



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
(BIOLOGÍA MARINA)

SISTEMÁTICA MOLECULAR DE LAS RAYAS DEL GÉNERO *Rhinoptera*
(ELASMOBRANCHII, MYLIOBATIFORMES) DISTRIBUIDAS EN AMÉRICA

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:
PAOLA YANIRA PALACIOS BARRETO

TUTOR PRINCIPAL
Dr. PÍNDARO DÍAZ JAIMES
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGIA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dr. FRANCISCO JAVIER GARCIA DE LEÓN
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL NOROESTE,
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Dr. JUAN CARLOS PÉREZ JIMÉNEZ
EL COLEGIO DE LA FRONTERA SUR (ECOSUR)

Dr. JAVIER TOVAR ÁVILA
INSTITUTO NACIONAL DE PESCA (INAPESCA)

Dr. JOSÉ LEONARDO CASTILLO-GENIZ
INSTITUTO NACIONAL DE PESCA (INAPESCA)

ASESOR EXTERNO Dr. JOSE SERGIO HLEAP LOZANO
FUNDACIÓN COLOMBIANA PARA LA INVESTIGACIÓN Y CONSERVACIÓN DE
TIBURONES Y RAYAS -SQUALUS-

CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE DE 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
Universidad Nacional Autónoma de México



**SISTEMÁTICA MOLECULAR DE LAS RAYAS DEL GÉNERO *Rhinoptera*
(ELASMOBRANCHII, MYLIOBATIFORMES) DISTRIBUIDAS EN AMÉRICA**

T E S I S

que para obtener el grado académico de:

**Maestra en Ciencias
(Biología Marina)**

Presenta:

PAOLA YANIRA PALACIOS BARRETO

Director de Tesis: Dr. Píndaro Díaz Jaimes

Comité Tutor: Dr. Francisco Javier García De León

Dr. Juan Carlos Pérez Jiménez

Dr. Javier Tovar Ávila

Dr. José Leonardo Castillo-Geniz

Dr. José Sergio Hleap Lozano

México, D. F. octubre, 2016

A MI MADRE

Mi escritora Esperanza, gracias por hacer de mí lo que soy, por prepararme para la vida, por ser mi compañera, amiga, darme su apoyo, amor incondicional y ayudarme a cumplir mis sueños. Recibe esta sencilla dedicación como una pequeña muestra de agradecimiento a todos sus sacrificios y esfuerzos. Espero pronto leer su libro!

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la dirección General de Posgrado, por el apoyo económico brindado durante mis estudios de maestría.

A mi tutor Dr. Píndaro Díaz Jaimes por su respaldo, confianza al aceptarme para trabajar en su laboratorio y a mi asesor externo Dr. José Sergio Hleap Lozano, quien con sus aportes y consejos pudimos sacar adelante este trabajo a pesar de la distancia.

A mi comité tutorial: Dr. Francisco Javier García De León, Dr. Juan Carlos Pérez Jiménez, Dr. Javier Tovar Ávila y Dr. José Leonardo Castillo-Geniz, por su apoyo académico, asesorías, observaciones y comentarios durante la realización de mi tesis de grado.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, por haberme permitido vivir tantas experiencias nuevas, en especial a los miembros de la dirección y coordinación del Posgrado, por su amable atención y la ayuda brindada durante mi estancia en esta institución.

A mi familia, mis hermanos, Andrés, Fabián y Carlitos, por enseñarme a tener sueños e ilusiones a pesar de la adversidad, mis sobrinos y mi padre, Mauricio Palacios, por darme su comprensión, apoyo y creer en mí.

A mi mejor amiga, Andrea, por compartir tantos sueños juntas y por ser la hermana que Dios me permitió escoger

A Nadia Sandoval, Natalia Bayona y Elena Escatel, por su apoyo, compañía, colaboración, amistad y ser una mano de ayuda en momentos cruciales que seguirá siendo valiosa.

A Erika, Caro, Xochitl, Gaby, Josue, José, Pedrito, Cristóbal, Valentina, Natalia, Nadia, Tía Elena, Andrea, Isa, Jazmín, Adán, La Andrea, Yaco, Nancy, Giovanna, Dany y Nataly compañeros y amigos de trabajo de laboratorio, salidas de campo y cenas durante mi estancia. Algunos desde el principio, otros fueron llegando después, aun así, gracias por darme un poquito de ustedes y por su amistad.

RESUMEN

El género *Rhinoptera* se compone de ocho especies distribuidas en todos los mares tropicales, subtropicales y templados; habitan bahías, estuarios y desembocaduras de ríos. De estas ocho especies, solo *Rhinoptera bonasus* y *R. brasiliensis* se distribuyen en el Atlántico Occidental, siendo estas morfológicamente muy similares, mientras que solo *R. steindachneri* en el Pacífico Oriental Tropical. La mayor parte de los caracteres diagnósticos para la clasificación del género *Rhinoptera*, se basa en el número de series o filas de las placas dentales. Debido a su gran similitud morfológica, la taxonomía de este género se encuentra en duda y ha sido poco estudiada. Los genes mitocondriales COI, *Cit-b*, NADH2 y el gen nuclear RAG1, proporcionan una primera aproximación para entender cómo el género *Rhinoptera* se ha diversificado. Las relaciones filogenéticas obtenidas a partir de tres análisis de inferencias de reconstrucción de árboles filogenéticos, resultaron bastante similares permitiendo corroborar la identidad taxonómica de las especies tratadas. Las reconstrucciones por inferencia bayesiana fueron las topologías mejor apoyadas. Los análisis de distancias genéticas, permitieron identificar un nivel de divergencia suficiente para considerar como unidades taxonómicas a *R. bonasus*, *R. brasiliensis* y *R. steindachneri* en América. Se confirma la presencia de dos poblaciones divergentes de *R. bonasus*, una al Norte del Atlántico occidental y la otra en el Caribe colombiano. Se presenta una notable afinidad genética y morfológica entre los ejemplares recolectados en el Golfo de México con *R. brasiliensis*, confirmando la presencia de ésta especie en México (desde Tamiahua, Veracruz hasta Chiquilá, Quintana Roo) para la cual se amplía su distribución, sin registrar la presencia de *R. bonasus* en aguas mexicanas. Respecto al origen de la divergencia entre *R. steindachneri* del Golfo de California y *R. brasiliensis* del Golfo de México presentan una especiación reciente hace 2.15 ma (4.49 – 0.56), dichas especies exhiben un grado de semejanza morfológica que permite tratarlas como especies gemelas. Se confirma una marcada divergencia entre las *R. steindachneri* de la costa Pacífica de Baja California respecto a las del Golfo de California y a su vez de las que se distribuyen en las costas del Pacífico mexicano, las cuales se podrían considerar como linajes divergentes en el Pacífico Oriental, lo cual amerita una revisión de su estatus de poblaciones/especies. Eventos geológicos durante el Mioceno-Plioceno podrían haber influido en la historia evolutiva de las *Rhinopteras* distribuidas en América, como lo fue la clausura del Istmo de Panamá la cual representa una explicación coherente para la posible especiación entre *R. bonasus* y *R. steindachneri* del Pacífico oriental presentándose como especies hermanas dentro del género misma que fue estimada en el presente estudio en 3.55 millones de años (6.44 – 1.37).

Tabla de contenido

I.	INTRODUCCIÓN.....	13
II.	MARCO TEORICO	16
	2.1. Posición taxonómica y clasificación.	16
	2.2. Morfología.....	18
	2.2.1. Controversias taxonómicas en <i>Rhinoptera</i>	19
	2.3. Distribución y hábitos migratorios	20
	2.4. Aspectos biológicos del género <i>Rhinoptera</i>	22
	2.5. Importancia pesquera	22
	2.6. Genética en Batoideos	24
III.	ANTECEDENTES	26
	3.1. Evidencias en la filogenia de Myliobatidae	26
	3.2. Origen y diversificación de Myliobatidae, evidencia fósil.	28
	3.3. Datos biológico-reproductivos.	30
	3.3.1. <i>Rhinoptera bonasus</i>	30
	3.3.2. <i>Rhinoptera brasiliensis</i>	31
	3.3.3. <i>Rhinoptera steindachneri</i>	32
	3.4. Estudios genéticos del género <i>Rhinoptera</i>	32
IV.	JUSTIFICACIÓN.....	35
V.	HIPÓTESIS	36
VI.	OBJETIVOS.....	37
	6.1. General	37
	6.2. Específicos	37
VII.	DISEÑO METODOLÓGICO.....	38
	7.1. Área de Estudio	38
	7.2. Trabajo de campo.....	39
	7.3. Trabajo de Laboratorio.....	39
	7.3.1. Extracción de ADN.....	39
	7.3.2. Amplificación de ADN mediante la técnica de PCR.....	39
	7.3.3. Secuenciación.....	41
	7.4. Análisis de datos.....	41

7.4.1. Métodos para inferir filogenias.....	43
7.4.2. Redes de haplotipos.....	45
7.4.3. Estimación de tiempos de divergencia.....	45
VIII. RESULTADOS	48
8.1. Análisis basado en COI	49
8.2. Análisis basado en Cit-b.....	54
8.3. Análisis basado en NADH2	58
8.4. Análisis basado en RAG1	62
8.5. Análisis basado en múltiples genes.....	65
8.6. Estimación del tiempo de divergencia.....	69
IX. DISCUSIÓN.....	72
9.1. Inferencia filogenetica.....	72
9.2. Tiempos de divergencia.....	77
X. CONCLUSIONES.....	80
XI. RECOMENDACIÓN	81
XII. APÉNDICES	82
XIII. BIBLIOGRAFIA	95

Índice de Figuras

<i>Figura 1. Género Rhinoptera; a) Vista dorsal, b) vista ventral de lóbulos cefálicos. Tomado de Compagno et al. (1995).</i>	19
<i>Figura 2. Características de las placas dentales entre Rhinoptera bonasus y R. brasiliensis. Tomado de McEachran & de Carvalho (2002).</i>	20
<i>Figura 3. Distribución de las rayas del género Rhinoptera en América.</i>	21
<i>Figura 4. Representación de la mayoría de las filogenias en la familia Myliobatidae a) datos morfológicos, McEachran & Aschliman (2004); b) datos morfológicos, González-Isáis & Domínguez (2004); c) datos moleculares de Aschliman (2011). Tomado de Aschliman (2014).</i>	27
<i>Figura 5. A: Evolución probable de la mandíbula dentada en Mobúlidos, en comparación con los grupos hermanos Myliobatinae (milobátidos) y Rhinopterinae (Rhinopteras). A excepción de los taxones vivos, la disposición de los dientes y el número de caracteres fueron reconstruidos artificialmente con base a la morfología de los dientes y las relaciones filogenéticas realizadas en los dientes aislados. B, Las relaciones filogenéticas, ocurrencias estratigráficas están representadas como barras verticales; línea discontinua son registros inciertos. Tomada de Adnet et al. (2012).</i>	30
<i>Figura 6. Dendrograma basado en la secuencia de la región del ADNmt NADH2 del género Rhinoptera, por el método Neighbor-Joining (NJ), tomado de Naylor et al. (2012).</i>	33
<i>Figura 7. Red de haplotipos por parsimonia para el género Rhinoptera, el color simboliza el fenotipo. Tomado de Naylor et al. (2012).</i>	33
<i>Figura 8. Sitios de muestreo de las especies del género Rhinoptera.</i>	38
<i>Figura 8. Mandíbulas recolectadas en el Golfo de México. A. Chachalacas, Veracruz. B. Seybaplaya, Campeche</i>	48
<i>Figura 9. Árbol filogenético del gen COI del ADNmt del género Rhinoptera. Las secuencias en colores indican que provienen del GenBank. Los valores son los soportes de Bootstrap calculados con 1000 réplicas (MP/MV) y Probabilidad Posterior (IB).</i>	52
<i>Figura 10. Red de haplotipos del gen COI del ADNmt del género Rhinoptera distribuido en América. Los números indican los pasos mutacionales, sin número existe un solo paso mutacional entre los haplotipos. Los círculos indican los haplotipos, A. Localidad y B. Especie. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de los haplotipos; puntos pequeños representan los vectores intermedios que representan haplotipos extintos o no muestreados.</i>	53

Figura 11. *Árbol filogenético del gen Cit-b del ADNmt del género Rhinoptera. Las secuencias en colores indican que provienen del GenBank. Los valores son los soportes de Bootstrap calculados con 1000 réplicas (MP/MV) y Probabilidad Posterior (IB).*.....56

Figura 12. *Red de haplotipos del gen Cit-b del ADNmt del género Rhinoptera distribuido en América. Los números indican los pasos mutacionales, sin número existe un solo paso mutacional entre los haplotipos. Los círculos indican los haplotipos, A. Localidad y B. Especie. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de los haplotipos; puntos pequeños representan los vectores intermedios que representan haplotipos extintos o no muestreados*57

Figura 13. *Árbol filogenético del gen NADH2 del ADNmt del género Rhinoptera. Las secuencias en colores indican que provienen del GenBank. Los valores son los soportes de Bootstrap calculados con 1000 réplicas (MP/MV) y Probabilidad Posterior (IB).*.....60

Figura 14. *Red de haplotipos del gen NADH2 del ADNmt del género Rhinoptera distribuido en América. Los números indican los pasos mutacionales, sin número existe un solo paso mutacional entre los haplotipos. Los círculos indican los haplotipos, A. Localidad y B. Especie. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de los haplotipos; puntos pequeños representan los vectores intermedios que representan haplotipos extintos o no muestreados*61

Figura 15. *Árbol filogenético del gen RAG 1 del ADNn del género Rhinoptera. Las secuencias en colores indican que provienen del GenBank. Los valores son los soportes de Bootstrap calculados con 1000 réplicas (MP/MV) y Probabilidad Posterior (IB).*.....64

Figura 16. *Red de haplotipos del gen RAG 1 del ADNn del género Rhinoptera distribuido en América. Los números indican los pasos mutacionales, sin número existe un solo paso mutacional entre los haplotipos. Los círculos indican los haplotipos, A. Localidad y B. Especie. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de los haplotipos; puntos pequeños representan los vectores intermedios que representan haplotipos extintos o no muestreados.*65

