	Izq
	TA05-H07	H	22.5	18.4	16.6	42.4	48	Izq
	TA06-H07	H	22.2	18.6	17	42	NA	Der
	TA07-H07	H	20.2	16.6	14.9	32.2	37.4	Izq
	TA08-H07	M	20.6	17.4	16.8	35	43.8	Der
	TA09-H07	H	22.2	18.4	17.8	45.4	50.2	Der
	TA10-H07	H	22.2	17.8	16.5	36.6	NA	Der
	TA11-H07	H	21.6	17.8	16	38.4	43.4	Izq
	NA	M	21.6	17.4	15.6	37.4	NA	Izq
	NA	H	22.7	18.7	16.7	41.6	46.6	Izq
	NA	M	21.2	17.3	15.6	34.4	NA	Izq
	NA	M	20.7	17	15.2	34.4	40.8	Izq
	NA	M	21.9	19.1	16.2	38.8	44.2	Izq
H07	NA	M	20.1	16.8	15.1	34.2	41	Izq
	NA	H	20.3	16.6	14.9	35.4	44.2	Izq
	NA	H	21.5	17.9	16.2	38	NA	Izq
	NA	H	22.5	18.4	16.5	43.4	NA	Izq
	NA	M	22.7	19.7	17.2	44	NA	Der
	NA	H	22.2	18.6	16.8	47.2	51.4	Der
	NA	M	21.7	17.5	16	41.4	50.8	Der
	NA	H	21.9	18.2	16.6	39.8	NA	Der
	NA	H	23.4	19.3	17.7	47.2	NA	Der
	NA	H	21.4	17.4	16.1	35.6	NA	Der
	NA	H	21.8	17.6	16.2	42.8	48.4	Der
	NA	H	21.7	18.1	16.7	41	NA	Der
	NA	M	21.2	17.8	16.4	38.8	46.6	Der
	NA	M	23	19.1	17.6	47	NA	Der
	NA	H	21.6	17.7	16.4	40.2	NA	Der
	NA	H	21.3	17.7	16.3	40.2	NA	Der

NA	H	19.5	16.4	15.3	29.6	NA	Der
NA	H	22.2	18.2	16.5	42.6	NA	Der

Código Madre	Etiqueta embrión	Sexo	LT	LF	LPC	Peso	Peso con placenta	Útero
	TA02-H08	H	18.8	15.6	14	29.6	NA	Izq
	TA03-H08	M	18.6	15.2	13.8	25.2	39.2	Izq
	TA04-H08	M	16.6	14.8	13.7	24.2	31.4	Der
	TA05-H08	H	18.1	15	13.5	23.8	30.2	Izq
	TA06-H08	M	20.4	16.7	15.1	34.8	NA	Izq
	TA07-H08	M	19.6	16.1	14.5	32.2	43	Izq
	TA08-H08	M	18.4	16.6	14.3	27	33.4	Der
	TA09-H08	H	17.5	14.7	13.6	27.4	NA	Der
H08	TA10-H08	M	17.6	13.7	12.7	20.2	25.6	Der
	TA11-H08	M	17	14.1	13.9	22.8	28.6	Der
	NA	H	18.9	15.4	14.1	29.6	35.6	Izq
	NA	M	20.2	16.4	15	19	36	Izq
	NA	H	19.8	16.2	14.5	30	37.4	Izq
	NA	M	19.8	15.3	13.7	29	36.8	Izq
	NA	M	19.1	15.7	14.2	30.6	41.4	Izq
	NA	M	17.6	14.6	13.2	26	33.4	Der
	NA	M	17.8	15	13.6	23.8	29.6	Der