Figura 17. *Árbol filogenético secuencias concatenadas de los genes (Cit-b + ND2 + COI) del ADNmt del género Rhinoptera. Las secuencias en colores indican que provienen del GenBank. Los valores son los soportes de Bootstrap calculados con 1000 réplicas (MP/MV) y Probabilidad Posterior (IB).*.....67

Figura 18. *Red de haplotipos secuencias concatenadas de los genes (Cit-b + ND2 + COI) del ADNmt del género Rhinoptera distribuido en América. Los números indican los pasos mutacionales, sin número existe un solo paso mutacional entre los haplotipos. Los círculos indican los haplotipos, A. Localidad y B. Especie. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de los haplotipos; puntos pequeños representan los vectores intermedios que representan haplotipos extintos o no muestreados.*68

Figura 19. *Árbol filogenético con estimación de los tiempos de divergencia para Rhinoptera y grupos cercanamente relacionados (Mobula y Myliobatis) basados en el análisis del gen COI del ADNmt con BEAST. La flecha señala el punto de calibración. Los números en rojo son los nodos. Las estimaciones puntuales de*

las edades se dan por encima de cada nodo y barras horizontales azules transparentes, denotan las estimaciones de las divergencias en intervalos superiores e inferiores al 95 % de las densidades posteriores mayores (HPD).....70

Figura 20. Árbol filogenético con estimación de los tiempos de divergencia para las especies de *Rhinoptera* distribuidas en América basados en el análisis del gen COI del ADNmt con BEAST. Las estimaciones puntuales de las edades se dan por encima de cada nodo las barras de colores indican la distribución geográfica. ...71

Índice de Tablas

Tabla 1. Comparación de las variables reproductivas de <i>Rhinoptera bonasus</i> en distintas regiones. Ancho de Disco = AD. Para el alumbramiento y la ovulación: P = principios, M = mediados y F = finales. Tomado y modificado de Pérez-Jiménez (2011).....	31
Tabla 2. Información de las muestras de tejido de las especies <i>Rhinoptera</i> . Número de individuos (N), Caribe colombiano (Cc), Golfo de México (GM), Pacífico Oriental (PO).	38
Tabla 3. Iniciadores utilizados para la amplificación de los tres genes mitocondriales y uno nuclear en <i>Rhinoptera</i>	39
Tabla 4. Mezcla de reacción para el PCR.....	40
Tabla 5. Condiciones del programa utilizado para la amplificación de los fragmentos de los genes COI, Cit-b, NADH2 y RAG 1.....	40
Tabla 6. Secuencias de GenBank de las especies del género <i>Rhinoptera</i> y <i>Mobula japonica</i> utilizadas en este estudio.	42
Tabla 7. Parámetros utilizados para cada posición del codón de las secuencias particionadas para cada gen, mediante el criterio inferencia Bayesiana (BIC).....	44
Tabla 8. Estimadores de diversidad genética por especie para algunos genes de ADNmt y ADNn. Número de secuencias (n), número de haplotipos (A), número de sitios polimórficos (s), diversidad haplotípica (h) con desviación estándar y nucleotídica (π) con desviación estándar.....	49
Tabla 9. Secuencias de las especies del género <i>Rhinoptera</i> utilizadas en este estudio con el gen mitocondrial COI. Número de secuencias (n).....	50
Tabla 10. Distancias genéticas para el género <i>Rhinoptera</i> calculadas a partir del modelo K-2P con el gen mitocondrial COI. Valores en color rojo de la tabla, son las distancias intraespecíficas. De la diagonal hacia abajo se muestran las distancias interespecíficas. Colombia (Col), Brasil (Br), Golfo de México (GM), Pacífico mexicano (PM), Atlántico Norte (ANte).....	51
Tabla 11. Secuencias de las especies del género <i>Rhinoptera</i> utilizadas en este estudio con el gen mitocondrial COI. Número de secuencias (n).....	54
Tabla 12. Distancias genéticas para el género <i>Rhinoptera</i> calculadas a partir del modelo K-2P con el gen mitocondrial Cit-b. Valores en color rojo de la tabla, son las distancias intraespecíficas. De la diagonal hacia abajo se muestran las distancias interespecíficas. Colombia (Col), Golfo de México (GM), Pacífico mexicano (PM), Atlántico Norte (ANte).....	55
Tabla 13. Secuencias de las especies del género <i>Rhinoptera</i> utilizadas en este estudio con el gen mitocondrial COI. Número de secuencias (n).....	58
Tabla 14. Distancias genéticas para el género <i>Rhinoptera</i> calculadas a partir del modelo K-2P con el gen mitocondrial NADH2. Valores en color rojo de la tabla, son las distancias intraespecíficas. De la diagonal hacia abajo se muestran las distancias interespecíficas. Colombia (Col), Golfo de México (GM), Pacífico mexicano (PM), Atlántico Norte (ANte), Costa Pacífico Baja California (CPBC).	59

Tabla 15. Secuencias de las especies del género <i>Rhinoptera</i> utilizadas en este estudio con el gen mitocondrial COI. Número de secuencias (n).....	62
Tabla 16. Distancias genéticas para el género <i>Rhinoptera</i> calculadas a partir del modelo K-2P con el gen nuclear RAG1. Valores en color rojo de la tabla, son las distancias intraespecíficas. De la diagonal hacia abajo se muestran las distancias interespecíficas.	63
Tabla 17. Secuencias de las especies del género <i>Rhinoptera</i> utilizadas en este estudio de la región del ADNmt (Cit-b + NADH2 + COI). Número de secuencias (n).....	66
Tabla 18. Distancias genéticas para el género <i>Rhinoptera</i> calculadas a partir del modelo K-2P de la región del ADNmt (Cit-b + NADH2 + COI). Valores en color rojo de la tabla, son las distancias intraespecíficas. De la diagonal hacia abajo se muestran las distancias interespecíficas.	66

Apéndices

Apéndice 1. Árbol filogenético inferido con Máxima Parsimonia del gen COI del ADNmt del género <i>Rhinoptera</i> . (RbVer)=Veracruz, (RbCam)=Campeche, (RbraSao)= <i>R. brasiliensis</i> GenBank, (Rjay)= <i>R. jayakari</i> GenBank, (Rbonh y Rbon)= <i>R. bonasus</i> GenBank, (RsMaz)=Mazatlán, (RsOax)=Oaxaca, (RsCh)=Chiapas, (RbCo)=Colombia y (Rjav)= <i>R. javanica</i> . Los valores son los soportes de Bootstrap calculados con 1000 réplicas.	82
Apéndice 2. Árbol filogenético inferido con Máxima Verosimilitud del gen COI del ADNmt del género <i>Rhinoptera</i> . (RbVer)=Veracruz, (RbCam)=Campeche, (RbraSao)= <i>R. brasiliensis</i> GenBank, (Rjay)= <i>R. jayakari</i> GenBank, (Rbonh y Rbon)= <i>R. bonasus</i> GenBank, (RsMaz)=Mazatlán, (RsOax)=Oaxaca, (RsCh)=Chiapas, (RbCo)=Colombia y (Rjav)= <i>R. javanica</i> . Los valores son los soportes de Bootstrap calculados con 1000 réplicas.	83
Apéndice 3. Árbol filogenético de Inferencia Bayesiana del gen COI del ADNmt del género <i>Rhinoptera</i> . (RbVer)=Veracruz, (RbCam)=Campeche, (RbraSao)= <i>R. brasiliensis</i> GenBank, (Rjay)= <i>R. jayakari</i> GenBank, (Rbonh y Rbon)= <i>R. bonasus</i> GenBank, (RsMaz)=Mazatlán, (RsOax)=Oaxaca, (RsCh)=Chiapas, (RbCo)=Colombia y (Rjav)= <i>R. javanica</i> . Los valores son las probabilidades posteriores.	84
Apéndice 4. Árbol filogenético inferido con Máxima Parsimonia del gen Cit-b del ADNmt del género <i>Rhinoptera</i> . (RbCo)=Colombia, (RsMaz)=Mazatlán, (RsOax)=Oaxaca, (RsCh)=Chiapas, (Rbonh)= <i>R. bonasus</i> GenBank, (RbVer)=Veracruz, (RbCam)=Campeche. Los valores son los soportes de Bootstrap calculados con 1000 réplicas.	85
Apéndice 5. Árbol filogenético inferido con Máxima Verosimilitud del gen Cit-b del ADNmt del género <i>Rhinoptera</i> . (RbCo)=Colombia, (RsMaz)=Mazatlán, (RsOax)=Oaxaca, (RsCh)=Chiapas, (Rbonh)= <i>R. bonasus</i> GenBank, (RbVer)=Veracruz, (RbCam)=Campeche. Los valores son los soportes de Bootstrap calculados con 1000 réplicas.	86
Apéndice 6. Árbol filogenético de Inferencia Bayesiana del gen Cit-b del ADNmt del género <i>Rhinoptera</i> . (RbCo)=Colombia, (RsMaz)=Mazatlán, (RsOax)=Oaxaca, (RsCh)=Chiapas, (Rbonh)= <i>R. bonasus</i> GenBank, (RbVer)=Veracruz, (RbCam)=Campeche. Los valores son de las probabilidades posteriores.	87
Apéndice 7. Árbol filogenético inferido con Máxima Parsimonia del gen ND2 del ADNmt del género <i>Rhinoptera</i> . (RbCo)=Colombia, (Rcfbon)= <i>R. cf. bonasus</i> GenBank, (RsMaz)=Mazatlán, (RsOax)=Oaxaca, (RsCh)=Chiapas, (RbVer)=Veracruz, (RbCam)=Campeche, (Rcfst)= <i>R. cf. steindachneri</i> GenBank, (Rsth)= <i>R. steindachneri</i> GenBank, (Rjay)= <i>R. jayakari</i> GenBank, (Rjav)= <i>R. javanica</i> GenBank y (Rneg)= <i>R. neglecta</i> . Los valores son los soportes de Bootstrap calculados con 1000 réplicas.	88
Apéndice 8. Árbol filogenético inferido con Máxima Verosimilitud del gen ND2 del ADNmt del género <i>Rhinoptera</i> . (RbCo)=Colombia, (Rcfbon)= <i>R. cf. bonasus</i> GenBank, (RsMaz)=Mazatlán, (RsOax)=Oaxaca,	

<i>(RsCh)=Chiapas, (RbVer)=Veracruz, (RbCam)=Campeche, (Rcfst)=R. cf. steindachneri GenBank, (Rsth)=R. steindachneri GenBank, (Rjay)=R. jayakari GenBank, (Rjav)=R. javanica GenBank y (Rneg)=R. neglecta. Los valores son los soportes de Bootstrap calculados con 1000 réplicas.</i>	<i>89</i>
Apéndice 9. <i>Árbol de Inferencia Bayesiana del gen ND2 del ADNmt del género Rhinoptera. (RbCo)=Colombia, (Rcfbon)=R. cf. bonasus GenBank, (RsMaz)=Mazatlán, (RsOax)=Oaxaca, (RsCh)=Chiapas, (RbVer)=Veracruz, (RbCam)=Campeche, (Rcfst)=R. cf. steindachneri GenBank, (Rsth)=R. steindachneri GenBank, (Rjay)=R. jayakari GenBank, (Rjav)=R. javanica GenBank y (Rneg)=R. neglecta. Los valores son las probabilidades posteriores.</i>	<i>90</i>
Apéndice 10. <i>Árbol filogenético inferido con Máxima Parsimonia del gen RAG1 del ADNn del género Rhinoptera. (RsGenBan)=R. steindachneri GenBank, (RbVer)=Veracruz, (RbCam)=Campeche, (RbCol)=Colombia, (RbGenBan)=R. bonasus GenBank y (RsCh)=Chiapas. Los valores son los soportes de Bootstrap calculados con 1000 réplicas.</i>	<i>91</i>
Apéndice 11. <i>Árbol filogenético inferido con Máxima Verosimilitud del gen RAG1 del ADNn del género Rhinoptera. (RsGenBan)=R. steindachneri GenBank, (RbVer)=Veracruz, (RbCam)=Campeche, (RbCol)=Colombia, (RbGenBan)=R. bonasus GenBank y (RsCh)=Chiapas. Los valores son los soportes de Bootstrap calculados con 1000 réplicas.</i>	<i>91</i>
Apéndice 12. <i>Árbol de Inferencia Bayesiana del gen RAG1 del ADNn del género Rhinoptera. (RsGenBan)=R. steindachneri GenBank, (RbVer)=Veracruz, (RbCam)=Campeche, (RbCo)=Colombia, (RbGenBan)=R. bonasus GenBank y (RsCh)=Chiapas. Los valores son las probabilidades posteriores.</i>	<i>92</i>
Apéndice 13. <i>Árbol filogenético inferido con Máxima Parsimonia de los genes (Cit-b + ND2 + COI) del ADNmt del género Rhinoptera. (RbCol)=Colombia, (RbGenBan)=R. bonasus GenBank, (RsMaz)=Mazatlán, (RsCh)=Chiapas, (RstGenBan)=R. steindachneri GenBank, (RbVer)=Veracruz y (RbCam)=Campeche. Los valores son los soportes de Bootstrap calculados con 1000 réplicas.</i>	<i>92</i>
Apéndice 14. <i>Árbol filogenético inferido con Máxima Verosimilitud de los genes (Cit-b + ND2 + COI) del ADNmt del género Rhinoptera. (RbCol)=Colombia, (RbGenBan)=R. bonasus GenBank, (RsMaz)=Mazatlán, (RsCh)=Chiapas, (RstGenBan)=R. steindachneri GenBank, (RbVer)=Veracruz y (RbCam)=Campeche. Los valores son los soportes de Bootstrap calculados con 1000 réplicas</i>	<i>93</i>
Apéndice 15. <i>Árbol filogenético de Inferencia Bayesiana de los genes (Cit-b + ND2 + COI) del ADNmt del género Rhinoptera. (RbCol)=Colombia, (RbGenBan)=R. bonasus GenBank, (RsMaz)=Mazatlán, (RsCh)=Chiapas, (RstGenBan)=R. steindachneri GenBank, (RbVer)=Veracruz y (RbCam)=Campeche. Los valores son las probabilidades posteriores.</i>	<i>93</i>
Apéndice 16. <i>Estimación de los tiempos de divergencia con los intervalos superiores e inferiores al 95 % de las densidades posteriores mayores (HPD) para el género Rhinoptera del gen COI del ADNmt.</i>	<i>94</i>
Apéndice 17. <i>Valores de divergencia genética intraespecífica e interespecífica en especies de elasmobranchios, utilizando genes del ADNmt. Golfo de California (GC), Costa del Pacífico de Baja California (CPBC), Pacífico occidental y Central (POCC), Golfo de México (GM), Costa Atlántica (CA), , Pacífico oriental (PO), Caribe colombiano (Cc). Tomado y modificado de Sandoval-Castillo & Rocha-Olivares, 2011.</i>	<i>94</i>

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad existen más de 1100 especies de tiburones y rayas descritos a nivel mundial, y aún se siguen describiendo nuevas especies (Nelson, 2016; Weigmann, 2016). Los batoideos conocidos universalmente como rayas, son un grupo que incluye 630 especies reportadas, agrupadas en más de 80 géneros (Weigmann, 2016). Tienen una distribución circunglobal, abarcando desde las zonas tropicales hasta los árticos y antárticos (McEachran & de Carvalho, 2002). McEachran & Aschliman (2004) y Nelson (2016) proponen la existencia de sólo cuatro órdenes (Torpediniformes, Rajiformes, Pristiformes y Myliobatiformes),

A pesar del alto número de especies, la variación inter-específica en la morfología de algunas especies es poco conocida (Naylor *et al.*, 2005; Aschliman, 2014) lo cual ha causado problemas para discernir y determinar el estatus de las especies (Stevens *et al.*, 2000; 2007; 2008). Como consecuencia de esto, los mapas de distribución y acciones para su conservación pueden estar propensos a errores (Lynghammar *et al.*, 2013).

El género *Rhinoptera* se compone de ocho especies distribuidas en todos los mares tropicales, subtropicales y templados, excepto alrededor de las islas del Pacífico Oriental (Last & Stevens, 1994); habitan bahías, estuarios y desembocaduras de ríos (Neer & Thompson, 2005). De estas ocho especies, solo *Rhinoptera bonasus* y *R. brasiliensis* se distribuyen en el Atlántico Occidental, siendo estas morfológicamente muy similares en cambio, solo *R. steindachneri* en el Pacífico Oriental Tropical (Compagno *et al.*, 1995; Robertson & Allen, 2008). La mayor parte de los caracteres diagnósticos para la clasificación del género *Rhinoptera* se basan en el número de series o filas de las placas dentales. Debido a su gran similitud morfológica la taxonomía de este género se encuentra en duda y ha sido poco estudiado, por lo que una revisión de las relaciones filogenéticas de este género es de gran utilidad para definir el número y la distribución de las especies que lo componen (Naylor *et al.*, 2012).

El uso de técnicas moleculares, junto al uso de técnicas taxonómicas tradicionales, ha demostrado ser una herramienta muy útil en la identificación de especies de condriictios (Lim *et al.*, 2015; Acero *et al.*, 2016; Last *et al.*, 2016). Desde la incorporación de los datos moleculares a los análisis filogenéticos, ha existido un debate sobre si éstos o los morfológicos son mas adecuados para la definición de las relaciones filogenéticas de los taxones (Patterson *et al.*, 1993). De acuerdo a

Moritz & Hillis (1996) este conflicto entre los tipos de caracteres se ha exagerado puesto que el objetivo de la sistemática molecular no ha sido refutar las hipótesis filogenéticas realizadas con caracteres morfológicos, sino que los datos moleculares pueden auxiliar cuando la variación morfológica es limitada y la homología de los caracteres morfológicos no es clara. El análisis de las secuencias de los genes es una de las áreas más activas dentro de los usos de los datos moleculares en sistemática, esta estrategia ha sido ampliamente utilizada para inferir filogenias (Nei & Kumar, 2000; Wiley & Lieberman, 2011).

El ADN mitocondrial presenta toda una serie de características para ser considerado como uno de los marcadores moleculares más utilizados en sistemática molecular en general y particularmente en tiburones y rayas a diferentes niveles taxonómicos (Dunn *et al.*, 2003; Winchell *et al.*, 2004; Naylor *et al.*, 2005; Rocco *et al.*, 2007; Aschliman *et al.*, 2012; Lim *et al.*, 2015). Sin embargo, ha sido común el uso simultáneo del gen nuclear RAG 1 para resolver problemas taxonómicos y filogenias en tiburones y rayas (Maisey *et al.*, 2004; Naylor *et al.*, 2005; Vélez-Zuazo & Agnarsson, 2010; Aschliman *et al.*, 2012).

A pesar de la importancia ecológica y evolutiva, la genética de los peces cartilagosos permanece poco estudiada en la gran mayoría de los océanos del mundo. Entre los elasmobranquios, los batoides han recibido aún menos atención que sus parientes los tiburones. Sin embargo, en estos organismos algunos estudios han atribuido la existencia de diferenciación genética debido a fenómenos como la filopatría reproductiva, como es el caso de *Raja clavata* (Chevolot *et al.*, 2006) y *Pristis microdon* (Phillips *et al.*, 2011). Otros factores que han sido esgrimidos son las condiciones oceanográficas que promueven el aislamiento ecológico y la especiación críptica como en *Rhinobatos productus* (Sandoval-Castillo *et al.*, 2004) y *Dipturus batis* (Griffiths *et al.*, 2010), donde los gradientes de temperatura y límites fisiológicos térmicos afectan a su distribución geográfica.

Las barreras físicas son un importante motivo de diferenciación genética y especiación de los organismos marinos, pero no son esenciales para que estos procesos se produzcan (Avice, 2000; Bowen *et al.*, 2013; Gaither *et al.*, 2015), dada la dimensión de los océanos y de los numerosos hábitats disponibles, se cree que el aislamiento geográfico facilita la diferenciación entre poblaciones y la especiación como resultado de la interrupción del flujo genético (Mayr, 1963). Los taxones marinos separados por el Istmo de Panamá, con formación es relativamente reciente (hace ~ 3-5 millones de años), son ideales para estudiar estos procesos en los que se impide el flujo

de genes entre taxones del este del Pacífico, Atlántico occidental y Caribe (Coates & Obando, 1996; Coates *et al.*, 2004; Duncan *et al.*, 2006; Keeney & Heist, 2006).

Una de las ventajas de los datos moleculares para este tipo de trabajos, es la posibilidad de estimar las edades de divergencia entre los clados bajo el supuesto de que la evolución molecular sigue a un modelo del reloj molecular. La datación de la divergencia entre linajes permite a los investigadores inferir los efectos de alteraciones climáticas y procesos geológicos del pasado, en el patrón de especiación y en la dispersión de los organismos (Riddle *et al.*, 2008).

En el presente trabajo se plantea la revisión de las tres especies del género *Rhinoptera* distribuidas en América (Pacífico mexicano, Golfo de México y Caribe colombiano), con la intención de determinar si los análisis filogenéticos mediante el uso de marcadores moleculares de las regiones del ADN mitocondrial (ADNmt) COI, *Cit-b*, NDH2 y el ADN nuclear (ADNn) RAG 1, concuerdan con la taxonomía actualmente aceptada para este género.

II. MARCO TEORICO

2.1. Posición taxonómica y clasificación.

Los batoideos (rayas, guitarras, pez sierra, torpedos y rayas eléctricas) son el grupo más diverso de los elasmobranquios, alrededor de 630 especies agrupadas en 24 familias y 88 generos, con formas corporales modificadas y especializadas (Nelson, 2006; Ebert & Bizarro, 2007; Weigmann, 2016). Myliobatidae es una familia derivada del orden Myliobatiformes (Chondrichthyes: Batoidea), comprende tres subfamilias: Myliobatinae con más de 20 especies ("rayas águila", *Aetobatus*, *Aetomylaeus*, *Myliobatis* y *Pteromylaeus*), Rhinopterinae con al menos ocho especies ("rayas nariz de vaca", *Rhinoptera*), y Mobulinae con cerca de 11 especies (*Manta* y "rayas diablo" *Mobula*) (Aschliman, 2014).

La monofilia de los myliobatiformes (Nishida, 1990; Lovejoy, 1996; McEachran *et al.*, 1996; McEachran & Aschliman, 2004) está fuertemente apoyada por trabajos morfológicos con varias sinapomorfias incluyendo: (1) presencia de lóbulos cefálicos en posición anterior al neurocráneo, apoyados en la cintura escapular; (2) el foramen preorbital anterior se encuentra en la cara anterior de la cápsula nasal. Este agujero, a través del cual pasa el nervio oftálmico superficial, se encuentra en la parte dorsal en la mayoría de otros batoideos; (3) el margen lateral de la apófisis postorbital es alargado: se extiende ventro-lateralmente para formar una protuberancia cilíndrica; (4) las raíces de los dientes no tienen cavidades de pulpa; similar a *Dasyatis* y *Taeniura*, y es una característica que se desconoce en las raya diablo; (5) la osteodentina está muy extendida en las raíces de los dientes; también en *Dasyatis* y *Taeniura*, estado desconocido en la raya diablo; (6) los antímeros de los maxilares superior e inferior se fusionan en la sínfisis. Los antímeros de ambas mandíbulas superior e inferior se fusionan en la sínfisis en rayas bentónicas y en algunas especies de *Myliobatis*. Este carácter es responsable de la posible parafilia de *Myliobatis* sugerido por McEachran & Aschliman (2004) y Aschliman *et al.* (2012), con *M. freminville* que exhibe la condición plesiomórfica; (7) el cartílago de Meckel se engrosa en la sínfisis de todos los Myliobatidae a excepción de las rayas diablo. Este carácter es probablemente correlacionado funcionalmente con

la dentición de la trituración en los Milobátidos durófagos. Algunos autores han incluido esta dentición derivada como un segundo carácter, en el que los dientes de las mandíbulas superior e inferior están dispuestos en una superficie aplanada, similar al pavimento como en los Milobátidos durófagos; (8) el cartílago trabecular está presente en las mandíbulas y mucho más densa que en otros batoideos; (9) hay un pequeño cartílago o cartílagos (accesorio o secundario al cartílago hiomandibular), libre de ligamento, entre la hiomandíbula y el cartílago de Meckel, carácter compartido con *Urolophus*; (10) La cuarta y quinta ceratobranquial se fusionan de manera proximal; (11) está presente una aleta dorsal, las aletas dorsales están ausentes en la mayoría de los taxones de rayas a excepción de *Trogonoptera*, algunos *Gymnura* y algunos *Urolophus*. (Nishida, 1990; Lovejoy, 1996; McEachran *et al.*, 1996; Carvalho *et al.*, 2004; McEachran & Aschliman, 2004; Aschliman *et al.*, 2012; Aschliman, 2014).

Estados de caracteres de apoyo (Rhinoptera + rayas diablo)

Rhinoptera es fuertemente apoyada como grupo hermano de las rayas diablo por varios caracteres:

Los componentes dorso laterales de la cápsula nasal y los procesos de la lámina orbitonasal, forman un par de proyecciones anteriores que apoyan los lóbulos cefálicos o aletas. El proceso preorbital del neurocráneo está ausente, característica compartida con los Torpediniformes; en todos los demás Milobátidos y en *Gymnura*, algunos pectorales radiales soportados por el propterigión se expanden en sentido distal y se articula con radiales adyacentes. Las filogenias recuperadas sugieren que la ausencia de este carácter en *Rhinoptera* y rayas diablo es una inversión. (Nishida, 1990; Lovejoy, 1996; McEachran *et al.*, 1996; Carvalho *et al.*, 2004; McEachran & Aschliman, 2004; Aschliman *et al.*, 2012; Aschliman, 2014).

La subfamilia Rhinopterinae, tiene un único género con ocho especies (Compagno, 1999; 2005), Nelson (2006) lista "al menos siete" especies. Naylor *et al.* (2012) describen la dificultad en el tratamiento de las agrupaciones dentro *Rhinoptera*, pero identifican hasta ocho especies potenciales;

Taxonómicamente las especies del presente estudio se encuentran clasificadas de la siguiente manera:

Orden Myliobatiformes

Familia Myliobatidae

SubFamilia Rhinopterinae

Género *Rhinoptera*

Rhinoptera adpersa J. P. Müller & Henle, 1841

Rhinoptera bonasus (Mitchill, 1815)

Rhinoptera brasiliensis J. P. Müller, 1836

Rhinoptera javanica J. P. Müller & Henle, 1841

Rhinoptera jayakari Boulenger, 1895

Rhinoptera marginata (É. Geoffro & Saint-Hilaire, 1817)

Rhinoptera neglecta J. D. Ogilby, 1912

Rhinoptera steindachneri Evermann & O. P. Jenkins, 1891

2.2. Morfología

Los batoideos se caracterizan por presentar un cuerpo dorsoventralmente aplanado y se diferencian de otros elasmobranquios por la carencia de una aleta anal, aletas pectorales unidas con la cabeza y el tronco para formar un disco, cinco aberturas branquiales ventrales donde también se localiza la boca y los orificios nasales o narinas, los ojos y espiráculos se encuentran bien desarrollados y están situados generalmente en la superficie dorsal de la cabeza en especies bentónicas demersales o laterales en especies pelágicas, la cola es moderadamente delgada, claramente diferenciada del cuerpo y su longitud es variable alcanzando en ocasiones el doble del ancho del disco (Bigelow & Schroeder, 1953; Kent & Carr, 2001). Las especies de la subfamilia Rhinopterinae pueden alcanzar dos metros de Ancho de Disco (AD) y es claramente más ancho que largo y con forma de diamante. Tienen cabeza que claramente sobresale del disco (Figura 1a). Los ojos y los espiráculos están ubicados a los lados de la cabeza. El lóbulo subrostral está profundamente escotado en su borde anterior, la boca es casi transversal (Figura 1b); su coloración es café-parda en la parte dorsal y vientre blanquecino (McEachran & de Carvalho, 2002).