Código Madre	Etiqueta embrión	Sexo	LT	LF	LPC	Peso	Peso con placenta	Útero
	TA02-H09	M	21.8	17.7	15.8	43.2	55.4	Der
	TA03-H09	H	22.2	17.8	16.1	46	55.8	Der
	TA04-H09	M	22	17.8	15.9	42.2	59.4	Der
	TA05-H09	M	22.5	16.7	14.8	37.2	45	Izq
	TA06-H09	H	22.9	18.3	16.7	50	69.4	Izq
	TA07-H09	M	21.5	18.6	15.4	41.4	51	Der
	TA08-H09	H	21.6	17.6	15.7	43.8	53.6	Izq
	TA09-H09	M	20.1	17.4	16.2	43.6	54	Izq
	TA10-H09	M	22.5	18.3	16.4	50.2	65.6	Izq
	TA11-H09	H	22.2	17.9	16.2	47.8	56.8	Der
	NA	M	17.7	14.7	12.9	25.4	30	Izq
	NA	M	21.3	17.5	15.5	41.4	50.4	Izq
	NA	H	21.7	16.7	15	39.6	51	Izq
	NA	H	21.3	17.4	15.6	44.4	54.4	Izq
H09	NA	H	22.2	18.2	16.3	48.4	63	Izq
	NA	M	21.4	17.3	15.7	42.8	55.8	Izq
	NA	M	21.9	17.8	15.9	45.6	54.2	Izq
	NA	H	23.3	18.8	16.8	50	59.4	Izq
	NA	M	19.4	15.8	14.2	34.8	43.4	Der
	NA	M	21.5	16.7	14.7	37.6	52.4	Der
	NA	M	20.3	16.8	15.2	36	42.6	Der
	NA	M	21.1	17	15.2	38.6	49.8	Der
	NA	H	20.1	16.4	14.7	36.6	44.2	Der
	NA	M	21.4	17.5	15.6	42	44	Der
	NA	H	22.1	18.1	16.1	44.8	55.6	Der
	NA	M	21.6	17.6	15.8	42.6	54	Der
	NA	M	22.1	17.4	15.7	44.4	55.6	Der
	NA	H	21.4	17.5	15.8	41.8	51.6	Der
	NA	M	21.6	17.5	15.7	43	60.2	Der

Código Madre	Etiqueta embrión	Sexo	LT	LF	LPC	Peso	Peso con placenta	Útero
H10	TA02-H10	H	24.1	19.6	17.4	56.2	62	Izq
	TA03-H10	H	23	18.6	17.7	45.2	NA	Der
	TA04-H10	M	21.7	17.9	16	36.8	NA	Izq
	TA05-H10	M	22.9	18.8	17	41	47.6	Der
	TA06-H10	H	22.6	18.7	16.6	45.2	NA	Der
	TA07-H10	H	25.1	21.6	18.3	66.4	NA	Izq
	TA08-H10	H	22.2	18.8	16.8	36.8	42.8	Der
	TA09-H10	H	21.4	17.4	15.7	35.6	NA	Izq
	TA10-H10	H	22.2	18.4	16.5	42.2	NA	Der
	TA11-H10	H	22.7	18.6	16.5	43	NA	Izq
	TA12-H10	H	22.7	18.8	16.9	46.8	53	Der
	TA13-H10	H	22.9	18.7	16.8	45.8	NA	Izq
	TA14-H10	M	24.1	19.6	17.7	47.2	53.2	Der
	TA15-H10	H	22.1	18.2	16.1	40.6	NA	Izq
	TA16-H10	H	22.5	18.4	16.4	38.8	43.6	Der
	TA17-H10	M	23	18.5	16.6	45.2	NA	Izq
	TA18-H10	M	22.3	18.4	16.4	42.4	NA	Der
	TA19-H10	H	20.7	16.8	14.9	35.8	NA	Izq
	TA20-H10	H	23.5	19.3	17.2	44.2	NA	Der
	TA21-H10	M	21.3	17.3	15.6	38	NA	Izq
	TA22-H10	M	23.4	18.2	17.2	46.4	52.4	Der
	TA23-H10	H	24	19.4	17.5	51.8	58.2	Izq