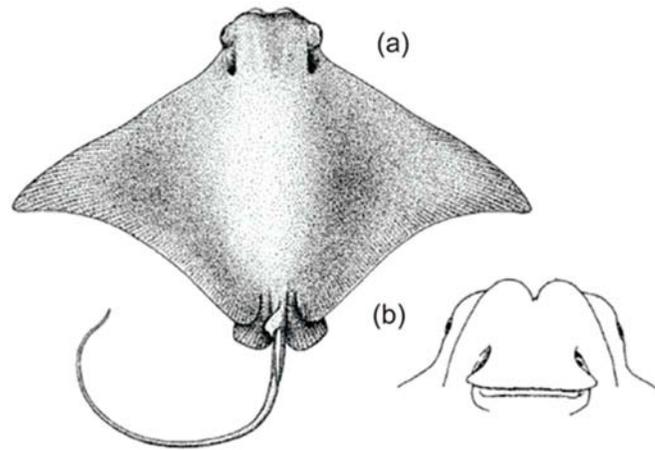


Figura 1. Género *Rhinoptera*; a) Vista dorsal, b) vista ventral de lóbulos cefálicos. Tomado de Compagno *et al.* (1995).

Los dientes consisten en placas planas dispuestas en seis a nueve hileras, formando la placa dental en cada mandíbula, siendo la hilera media más grande (McEachran & de Carvalho, 2002; Robertson & Allen, 2008). En los machos de *R. steindacheri* este número varió de cinco a nueve hileras dentales y en las hembras de siete a diez hileras (Navarro, 2011). *Rhinoptera bonasus* presenta siete hileras dentales (McEachran & de Carvalho, 2002) y *R. brasiliensis*, con nueve hileras dentales (Bigelow & Schroeder, 1953). Sin embargo, la validez de esta especie estuvo en duda por Compagno (1999). No obstante, Menni & Stehmann (2000) revalidaron su existencia, basados en la presencia de individuos con esa característica dental entre Río de Janeiro y Río Grande del Sur.

2.2.1. Controversias taxonómicas en *Rhinoptera*

Con relación a la morfología externa, *R. brasiliensis* se asemeja mucho a *R. bonasus*, siendo diferenciadas principalmente por el número de filas de la placa dental. *Rhinoptera brasiliensis* tiene nueve series de placas dentales con tres hileras centrales grandes, mientras que *R. bonasus* presenta siete series de placas dentales y sólo una fila central (Figura 2). De acuerdo a los datos enumerados por Bigelow & Schroeder (1953), *R. brasiliensis* a diferencia de *R. bonasus* en la placa dental, tiene una boca más amplia, mayor distancia entre las fosas nasales y entre los espiráculos que *R. bonasus*.

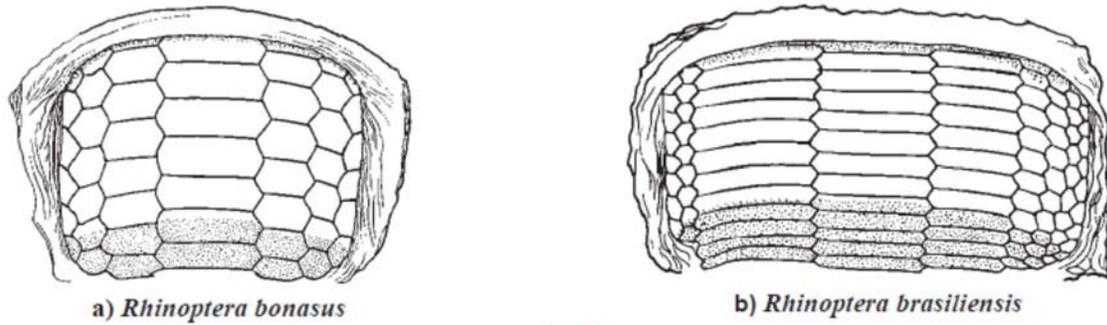


Figura 2. Características de las placas dentales entre *Rhinoptera bonasus* y *R. brasiliensis*. Tomado de McEachran & de Carvalho (2002).

También se ha confirmado la distinción taxonómica entre estas dos especies en las costas de Brasil, donde estas dos especies son simpátricas, comparando la anatomía de la escápula coracoides y del cartílago sinarcual cervicotorácica (Afonso & Gallo, 2001), y anatomía del condro neurocráneo (Gallo-da-Silva *et al.*, 1997).

2.3. Distribución y hábitos migratorios

Las rayas de este género, son bento-pelágicas y son conocidas por sus migraciones a diferentes partes del océano, por eso se conocen como oceanódromas. Los entornos en los que se encuentran son hábitats salobres en salinidades que van desde 17 hasta 37 ppt (Neer *et al.*, 2007) y se asocia positivamente con los hábitats hipóxicos (1-2 mg/L) (Craig *et al.*, 2010). Se encuentran a profundidades de hasta 72 pies (22 m), son gregarios y pasan la mayor parte del tiempo en la superficie del agua, lo que las hace fáciles de detectar (Blaylock, 1989; 1993).

En cuanto a su distribución según Menni & Stehmann (2000), *Rhinoptera brasiliensis* es una especie endémica y restringida a la zona del Atlántico Sudoccidental en la plataforma continental de Brasil, entre Río de Janeiro y Río Grande del Sur (Figura 3). Sin embargo, McEachran & de Carvalho (2002) basándose en las nueve series de placas dentales, documentaron que también ha sido registrada en Carolina del Norte; Acero & Garzón (1982) lo registraron en las costas del Caribe colombiano en Isla Salamanca, Magdalena; Castro-Aguirre & Espinosa-Perez (1996) al sur oeste del Golfo de México en Tuxpan, Veracruz y Lasso-Alcalá *et al.* (2004) en las costas de Venezuela en el delta del río Orinoco, mientras que *R. bonasus* presenta una mayor distribución, encontrándose a lo largo de la plataforma continental, desde Nueva Inglaterra hasta el sur de Brasil (Neer &

Thompson, 2005), incluyendo las aguas costeras del Golfo de México, Trinidad y Tobago, Venezuela y algunas partes del Caribe (Figura 3). El límite exacto de la distribución de esta especie en Brasil es incierto debido a la confusión con *R. brasiliensis* por tener características morfológicas muy similares y se encuentra en simpatria con *R. bonasus* entre Río de Janeiro y Santa Catarina (Menni & Stehmann, 2000).

Rhinoptera steindachneri es la única especie que se distribuye en el Pacífico Oriental Tropical y se distribuye desde las costas del Golfo de California en México hasta Perú, incluyendo las islas Galápagos (Bizzarro *et al.*, 2007) (Figura 3). Generalmente se encuentra asociada al bentos sobre sustratos blandos y algunas veces en arrecifes de coral (Santana-Morales *et al.*, 2004; Bizarro *et al.*, 2007). Al igual que otras *Rhinoptera*, realizan extensas migraciones en el este del Pacífico Norte (Schwartz, 1990; McEachran & Notarbartolo di Sciara, 1995), moviéndose hacia el norte a principios de primavera y hacia el sur en otoño, principalmente en respuesta a las diferencias en la temperatura del agua (Smith & Merriner, 1987; Blaylock, 1993).

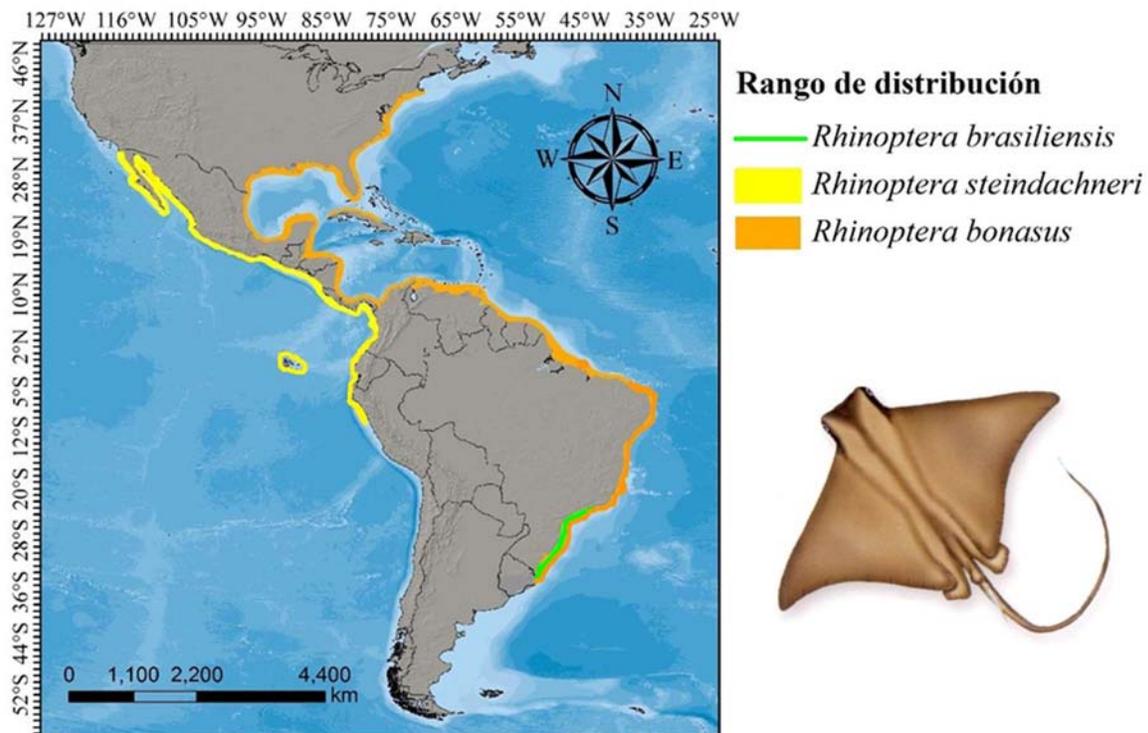


Figura 3. Distribución de las rayas del género *Rhinoptera* en América.

2.4. Aspectos biológicos del género *Rhinoptera*

Las rayas de este género, presentan dimorfismo sexual, siendo las hembras más grandes que los machos. Las hembras tienen un par de ovarios y úteros, en la mayoría de los casos el ovario y útero izquierdo se desarrolla por completo en la madurez sexual, siendo el único funcional, encontrando el ovario y útero derecho de tamaño reducido (Fisher, 2010; Palacios-Barreto & Ramírez-Hernández, 2010). En los machos, los testículos son pareados y juntos son funcionales, aunque el izquierdo es de mayor tamaño que el derecho (Fisher, 2010). La gestación de los individuos es de 11-12 meses y la fecundación es interna (Smith & Merriner, 1986; Neer & Thompson, 2005).

Presentan viviparidad aplacentaria con trofonemata uterina, las cuales son microvelocidades vascularizadas, del Griego trophē - nutrimento, alimento; nēmat- hilos, filamentos que secretan nutrientes histotróficos o “leche uterina”, la cual es ingerida por el embrión o por los filamentos branquiales externos de los embriones (Wourms, 1981; McEachran & di Sciara, 1995; Hamlett *et al.*, 1996). Los embriones inicialmente dependen del vitelo cuyos precursores son sintetizados en el hígado materno y transportados por la circulación sistémica de las células foliculares del ovario y de ahí al huevo hasta que se agotan (Hamlett *et al.*, 1996).

2.5. Importancia pesquera

Las rayas, al igual que los tiburones, son particularmente vulnerables a la sobreexplotación pesquera debido a su estrategia de ciclo de vida “k”, caracterizadas por presentar crecimiento lento, madurez sexual tardía, largo ciclo de vida y baja fecundidad (Musick *et al.*, 2000; Stevens *et al.*, 2000; Dulvy & Reynolds, 2002; Frisk *et al.*, 2002). La combinación de estos factores lleva a que las poblaciones naturales impactadas fuertemente por la pesca, presenten un repoblamiento lento y se requiera muchos años para su eventual recuperación (Casey & Myers, 1998; Stevens *et al.*, 2000).

En México, la pesca de rayas representan alrededor del 30 % de la producción total nacional, siendo frecuentes en las capturas representantes las familias Rhinobatidae, Dasyatidae, Gymnuridae y Myliobatidae (DOF, 2010). En el estado de Sonora (México), las rayas representan el 63.4 % del total de capturas artesanales de condriictios (Bizarro *et al.*, 2009).

Aunque en la mayoría de los estudios de la pesca artesanal de elasmobranquios en México se han centrado en los tiburones, por ejemplo, Applegate *et al.* (1993); Villavicencio-Garayzar, (1996); Castillo-Geniz *et al.* (1998), Márquez-Farías (2002, 2005) informó sobre la importancia de los desembarques de rayas en Sonora y la Península de Baja California, donde los Batoideos son un componente común de las pesquerías artesanales de elasmobranquios. Así mismo, Bizarro *et al.* (2007) reportan que en las pesquerías de Baja California y Sonora, la gran mayoría son Batoideos. Este grupo fue particularmente dominante en los desembarques de verano y también mayor abundantes que los tiburones durante la primavera. En Campeche, la producción de rayas (1186 t) fue similar a la producción de tiburón (1023 t) en el periodo de 1997-2008; pero en el periodo 2004-2008 la producción de rayas (1082 t) fue el doble de la producción de tiburones (618 t) (Pérez-Jiménez, 2011). Esta importancia de los desembarques de Batoideos, sugiere que se ha producido una importante expansión de la pesquería dirigida a las rayas, posiblemente motivada por una reducción de los desembarques de tiburones y especies de teleósteos tradicionalmente capturados (Bizarro *et al.*, 2007; Pérez-Jiménez, 2011).

Para el Caribe colombiano antecedentes de pesca muestran que en rayas los datos de captura en los boletines estadísticos registrados a nivel nacional (INDERENA, INPA, INCODER) indican que tan solo en los periodos de 1991, 1992 y 1995 al 2000, la producción anual promedio fue de 17.6 t, dentro de un intervalo de 0.01 a 60.9 t entre dichos años (Caldas *et al.*, 2009). Correa & Manjarrés (2004) indicaron que el análisis histórico de los desembarcos refleja un decrecimiento considerable en la composición por especie y muestran algunos cambios significativos respecto a lo observado en evaluaciones previas siendo una de las diferencias más destacadas la ausencia en la evaluación del 2000 de los denominados chuchos (*R. bonasus* y *A. narinari*) en el listado de principales especies desembarcadas en la costa Guajira, contrario a lo que sucedió en la evaluación de 1988, donde aportaron un total de 115 t al desembarco total en dicho año.

Respecto a *R. bonasus*, debido a que se alimentan de la fauna bentónica y están implicados con frecuencia en la reducción de los mariscos comerciales a lo largo de la costa atlántica de Estados Unidos, son considerados como una plaga (Smith & Merriner, 1985; Blaylock, 1992; Peterson *et al.*, 2001; Myers *et al.*, 2007; Collins *et al.*, 2008). La preocupación por el impacto de esta especie sobre la pesca de mariscos comerciales y pastos marinos se ha visto acrecentada por las sugerencias de que la población de esta especie ha aumentado significativamente en las últimas décadas, lo que ha motivado el establecimiento de una pesquería dirigida a la especie (Schwartz, 1990; Myers *et al.*, 2007). Datos de pesca de redes de enmalle dentro de aguas estuarinas de Carolina del Norte,

indican que la captura por unidad de esfuerzo (CPUE) de *R. bonasus* aumenta durante la primavera y finales de verano/comienzos de otoño (Powers & Gaskill, 2005; NCDMF, 2007).

En México, en la costa de Campeche se presenta en grandes agregaciones y aunque es poco utilizada para consumo humano, llega a ser capturada en grandes cantidades de manera incidental por pescadores que dirigen su esfuerzo sobre *Aetobatus narinari*, mismas que se consumen frescas o seco-saladas (Pérez-Jiménez, 2011). En relación a *R. steindachneri*, Villavicencio-Garayzar (1995) informó que ésta era la sexta especie de rayas más abundante (3,9 %) desembarcada entre julio y octubre en Puerto Viejo, Bahía Almejas (Baja California Sur). Márquez-Farías (2002) proporcionó la primera información detallada sobre las operaciones y actividades específicas para la pesquería artesanal de rayas en el Golfo de California y demostró la importancia en Sonora como principal captura de Batoideos a lo largo de la costa del Pacífico de México, siendo *R. steindachneri* la tercera especie más capturada. Bizarro *et al.* (2007) indican que los batoideos son un componente principal de los desembarques a lo largo del Golfo de California y de Bahía Almejas, donde *R. steindachneri* constituye una parte sustancial con el 11,4 % del total de capturas de elasmobranquios en esta región, especialmente durante los meses de verano, y puede ser comúnmente capturada incidentalmente por los arrastres camareros.

2.6. Genética en Batoideos

Los marcadores moleculares han demostrado ser muy útiles para determinar las relaciones filogenéticas entre las especies de elasmobranquios (Dunn & Morrissey, 1995; Kitamura *et al.*, 1996; Naylor *et al.*, 1997). Los genes mitocondriales son valiosos debido al número de caracteres que proveen para inferir relaciones filogenéticas en elasmobranquios. Tal es el caso del Citocromo b (Cit-b), el cual ha sido informativo para definir las interrelaciones entre Carcharhiniformes y Lamniformes (Martin & Naylor, 1997; Martin *et al.*, 1992; Naylor *et al.*, 1997). De la misma forma, el Nicotinamida adenina dinucleótido deshidrogenasa subunidad 2 (NADH2) ha sido útil en la resolución de las relaciones entre las familias de los Lamniformes (Naylor *et al.*, 1997). El gen del ARN ribosómico subunidad 12S (12S ARNr) fue útil para una variedad de niveles taxonómicos y fue empleado para inferir afinidades filogenéticas del tiburón *Megachasma pelagios* (Morrissey *et al.*, 1997) y las relaciones entre los principales linajes de elasmobranquios (Dunn & Morrissey, 1995). En relación a los genes nucleares, el gen activador de recombinación 1 (RAG-1) con 2499 pb se ha utilizado para inferir la filogenia molecular de condriactios (Maisey *et al.*, 2004; Naylor *et al.*, 2005; Vélez-Zuazo & Agnarsson, 2010).

Respecto de las rayas, Lovejoy *et al.* (1998) con un fragmento del Cit-b, evaluaron las relaciones filogenéticas de diez especies de las rayas Potamotrygonidae de los ríos de América del Sur, incluyendo la raya marina del género *Himantura*, sugirieron que estas se originaron en el Mioceno temprano durante la última incursión marina hacia el Amazonia superior hace 15-23 millones de años atrás. Con el tiempo, los batoideos han sido incluidos en varias investigaciones de inferencia filogenética de vertebrados usando genomas mitocondriales completos (Lim *et al.*, 2015; Poortvliet *et al.*, 2015)

Existe un interés creciente en la evolución de batoideos, con una filogenia bien soportada necesaria para la correcta interpretación de los estudios comparativos de las estrategias de historia de vida (Dulvy & Reynolds, 1997), la locomoción (Rosenberger, 2001), la estructura condro esquelética (Schaefer & Summers, 2005), de conducta (Lisney *et al.*, 2008) y sistemas sensoriales (McComb & Kajiura, 2008). Rocco *et al.* (2007) usando genes de ARN ribosómicos subunidades (16S y 18S) de 15 especies, incluyendo dos milobátidos, recuperaron el apoyo ambiguo para la monofilia de la familia Myliobatidae. Aschliman (2011) intentó generar una filogenia de batoideos mediante la secuenciación de un mayor número de taxones (87 especies de más de 50 géneros) con ayuda de las secuencias Nicotinamida adenina dinucleótido deshidrogenasa subunidad 2 y 4 (NADH2 y NADH4), RAG-1, Dominio de la familia sec 1 con adición de 2 (SCFD2); 3269 pb en total). Luego Aschliman *et al.* (2012) trabajaron en una filogenia con los principales grupos de batoideos existentes, en este estudio se secuenció 14.004 pb del genoma mitocondrial y dos marcadores nucleares (RAG1 y SCFD2) para 37 taxones, lo que presentó un muestreo denso en la filogenia del grupo (17/17 familias sensu Nelson, 2006; 22/23 familias sensu Compagno, 2005).

Los intentos de construir una filogenia en el grupo de los batoideos se han orientado a estudiarla en diferentes niveles; (1) filogenias de nivel superior utilizando morfología y/o los datos fósiles; (2) filogenias más finas centrándose en las interrelaciones dentro de un orden o de la familia, también basados en datos morfológicos; y (3) análisis moleculares, que abordan generalmente la filogenia de nivel superior. Uno de ellos se refiere sólo a las relaciones filogenéticas entre los principales linajes de los myliobatoideos, incluyendo una especie para cada una de las cuatro órdenes de los batoideos restantes (Dunn *et al.*, 2003). Poortvliet *et al.* (2015) con el uso del genoma mitocondrial y dos nucleares ayudaron a reconstruir las relaciones evolutivas entre los mobulidos, confirmando al género *Mobula* parafilético de acuerdo con estudios previos basados en datos moleculares (Naylor *et al.*, 2012; Aschliman *et al.*, 2012).

Gran parte del reciente esfuerzo en la sistemática molecular de los batoideos ha sido realizado por el Consorcio para el Código de Barras de la Vida (www.barcodeoflife.org). Los códigos de barras de ADN fueron desarrollados como un sistema para delimitar e identificar especies que pueden ser difíciles de distinguir por la morfología. Típicamente implica la secuenciación de un fragmento corto del gen mitocondrial Citocromo oxidasa subunidad I (COI) (Hebert *et al.*, 2003). Se está empleando cada vez más códigos de barras para identificar los peces (Ward *et al.*, 2005, 2008, 2009; Bineesh *et al.*, 2016), incluyendo especies de batoideos previamente no reconocidos (Yearsley *et al.*, 2008, Holmes *et al.*, 2009; Cerutti-Pereyra *et al.*, 2012; Berthe *et al.*, 2016).

III. ANTECEDENTES

3.1. Evidencias en la filogenia de Myliobatidae

Los estudios basados en la evidencia morfológica han usado la superposición de conjuntos de caracteres desde el mismo subconjunto y un número limitado de taxones, produciendo sólo una débil evidencia de apoyo a *Gymnura* como hermana de Myliobatidae (Aschliman, 2014). Esta limitación en el número de especies se debe en gran parte a la dificultad en la revisión física de muchos miembros de la familia, que tienden a ser grandes y pelágicos; incluso partes del animal tienden a ser demasiado grandes para ser estudiados con ciertas técnicas de estudios morfológicos (Summers, 2000), lo que ha conducido a una larga historia de confusión taxonómica (Marshall *et al.*, 2009).

McEachran & Aschliman (2004) y Aschliman *et al.* (2012) realizaron una revisión exhaustiva y se admite a Myliobatidae como un grupo monofilético por cinco caracteres, tres de ellos están relacionados con el modo de alimentación y otros dos de carácter muscular. Representan a *Myliobatis* como dos unidades taxonómicas separadas a fin de reflejar el polimorfismo dentro del género, con *Myliobatis freminvillei* como especie hermana (*M. longirostris* + todos los demás Myliobatidos incluidos). *M. freminvillei* quedó hermana de las demás *Milobátidos* porque los antímeros de sus mandíbulas no se fusionan en la sínfisis, condición presente en el grupo externo, un consenso general de sus filogenias estimadas se resume en la figura 4a.

Sólo un trabajo basado en morfología recuperó una filogenia sustancialmente diferente, González-Isáis & Domínguez (2004), examinaron diez especies de los cinco géneros de Myliobatidae, además de dos *Gimnúridos* obteniendo una filogenia que identifica a las rayas diablo como hermana de los demás *Milobátidos*. *Rhinoptera* se presenta como hermana de (*Myliobatis* + *Aetobatus*) en lugar de ser hermana de las rayas diablo (*Mobula* + *Manta*) (Figura 4b).

Aschliman (2011) generó una filogenia con cuatro genes (NADH2, NADH4, RAG-1, SCFD2; 3269 pb en total), el conjunto de datos incluyó representantes de *Aetobatus* (una especie), *Aetomylaeus* (tres), *Manta* (uno), *Mobula* (dos), *Myliobatis* (tres), *Pteromylaeus* (uno) y *Rhinoptera* (uno), además de *Gymnura* (tres), indicando que Myliobatidae es monofilético y que *Rhinoptera* es hermana con *Mobula*. *Gymnura* no fue recuperada como hermana de Myliobatidae, sino más bien como hermana de *Urolophus*. Un árbol basado en el consenso general de este estudio molecular se presenta en la Figura 4c.

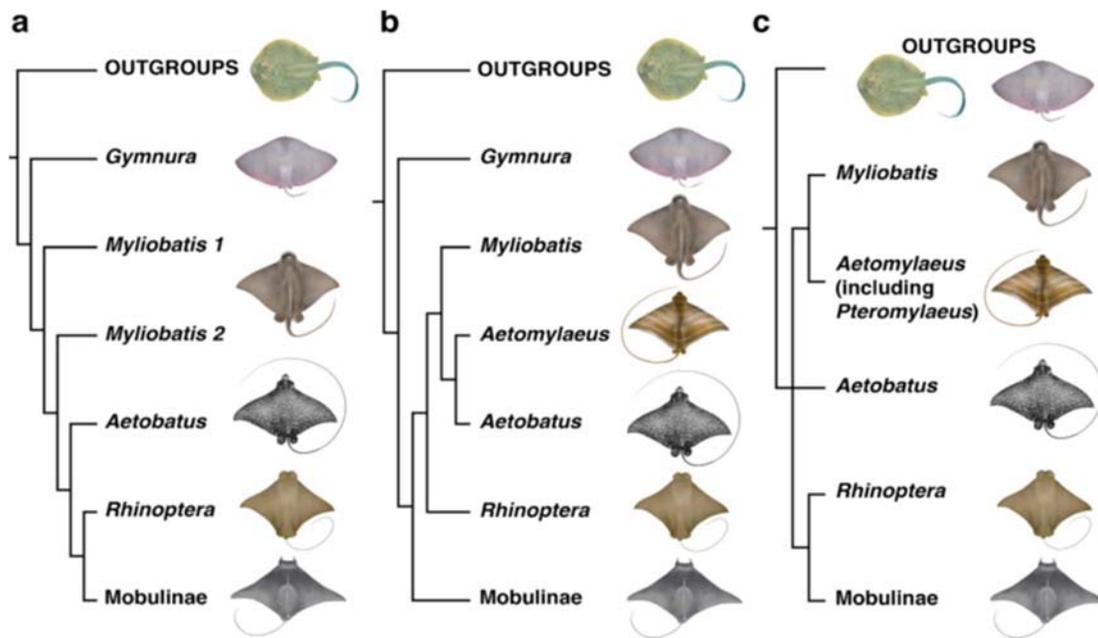


Figura 4. Representación de la mayoría de las filogenias en la familia Myliobatidae a) datos morfológicos, McEachran & Aschliman (2004); b) datos morfológicos, González-Isáis & Domínguez (2004); c) datos moleculares de Aschliman (2011). Tomado de Aschliman (2014).

3.2. Origen y diversificación de Myliobatidae, evidencia fósil.

El registro fósil en Myliobatidae es extenso, con más de 150 taxones fósiles asignados a la familia (Cappetta, 1987; Claeson *et al.*, 2010). La mayoría de los taxones extintos son conocidos a partir de elementos dentales, en particular, las placas dentales grandes y calcificadas de los durófagos ya que estos tienden a fosilizarse bien. Los primeros fósiles asignados de forma fiable a Myliobatidae son del Cretácico superior, encontrándose de forma abundante en el Terciario y algunos fósiles asignados a un género común existente en el Eoceno (Maisey, 1984; Kriwet & Benton, 2004; Underwood, 2006).

Los restos fósiles con morfología de los dientes muestran linajes *mobúlidos* intermedios entre durófagos (trituration de conchas) y los *mobúlidos* no durófagos datan del Paleoceno tardío al Eoceno temprano (58.7 a 47.8 millones de años, Ma) (Adnet *et al.*, 2012). Datos fósiles, morfológicos y moleculares, apoyan la hipótesis de que los *mobúlidos* son uno de los grupos más relacionados con las *Rhinopteras* (Nishida, 1990; Lovejoy, 1996; McEachran *et al.*, 1996; Shirai, 1996; Dunn *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2004; de McEachran & Aschliman, 2004; Claeson *et al.*, 2010; Aschliman *et al.*, 2012; Naylor *et al.*, 2012).