Código Madre	Etiqueta embrión	Sexo	LT	LF	LPC	Peso	Peso con placenta	Útero
	TA02-H11	H	27.7	23	20.8	71.2	NA	Der
	TA03-H11	H	27.4	22.5	20.5	62.6	NA	Der
	TA04-H11	M	27.3	22.4	20.1	63.5	NA	Der
	TA05-H11	M	31.4	26	23.7	88.4	NA	Der
	TA06-H11	M	27.9	22.6	20.4	59.4	62.8	Der
	TA07-H11	M	30.3	24.9	23	73.2	NA	Der
	TA08-H11	H	31.9	26	23.6	102.8	NA	Der
	TA09-H11	H	30.2	24.8	21.4	75	NA	Der
	TA10-H11	H	29.7	24.2	22	72.8	NA	Der
	TA11-H11	H	28.9	24	21.2	73.4	NA	Der
	TA12-H11	H	27.7	23	20.9	64.2	NA	Der
	TA13-H11	H	27.3	22.8	20.2	63.4	NA	Der
	TA14-H11	M	28.5	23	21	75.9	81.4	Izq
	TA15-H11	H	30	24.6	22.1	74.2	77.6	Izq
	TA16-H11	H	28.2	23.5	21.2	62.8	NA	Izq
	TA17-H11	M	30	24.5	22	69.2	73.2	Izq
	TA18-H11	M	31.2	25.7	23.3	89.2	NA	Izq
	TA19-H11	H	28	23.2	21	70.4	74.6	Izq
H11	TA20-H11	H	31	25.5	23	90.2	NA	Izq
	TA21-H11	H	28	23.3	20.9	68	NA	Izq
	TA22-H11	M	24.9	22.5	NA	72	79.8	Izq
	TA23-H11	H	28	23.7	21	66.8	NA	Izq
	TA24-H11	H	29.1	24	21.4	81.6	86.2	Izq
	TA25-H11	H	31	25.5	23.1	NA	94.4	Izq
	NA	M	32	26.1	23.2	93.6	96	Izq
	NA	M	32	26.2	23.3	101.4	NA	Izq
	NA	H	28.5	23.2	21.2	74	NA	Izq
	NA	H	25.6	21.7	19.5	62.8	67	Izq
	NA	H	27	22	21.2	59.6	62.8	Izq
	NA	H	28	23.4	21	76.6	81.2	Izq
	NA	H	30.2	24.9	22.7	83.8	88.6	Izq
	NA	M	30.2	25	22.8	80.2	NA	Izq
	NA	H	30.1	25	22.5	80	83.8	Izq
	NA	H	29	24	21.9	72	NA	Der
	NA	H	31	25.3	22.7	92	NA	Der
	NA	H	29.7	24.8	22.4	84.2	NA	Der

NA	M	30.9	25.6	23.2	82	NA	Der
NA	M	28.9	23.8	21.8	68.8	NA	Der
NA	H	29	23.4	21.5	73.2	NA	Der
NA	M	29	23.4	21.3	71.6	NA	Der
NA	M	29	23	21.6	64.6	NA	Der
NA	M	31.5	25.8	23	81.6	NA	Der
NA	H	28.5	24.9	21.5	66.2	NA	Der
NA	M	28.9	24	21.6	70.6	NA	Der
NA	M	29.1	24	22.8	62.4	NA	Der
NA	H	28.9	24	21.3	69.4	NA	Der
NA	M	31.8	25.9	23.6	74.2	NA	Der
NA	M	28.9	24	21.4	68.2	NA	Der
NA	H	29.1	24	21.7	70.8	NA	Der
NA	H	30.5	25	22.6	77.4	NA	Der
NA	M	20.3	17	15.2	26.8	NA	Der

Código Madre	Etiqueta embrión	Sexo	LT	LF	LPC	Peso	Peso con placenta	Útero
	TA02-H12	M	30.5	25	22.5	91.4	99.2	Izq
	TA03-H12	H	30.3	24.9	22	98.8	NA	Izq
	TA04-H12	H	30.7	25	22.6	94.4	98	Izq
	TA05-H12	H	29.5	24.4	21.9	85.8	92.6	Izq
	TA06-H12	H	30.6	25.7	23	90	NA	Izq
	TA07-H12	M	30	24.6	23.3	92	NA	Izq
	TA08-H12	H	29	24	21.6	71.6	NA	Der
	TA09-H12	H	32.5	26.8	24	97.4	NA	Der
	TA10-H12	M	29.8	23	22	85.8	NA	Der
	TA11-H12	M	31.3	26	23.4	95.6	NA	Der
	TA12-H12	M	31.5	25.7	23	102.2	NA	Der
H12	TA13-H12	M	28.9	24.7	22	79.6	NA	Der
	TA14-H12	H	30.9	25.7	23	77.2	NA	Der
	TA15-H12	M	28.5	23.7	21.1	68.8	NA	Der
	TA16-H12	M	30.7	25.7	23.3	88.8	NA	Der
	TA17-H12	M	30.5	25.8	23.2	94.2	NA	Der
	TA18-H12	H	30.3	25	22.5	86.8	NA	Der
	TA19-H12	M	32.5	26	23.7	101.8	NA	Der
	TA20-H12	H	27.9	23	20.7	72.4	NA	Der
	TA21-H12	H	24.5	24.9	22.1	69.2	73.6	Der
	TA22-H12	H	28.4	23.3	21	64	NA	Der
	TA23-H12	H	30.7	25.2	23	100.8	108.8	Izq
	TA24-H12	H	29.1	24.3	21.7	69.2	NA	Der