Adnet *et al.* (2012) recuperaron a † *Brachyrhizodus* como un *milobátido* en lugar de como hermano de rayas diablo (Claeson *et al.*, 2010), † *Burnhamia* indicó que era un vástago a los *mobúlidos*, por la pérdida de la dentición tipo pavimento formado por el empalme de los dientes, un aumento en el número de dientes y un aplanamiento en la cara oclusal de la corona del diente; la transición de durófago a planctívoro represento un proceso gradual, con un cambio de placas para triturar, a placas de bandas largas de dientes homodontos evidentes por lo menos en el Oligoceno tardío en † *Mobula fragilis* (Adnet *et al.*, 2012).

Aschliman *et al.* (2012) estimaron los tiempos de divergencia de los Batoidea en su filogenia molecular, sin embargo, se incluyeron sólo cuatro Milobatoideos en el estudio; los autores emplearon un conjunto de nueve fósiles para la calibración. † *Igdabatis*, se utilizó para limitar el tiempo de divergencia entre *Rhinoptera* y *Aetobatus* (Claeson *et al.*, 2010). Aschliman *et al.* (2012) estimaron que Myliobatidae comenzó a divergir en el Cretácico (aprox. 75 - 66 Ma), mientras que, *Rhinoptera* divergió de *Mobula* aproximadamente entre 15 y 35 Ma, mientras que la topología

alternativa de Claeson *et al.* (2010), en la cual † *Brachyrhizodus* es hermana a las rayas diablo en vez de un *Milobátido*, lo que implica en cambio que esta división se produjo en algún momento en el Cretácico tardío.

Adnet *et al.* (2012) estimaron que la divergencia entre estos dos linajes (*Rhinopteras/Mobúlidos*) fue aproximadamente hace 50 Ma, basado en los dientes del fósil *Mobúlido* más antiguo † *Burnhamia* (59.2 a 47.8 Ma) (Pfeil, 1981; Cappetta, 1985; Woodward, 1889) y en la primera aparición de *Rhinopteras* fósiles. † *Burnhamia*, es uno de los varios géneros extintos que han sido comparados o afiliados a *Mobúlidos*, basado en la morfología de los dientes; sin embargo, todavía se debaten las posiciones taxonómicas de estos géneros. Los fósiles de † *Burnhamia*, que incluyen tres especies extintas, se colocaron originalmente en el género *Rhinoptera* (Woodward, 1889) pero más tarde se atribuyen a un nuevo género entre *Mobúlidos*, basados en una aparente ausencia de signos de estrés biomecánico en los dientes, como se ve en los dientes de los mobúlidos modernos filtradores (Cappetta, 1975) (Figura 5).

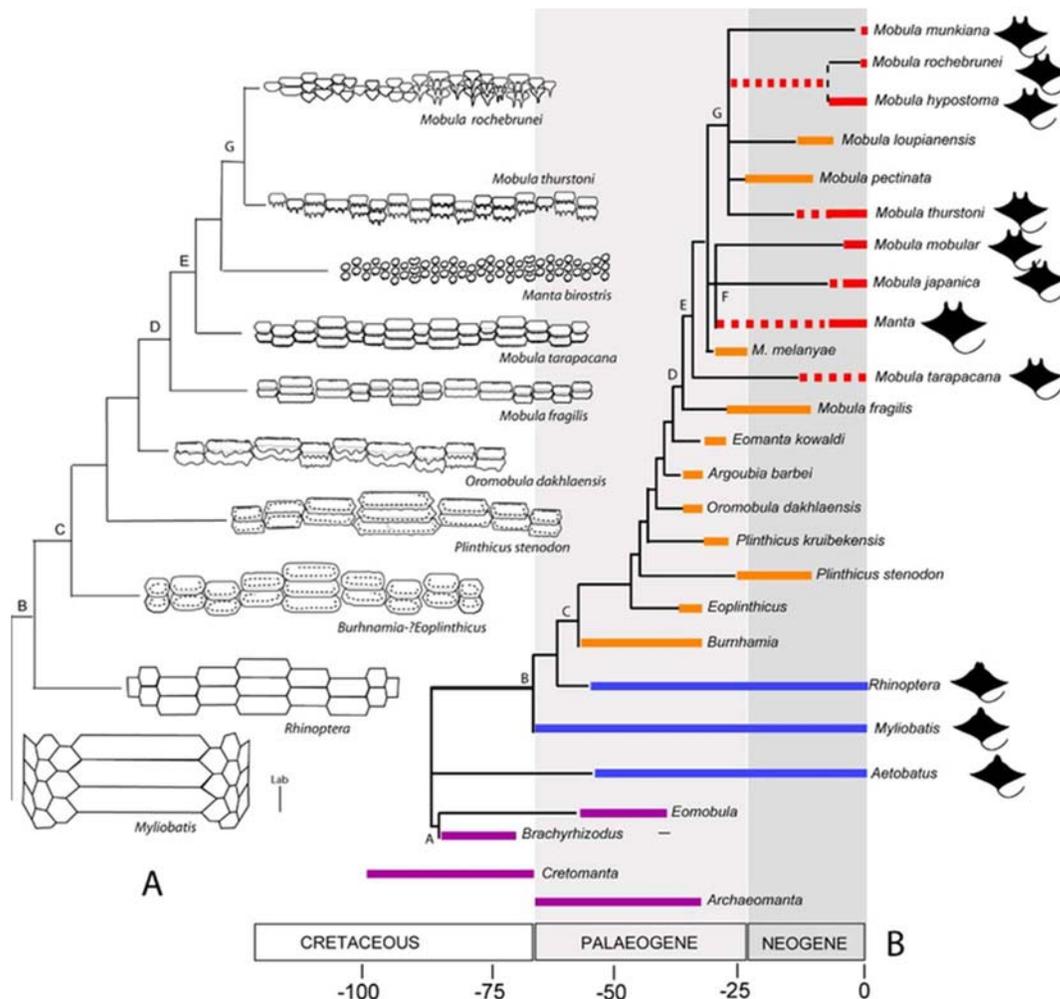


Figura 5. A: Evolución probable de la mandíbula dentada en Mobúlidos, en comparación con los grupos hermanos Myliobatinae (milobátidos) y Rhinopterinae (*Rhinopteras*). A excepción de los taxones vivos, la disposición de los dientes y el número de caracteres fueron reconstruidos artificialmente con base a la morfología de los dientes y las relaciones filogenéticas realizadas en los dientes aislados. B, Las relaciones filogenéticas, ocurrencias estratigráficas están representadas como barras verticales; línea discontinua son registros inciertos. Tomada de Adnet *et al.* (2012).

Poortvliet *et al.* (2015), estimaron la divergencia de *Myliobatis californica* y *Rhinoptera steindachneri* en ~48 Ma, que está de acuerdo con la aparición de las primeras *Rhinopteras* fósiles entre 56,0 y 33,9 Ma (Cappetta, 1987; 2006), la estimación de la posterior divergencia entre *Rhinoptera* y el linaje de *Mobúlidos* (34,88 a 25,33 Ma) se superpone con una estimación basada en el genoma mitocondrial combinada con puntos de calibración fósil externos al clado *Mobula* realizada por Aschliman *et al.* (2012) (29,9 a 22,6 Ma). Sin embargo, su estimación fue considerada por Aschliman (2014) demasiado reciente y estar más acorde con las estimaciones de Adnet *et al.* (2012).

3.3. Datos biológico-reproductivos.

3.3.1. *Rhinoptera bonasus*

Smith & Merriner (1986) realizaron observaciones sobre la biología reproductiva de esta especie en la Bahía de Chesapeake, Carolina del Norte, indicando tallas de madurez sexual para machos y hembras. Neer & Thompson (2005) estimaron la edad y crecimiento, talla de madurez y fecundidad en el Norte del Golfo de México, determinando que alcanzan la madurez con tallas pequeñas y a edad más temprana que las especies del oeste del océano Atlántico, observándose aparentes diferencias regionales en esta variable reproductiva (Tabla 1). Estos estudios sugieren que las poblaciones de esta especie en el Atlántico y el Golfo de México tienen diferentes historias de vida. En el verano esta raya es residente temporal en la Bahía de Chesapeake, en mayo migran dentro del estuario a tener las crías y posteriormente aparearse. A finales de septiembre, migran al sur a las zonas de invernada, principalmente en la costa Atlántica de Florida (Grusha, 2005).

Para la zona del sureste del Golfo de México, Pérez-Jiménez (2011) estimó parámetros reproductivos con 192 organismos, confirmando longitud de madurez diferente entre el sureste y el norte del Golfo de México y al parecer también el ciclo reproductivo entre las poblaciones del sureste del Golfo de México (bienal) y el Atlántico noroeste (anual). Para el Caribe colombiano, en

la península de La Guajira, Palacios-Barreto & Ramírez-Hernández (2010) registran diferencias en el número de embriones, reportando la existencia de tres en lugar de uno (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación de las variables reproductivas de *Rhinoptera bonasus* en distintas regiones. Ancho de Disco = AD. Para el alumbramiento y la ovulación: P = principios, M = mediados y F = finales. Tomado y modificado de Pérez-Jiménez (2011).

Variable	Atlántico Noroeste (Smith & Merriner, 1986)	Norte del Golfo de México (Neer & Thompson, 2005)	Sureste del Golfo de México (Pérez-Jiménez, 2011)	Caribe colombiano (Palacios & Ramirez, 2010)
AD 50% de machos (cm)	80 - 84	64.2	76.4	67.82
AD 50% de hembras (cm)	85 - 90	65.3	89.1	76.32
Hembra grávida de menor tamaño (cm)	87	76	88	85
Gestación (meses)	11 - 12	11 - 12	12	
Gestación y vitelogénesis	Concurrentes		Consecutivos	
Ciclo reproductivo	Anual		Bienal	
Alumbramiento	F junio-P julio	M abril-M mayo	M marzo-M junio	
Ovulación	F junio-P julio		M marzo-M junio	
Longitud de nacimiento (AD, cm)	32.3 - 43	33.6 - 39.5	37.5 - 43	32 - 37
Fecundidad	1	1	1	3

3.3.2. *Rhinoptera brasiliensis*

Las tallas de capturadas de esta especie cerca de la playa en Rio Grande do Sul, en el verano de 1982 a 1985 oscilaron entre 78 - 91 cm de Ancho de Disco (AD) en los machos y de 77 - 102 cm de AD en las hembras, registrando una hembra grávida de 102 cm de AD. No hay registros de capturas de los recién nacidos fuera de Rio Grande do Sul, por lo tanto, el nacimiento puede tener lugar más al norte. El tamaño al nacer es de aproximadamente 43 a 48 cm de AD (Bigelow & Schroeder, 1953; Smith & Merriner, 1986), siendo más grande que la de *R. bonasus*. Las hembras grávidas contenían un único embrión, como también se ha observado en *R. bonasus* (Smith & Merriner, 1986; Neer & Thompson, 2005; Pérez-Jiménez, 2011). En la costa de Rio Grande do Sul la especie está presente sólo durante el verano, en aguas costeras poco profundas sobre fondo de arena suave, a profundidades inferiores a 10 metros y de forma esporádica entre 10 a 20 m (Vooren, 1997). La temperatura inferior a esas profundidades es de aproximadamente 22 °C en enero y disminuye a cerca de 13 °C en agosto (Haimovici *et al.*, 1996). La migración de verano de la especie puede estar relacionada con este ciclo estacional de la temperatura.

3.3.3. *Rhinoptera steindachneri*

La madurez sexual de esta especie ocurre entre los 60 a 76 cm de AD, periodo donde se alcanza el desarrollo de mixopterigios en machos (n = 333) y ovarios en hembras (n = 245), la hembra grávida de menor tamaño midió 68 cm de AD, siendo la mediana en 70.2 cm de AD y 69.9 cm de AD para los machos. La fecundidad fue una cría por hembra para todas las hembras grávidas registradas (Sonora: 147 individuos; Bahía Almejas: 2 individuos) (Bizarro *et al.*, 2007). El periodo de gestación de sus crías es de 11 a 12 meses, presentando neonatos de 38 a 45 cm de AD (Villavicencio-Garayzar, 1995). Las hembras grávidas se registraron en Sonora durante todas las estaciones del año, con la mayor proporción observada durante la primavera (60.5%, n = 89) y el menor en verano (1.4 %, n = 2). La media del AD en embriones aumentó de abril (26.3 cm) a mayo (30.4 cm) a junio (38.8 cm) durante 1999 y 2000, sin observarse embriones durante julio o agosto (Bizarro *et al.*, 2007).

3.4. Estudios genéticos del género *Rhinoptera*

Naylor *et al.* (2012), trabajaron con 52 ejemplares de *Rhinoptera* determinando que las identidades de la mayoría de estos especímenes son difíciles de determinar ya sea con criterios morfológicos o moleculares, debido a que la taxonomía del género sigue siendo poco conocida. El análisis de este trabajo arrojó un grupo compuesto por ejemplares del Golfo de California (*R. steindachneri*), siete ejemplares del Golfo de México y uno de Carolina del Norte, identificados originalmente como *R. bonasus*. Sin embargo, la configuración de las placas de los dientes de los ejemplares del Golfo de México y Carolina del Norte se parecen a los de *R. brasiliensis*. Desafortunadamente, no tenían muestras confirmadas del Atlántico Sudoccidental de *R. brasiliensis* por lo que no fueron incluidos en el análisis, siendo así conservada la denominación de *Rhinoptera steindachneri* a los individuos del Golfo de California y se adoptó *Rhinoptera cf. steindachneri* para los individuos del Golfo de México y Carolina del Norte (Figura 6). En el mapa de haplotipos (Figura 7) estos dos taxones son muy similares y conforman un grupo divergente y compacto, compuesto de ejemplares identificados como *R. steindachneri* y los organismos con afinidad a *R. cf. steindachneri*. Los autores sugieren que *R. steindachneri* no se encuentra sólo en el Pacífico oriental, sino también en el Golfo de México y posiblemente también al oeste del océano Atlántico y proponen que esta región puede ser el hogar de dos especies simpátricas de *Rhinoptera* (*R. bonasus* y *R. steindachneri*).



Figura 6. Dendrograma basado en la secuencia de la región del ADNmt NADH2 del género *Rhinoptera*, por el método Neighbor-Joining (NJ), tomado de Naylor *et al.* (2012).

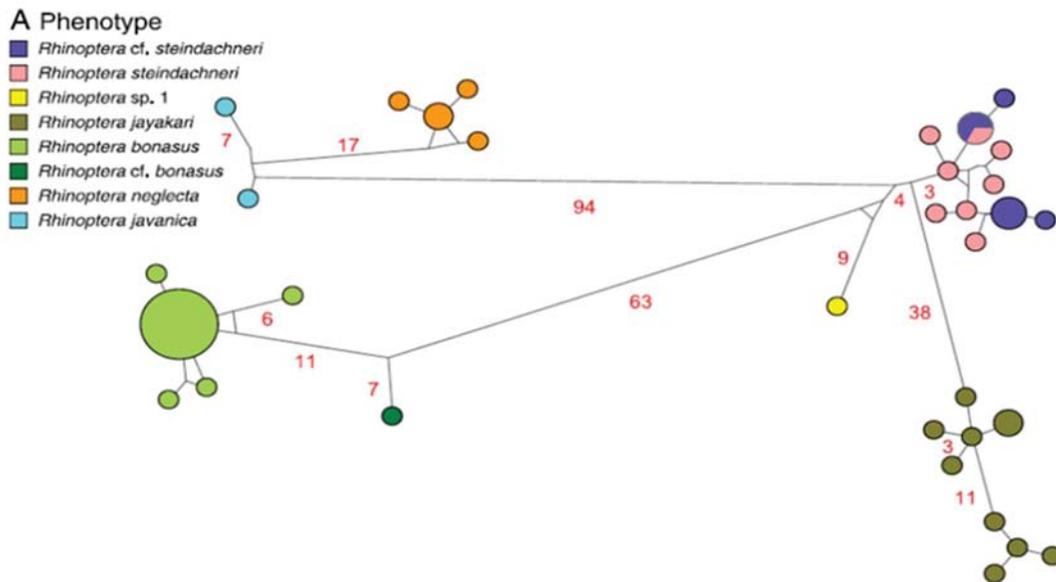


Figura 7. Red de haplotipos por parsimonia para el género *Rhinoptera*, el color simboliza el fenotipo. Tomado de Naylor *et al.* (2012).

McDowell & Fisher (2013) realizaron un estudio para evaluar la estructura de las *Rhinopteras* en las zonas de crianza en la Bahía de Chesapeake y el Golfo de México, sin embargo incluyeron muestras del Caribe colombiano (cuatro muestras) y de la costa de Brasil (dos muestras de *R. bonasus* y cuatro de *R. brasiliensis* respectivamente), concluyendo que las especies del Golfo de México tienen una afinidad genética con secuencias muy similares y en algunos casos, idénticas a las muestras identificadas como *R. brasiliensis*, denominándolas *R. aff. brasiliensis*. Mientras que algunos ejemplares de las localidades del Golfo de México y el Atlántico, corresponden a *R. bonasus*. En la Bahía de Tampa se identificaron 5 de 68 muestras (17%) como *R. aff. brasiliensis*,

mientras que en Crooked Island, Florida 18 de 42 (43%) de las muestras fueron identificados como *R. aff. brasiliensis*. Tomando esto en cuenta, el análisis factorial de correspondencias y un análisis de componentes principales usando loci de microsatélites, el gen mitocondrial NDH2 y la región nuclear RAG1, sugieren la presencia de tres grupos distintos: *R. bonasus* del Golfo de México con las muestras de la Bahía de Chesapeake, *R. bonasus* de Brasil con las muestras de Colombia y *R. aff. brasiliensis* del Golfo de México con las muestras de *R. brasiliensis* de Brasil. Sin embargo, no se tomaron muestras de la parte sur occidental del Golfo de México para este estudio, por lo que la distribución de esta especie en el Golfo de México se desconoce y sugieren que posiblemente se encuentran dos especies de *Rhinoptera* en el este del Golfo de México.

Para *R. steindachneri*, se registra el trabajo de Sandoval-Castillo & Rocha-Olivares (2011), estimaron la divergencia genética del gen del ADN mitocondrial NADH2 entre las poblaciones de elasmobranquios pelágicos de Baja California, indicando que los ejemplares del Golfo de California y la costa del Pacífico de Baja California (CPBC), se caracterizaron por linajes mitocondriales muy divergentes con tan sólo 4 haplotipos. Ribeiro *et al.* (2012) usando el código de barras del ADN para identificar los peces marinos de la región costera de Sao Paulo, Brasil registraron la secuencia de *R. brasiliensis* del gen COI.

IV. JUSTIFICACIÓN

Las pesquerías de elasmobranchios se han extendido en tamaño e importancia en respuesta a la reciente disminución de las poblaciones de peces óseos y el aumento en la demanda de alimento (Pratt & Cassey, 1990; Fogarty & Murawski, 1998). El estado de estas poblaciones no serán fáciles de determinar mientras existan vacíos de información que permitan conocer de forma confiable los registros de captura, ya que cuando existen, están incompletos o son considerados como un solo recurso denominado “rayas o mantas” (Compagno, 1990; Musick *et al.*, 2000; Stevens *et al.*, 2000; Stevenson *et al.*, 2008). Si a esto se suma las numerosas controversias taxonómicas sobre la determinación de las especies, resulta imprescindible el desarrollo de estudios científicos en diversos campos de investigación, que aporten y complementen las bases de datos a nivel local, regional y global, haciendo además énfasis en especies de mayor vulnerabilidad a amenazas naturales y/o antropogénicas.

La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) declaró a *Rhinoptera bonasus* y *R. steindachneri* bajo el estatus de “Casi Amenazado” (NT). Mientras que *R. brasiliensis*, en el estatus “Peligro de extinción” (EN) (Barker, 2006; Vooren y Lamónaca, 2004). Esta última categoría se le da a aquellas especies o poblaciones que se consideran que se está enfrentando a un riesgo muy alto de extinción en estado silvestre, ya sea por causas antropogénicas, cambios en el hábitat o por cambios graduales del clima (UICN, 2001).

Por esto es importante aumentar los conocimientos acerca de la taxonomía, distribución y filogenética de los batoideos de interés comercial, con el fin de aportar a la correcta identificación de las especies presentes en las capturas comerciales, a fin de implementar medidas efectivas de manejo ecológico y pesquero.

Antecedentes de información biológica como la talla de reproducción, fecundación, edad y crecimiento, evidencias morfológicas junto con el uso de marcadores moleculares, han determinado dos posibles especies de *R. bonasus*: una a lo largo del Atlántico Occidental y otra en el Golfo de México (Schwartz, 1990; Neer & Thompson, 2005; Collins *et al.*, 2007; Naylor *et al.*, 2012; McDowell & Fisher, 2013). De igual forma el uso de marcadores moleculares sugieren que *R. steindachneri* no se encuentra sólo en el Pacífico oriental, sino también en el Golfo de México y posiblemente también al oeste del océano Atlántico existiendo una posible simpatria entre *R.*

steindachneri y *R. bonasus* en el Golfo de México (Naylor *et al.*, 2012). McDowell & Fisher, (2013) proponen la presencia de *R. brasiliensis* al Norte del Golfo de México y al oeste del océano Atlántico y proponen que esta región puede ser el hogar de dos especies simpátricas de *Rhinoptera* (*R. bonasus* y *R. brasiliensis*). Esto ha generado una controversia sobre la ubicación taxonómica y estatus biogeográfico de estas especies, siendo necesario llevar a cabo una revisión sistemática del grupo y así entender mejor su historia biogeográfica y tendencias evolutivas.

Sumado a lo anterior, nuestros esfuerzos de muestreo en el sur occidente del Golfo de México (Veracruz; Campeche y Quintana Roo), no se registró la presencia de *R. bonasus* de acuerdo al carácter diagnóstico (placa dental de siete hileras), las muestras recolectadas corresponderían a *R. brasiliensis* (placa dental de siete hileras). Al no encontrar dentro del Golfo de México hasta el momento muestras de *R. bonasus* y basados en los antecedentes, surge la necesidad de trabajar las relaciones filogenéticas entre estas y resolver las siguientes preguntas:

¿Existen poblaciones divergentes de *R. bonasus* a lo largo del Atlántico Occidental y otra en el Golfo de México?

¿La presencia de individuos con placa dental de nueve hileras en el Golfo de México pertenecen a *Rhinoptera brasiliensis* lo cual representaría una ampliación en la distribución de esta especie de acuerdo a lo reportado en la literatura?

¿Las similitud entre los haplotipos de *R. steindachneri* del Golfo de California con haplotipos de *R. bonasus* del Norte del Golfo de México, sustentan el estatus de ambas como especies hermanas?

V. HIPÓTESIS

Con base en la característica distintiva de la placa dental de las especies del género *Rhinoptera* y en los actuales rangos de distribución conocidas para las mismas, los ejemplares recolectados en el Golfo de México poseen las nueve series de placas dentales similar a la reportada para *R. brasiliensis*, por tanto los caracteres moleculares confirmarán la presencia de *R. brasiliensis* en el Golfo de México y su posible ampliación de distribución.

VI. OBJETIVOS

6.1. General

Evaluar la identidad y relaciones filogenéticas de las rayas del género *Rhinoptera* (*R. bonasus*, *R. brasiliensis* y *R. steindachneri*) que se distribuyen en América, empleando marcadores moleculares del ADN mitocondrial (NADH2, COI, *Cit-b*) y del ADN nuclear (RAG1) e identificar sus relaciones genealógicas de los haplotipos y su asociación con la distribución geográfica

6.2. Específicos

- ✓ Determinar la historia evolutiva y las relaciones genéticas entre las especies del género *Rhinoptera* y en particular aquellas que se distribuyen en el Pacífico Oriental y el Atlántico occidental.
- ✓ Determinar las distancias genéticas que permitan identificar las distintas especies de *Rhinoptera*.
- ✓ Determinar las relaciones genealógicas de los haplotipos y su asociación con la distribución geográfica.
- ✓ Estimar los tiempos de divergencia que permita inferir la cronología de los eventos de vicarianza y dispersión entre las especies del género *Rhinoptera*.

VII. DISEÑO METODOLÓGICO

7.1. Área de Estudio

Los muestreos se realizaron en el Pacífico oriental mexicano, Golfo de México y Caribe colombiano, estos son considerados como zonas de captura y desembarco de las especies *Rhinoptera* (Tabla 2) (Figura 8).

Tabla 2. Información de las muestras de tejido de las especies *Rhinoptera*. Número de individuos (N), Caribe colombiano (Cc), Golfo de México (GM), Pacífico Oriental (PO).

Fecha	N	Sitios	Localidad	Región	Latitud	Longitud
oct-12	10	Manaure	Guajira	Cc	11.804389	-72.491382
jun-13	28	Chachalacas	Veracruz	GM	19.439484	-96.324097
abr-14	30	Seybaplaya	Campeche	GM	19.641109	-90.690445
dic-14	5	Tecolutla	Veracruz	GM	20.481918	-97.00867
abr-15	4	Tamiahua	Veracruz	GM	21.267888	-97.443866
ago-14	6	Mazatlán	Sinaloa	PO	23.183231	-106.425966
oct-14	2	Puerto Madero	Chiapas	PO	14.740593	-92.446495
nov-14	2	Salina Cruz	Oaxaca	PO	16.146278	-95.182816

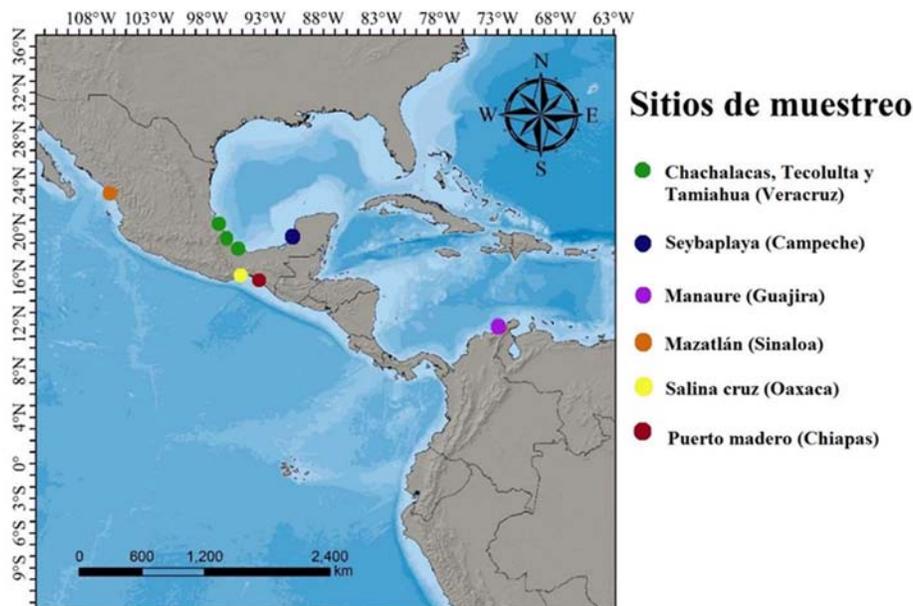


Figura 8. Sitios de muestreo de las especies del género *Rhinoptera*.

7.2. Trabajo de campo

En cada sitio se tomaron muestras de tejido muscular, siendo preservadas en viales con alcohol etílico absoluto y mantenidas en congelación hasta su análisis en el Laboratorio de Genética de organismos acuáticos del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICMyL) de la UNAM.

7.3. Trabajo de Laboratorio

7.3.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico total se realizó utilizando los reactivos y el protocolo del Wizard® Genomic DNA Purification Kit, de la marca PROMEGA, específicamente se usó el protocolo diseñado para extracción de ADN proveniente de tejido animal.

7.3.2. Amplificación de ADN mediante la técnica de PCR

En el presente estudio se utilizaron tres genes del ADN mitocondrial (**COI**, **Cit-b**, **NADH2** ADNmt) y uno del ADN nuclear (**RAG-1** ADNn). Los iniciadores utilizados para su amplificación se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Iniciadores utilizados para la amplificación de los tres genes mitocondriales y uno nuclear en *Rhinoptera*.

Iniciador	Secuencia 5' - 3'	Referencia
COI	Fish1F: TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	Ivanova <i>et al.</i> (2007)
	Fish1R: TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA	
Citb	Rb <i>Cit-b</i> F: GGCCTHTTYCTRGCTATACTACTACAC	McDowell & Fisher (2013)
	Rb <i>Cit-b</i> R: AGGGRTGGAATGGRATTTT	
NADH2	RhinND2F1: GAACCCYTTAATCCTCTYCATC	McDowell & Fisher (2013)
	RhinND2R2: TATRGGGGTTAATGGRAGRAG	
RAG1	RhinRAG1F: CACTGAAGTGGGAATAATAGATG	McDowell & Fisher (2013)
	RhinRAG1R: TTATCGAGCATTGCTTGCC	

Para la amplificación por medio de la reacción de cadena de la polimerasa, conocida como PCR (por sus siglas en inglés), la mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen final de 15 μ l, se utilizaron los reactivos de la marca INVITROGEN™ y Dream taq DNA Polymerase (Tabla 4). Las PCRs se realizaron en un Termociclador de Gradiente de última generación Modelo T100 Touch de 96 pozos Marca Bio-Rad y las condiciones de las amplificaciones para los diferentes iniciadores fueron de acuerdo a los programas de la Tabla 5.

Tabla 4. Mezcla de reacción para el PCR.

Reactivo INVITROGEN	1 X (μl)	Reactivo Dream taq	1 X (μl)
Agua estéril	11.805	Agua estéril	12.7
Buffer 10X	1.5	10X DreamTaq Buffer	1.5
MgCl ₂ 3 mM	0.9	dNTPs 2mM	0.12
dNTPs 0.8 mM	0.12	Primer F 1 pM	0.15
Primer F 1 pM	0.15	Primer R 1 pM	0.15
Primer R 1 pM	0.15	DreamTaq Polymerase 0.016 U	0.08
Taq polimerasa 0.015 U/ μ l	0.075	ADN (muestra)	0.36
ADN (muestra)	0.36		

Tabla 5. Condiciones del programa utilizado para la amplificación de los fragmentos de los genes COI, Cit-b, NADH2 y RAG 1.

Gen	Desnaturalización inicial	No. Ciclos	Desnat.	Hibridación	Extensión	Extensión final	Finalización
COI	2 min 95°C	35	30 seg 94°C	1 min 54°C	1 min 72°C	10 min 72°C	∞ 4°C
Cit-b	3 min 94°C	35	1 min 94°C	1 min 56°C	1 min 72°C	7 min 72°C	∞ 4°C
NADH2	3 min 94°C	35	30 seg 94°C	30 seg 50.6°C	1 mi 30 seg 72°C	7 min 72°C	∞ 18°C
RAG 1	15 min 95°C	38	30 seg 95°C	1 min 55°C	1 min 72°C	7 min 72°C	∞ 4°C

Una vez amplificados los fragmentos tanto de ADNmt como el ADNn, estos fueron visualizados en geles de agarosa al 1%. Si los fragmentos se amplificaron adecuadamente, se procedió a la secuenciación.

7.3.3. Secuenciación.

Los fragmentos de ADNmt como el ADNn amplificados en la PCR fueron enviadas a la empresa Htseq de Washington, donde fueron purificados y secuenciados mediante el método *Sanger* en un secuenciador ABI 3730xl. Los datos fueron revisados y editados para cada gen, analizando manualmente los electroferogramas de cada secuencia para verificar cualquier error en la lectura de los nucleótidos utilizando el programa BioEdit 7.01 (Hall, 1999). Las secuencias se alinearon mediante el programa MUSCLE 3.7 (Robert, 2004). El contenido informativo del alineamiento se representó mediante su *sequence logos* a través de Weblogo 2.8.2 (Schneider & Stephens, 1990; Crooks *et al.*, 2004), para determinar de manera gráfica las posiciones variables y su frecuencia (en *bits*). Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), para verificar su porcentaje de identidad con las especies más relacionadas y cantidad de bases similares.

7.4. Análisis de datos

Además de las secuencias obtenidas en este estudio, se analizó secuencias encontradas en el GenBank de otras especies del mismo género *Rhinoptera* y como grupo externo se utilizó secuencias de la especie *Mobula japonica*, sugerido por (Aschliman *et al.*, 2012; Adnet *et al.*, 2012; Poortvliet *et al.*, 2015) (Tabla 6).

Tabla 6. Secuencias de GenBank de las especies del género *Rhinoptera* y *Mobula japonica* utilizadas en este estudio.

Especie	Localidad	País	GEN	Acceso GenBank	Referencia
<i>Rhinoptera bonasus</i>	Bahía de Chesapeake y Florida	Estados Unidos	COI	JX241049, JX241050, JX241051, JX241052	McVeigh et al. (2014)
<i>Rhinoptera bonasus</i>	Bahía de Chesapeake	Estados Unidos	COI	KF245598, KF245597, KF245596	Bade et al. (2014)
<i>Rhinoptera bonasus</i>	Bahía de Chesapeake y Florida	Estados Unidos	Cit-b	JX241053, JX241054, JX241055, KM593339	McVeigh et al. (2014)
<i>Rhinoptera bonasus</i>	Carolina del Norte	Estados Unidos	NADH2	JQ518919	Naylor et al. (2012)
<i>Rhinoptera bonasus</i>		Estados Unidos	RAG 1	AY949029	Horman et al. (2005)
<i>Rhinoptera cf. bonasus</i>	Senegal, Océano Atlántico	África	NADH2	JQ518923	Naylor et al. (2012)
<i>Rhinoptera brasiliensis</i>	Sao Paulo, Brasil	Brasil	COI	JX124888	Ribeiro et al. (2012)
<i>Rhinoptera steindachneri</i>		México	COI	JN184076	Aschliman et al. (2012)
<i>Rhinoptera steindachneri</i>	Golfo de California	México	NADH2	JQ518918	Naylor et al. (2012)
<i>Rhinoptera steindachneri</i>	Golfo de California	México	NADH2	HQ540559, HQ540560, HQ540561	Sandoval-Castillo & Rocha-Olivares (2011)
<i>Rhinoptera steindachneri</i>	Costa Pacífica Baja California	México	NADH2	HQ540562	Sandoval-Castillo & Rocha-Olivares (2011)
<i>Rhinoptera steindachneri</i>	Negombo	Sri Lanka	RAG 1	KM364982	Poortvliet et al. (2015)
<i>Rhinoptera cf. steindachneri</i>	Mississippi, Golfo de México	Estados Unidos	NADH2	JQ518921	Naylor et al. (2012)
<i>Rhinoptera javanica</i>	Sandakan	Malasia	COI	KM073013, KM073014	Lim et al. (2015)
<i>Rhinoptera javanica</i>	Queensland, Golfo de Carpentaria	Australia	COI	DQ108133	Ward et al. (2005)
<i>Rhinoptera javanica</i>		Vietnam	NADH2	JQ518924	Naylor et al. (2012)
<i>Rhinoptera javanica</i>	Mar Rojo	Arabia Saudita	NADH2	KM396924	Spaet & Berumen (2015)
<i>Rhinoptera jayakari</i>	Sandakan	Malasia	COI	KM073015	Lim et al. (2015)
<i>Rhinoptera jayakari</i>		India	COI	KF899683, KF899680, KF899682, KF899679, KF899681	Bineesh et al. (2016)
<i>Rhinoptera jayakari</i>	Mar Rojo	Arabia Saudita	NADH2	KJ659875, KJ659876, KJ659877	Bogorodsky et al. (2014)
<i>Rhinoptera jayakari</i>	Golfo de Tailandia	Tailandia	NADH2	JQ518917	Naylor et al. (2012)
<i>Rhinoptera neglecta</i>	Queensland, Golfo de Carpentaria	Australia	NADH2	JQ518920	Naylor et al. (2012)
<i>Mobula japonica</i>	Océano Pacífico central		COI, NADH2, Cit-b, RAG 1	JX392983	Poortvliet et al. (2015)

Se utilizó el programa jModelTest (Darriba *et al.*, 2012) para buscar el mejor modelo evolutivo que describe cada conjunto de datos. Se tuvo en cuenta los resultados obtenidos mediante la aplicación del Criterio de Información de Akaike corregido (AICc por sus siglas en inglés).

Utilizando el programa DnaSP 5.2 (Librado & Rozas, 2009), se determinó los estimadores de diversidad genética por especie para los genes trabajados, número de haplotipos (A), número de sitios polimórficos (s), diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π).

El modelo evolutivo de Kimura 2 parámetros “K-2P” (Kimura, 1980) se utilizó para estimar la divergencia evolutiva entre secuencias y pares de secuencias dentro y entre grupos basándose en los cuatro marcadores. Para ello se ha utilizado el programa MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013).

7.4.1. Métodos para inferir filogenias

En este trabajo, luego de definir el modelo de evolución, se utilizaron los tres métodos comúnmente utilizados para inferir filogenias para la reconstrucción de la historia evolutiva del género en estudio: máxima verosimilitud (MV), inferencia bayesiana (IB), así como también Máxima Parsimonia (MP).

7.4.1.1. Análisis basados en el criterio de parsimonia

El concepto de Máxima Parsimonia (MP) sostiene que ante dos hipótesis evolutivas es más probable que sea cierta aquella que implique menos cambios evolutivos. En este trabajo se utilizó el programa PAUP v4.0 b10 (Swofford, 2003) para inferir las filogenias según MP. El algoritmo utilizado para la búsqueda del árbol más parsimonioso o de menor longitud fue de tipo heurístico. El método que se utilizó para la búsqueda del árbol más parsimonioso, fue por medio de la reconexión y bisección del árbol o TBR (por sus siglas en inglés: Tree Bisection Recombination), con adición aleatoria de taxa al árbol inicial (1000 réplicas). El árbol de consenso se determinó con base en los valores calculados de los índices de consistencia y de retención, considerados como medida de la homoplasia presente en el conjunto de datos (valores cercanos a 0 implican un alto grado de homoplasias, mientras que valores cercanos a 1, representan pocas homoplasias). Por último, el soporte de los nodos fue determinado a través del estimador de re-muestreo *bootstrap* no paramétrico con 1000 seudoréplicas.

7.4.1.2. Análisis basados en el criterio de verosimilitud

El método de Máxima verosimilitud (MV) busca el árbol más probable a partir de un conjunto de datos basados en diferentes hipótesis evolutivas y de un modelo dado de evolución. Sólo la hipótesis con máxima verosimilitud es seleccionada. En este trabajo, se generó un árbol con el programa RAxML-HPC v.8 on XSEDE (Stamatakis, 2014). Este análisis se utilizó 1000 réplicas *bootstrap* y el modelo de sustitución asignado fue GAMMA.

7.4.1.3. Análisis mediante inferencia bayesiana.

La Inferencia Bayesiana (IB) está basada en el concepto de probabilidad posterior (PP) para cada uno de los nodos, se define como la probabilidad de que una determinada hipótesis sea correcta estableciendo el modelo de evolución y un conjunto de datos observados. En el caso de probabilidades posteriores, se considera que un nodo en particular es fiable cuando su probabilidad posterior es superior a 0.95. Es por ello que se utiliza una simulación técnica llamada cadena Markov Monte Carlo (MCMC) para tener una aproximación de la distribución de frecuencias de la PP. Los análisis de IB se realizaron de forma particionada con Mrbayes 3.1 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001), donde se utilizó un modelo que contempló tasas de cambio diferentes para cada posición del codón en la secuencia de cada gen (Tabla 7). La selección del mejor modelo para cada posición en este análisis se realizó con el programa jModelTest (Darriba *et al.*, 2012), utilizando el criterio *Bayesian Information Criterion* (BIC), como principal parámetro para la elección del modelo. La corrida se realizó utilizando 50.000.000 de generaciones. Para evaluar el punto de convergencia de las cadenas durante el proceso de búsqueda se utilizó el programa Tracer v 1.5 (Rambaut & Drummond, 2007). En este caso se eliminó el principio del muestreo, ya que los valores de verosimilitud son cambiantes y van en aumento; esta rutina es conocida como *burn-in* y consistió en eliminar el primer millón de generaciones en el muestreo, obteniendo con ello topologías con valores casi idénticos de verosimilitud.

Tabla 7. Parámetros utilizados para cada posición del codón de las secuencias particionadas para cada gen, mediante el criterio inferencia Bayesiana (BIC)

	COI		Cit-b		ND2		RAG 1	
	BIC	nst	BIC	nst	BIC	nst	BIC	nst
Codon Pos 1	K80+G	2	K80	2	K80	2	F81	1
Codon Pos 2	F81	1	F81+I	1	F81	1	F81	1
Codon Pos 3	GTR	6	HKY	1	GTR	6	K80	2

7.4.1.4. Análisis a partir de múltiples genes.

Frecuentemente, las relaciones entre las especies están poco resueltas cuando se reconstruye una filogenia a partir de un solo gen. Una manera muy útil de afrontar esta dificultad es aumentar el conjunto de datos agrupando o concatenado la información contenida de diferentes genes.

Para este trabajo se utilizó un súper alineamiento de múltiples genes para obtener la filogenia más robusta de las especies. En todos estos análisis los datos fueron particionados indicando donde comienza y termina cada gen a fin de mantener el modelo de evolución correspondiente de cada gen, las tasas y la composición de cada carácter sobre cada conjunto de datos. Los súper alineamientos fueron analizados mediante MP, IB y MV usando los programas PAUP, Mr Bayes y RAxML respectivamente.

7.4.2. Redes de haplotipos.

En los estudios donde se explora la variación en secuencias de ADN a nivel intraespecífico, otro tipo de representación gráfica diferente a los árboles filogenéticos son las redes de haplotipos, también llamadas *networks* (Mardulyn, 2012). Una red de haplotipos es una generalización de árboles filogenéticos que permite la representación de varios árboles simultáneamente en un único diagrama (Eslahchi *et al.*, 2010), que a menudo representan las relaciones entre las secuencias más claramente que los árboles, en parte porque no limitan las conexiones al modo de visualización lineal y bifurcante que se utiliza en los árboles (Posada & Crandall, 2001). Las redes tienen la ventaja, respecto de los árboles, que en ellas se muestra el número de cambios de bases entre las secuencias (Teacher & Griffiths, 2012). Una red está constituida básicamente de nodos y sus conexiones. Los nodos representan las secuencias analizadas o bien secuencias hipotéticas requeridas para conectar las secuencias analizadas (vectores medios), y las conexiones representan las diferencias mutacionales entre los nodos.

Para evidenciar las relaciones genealógicas entre los haplotipos hallados se construyó una red de haplotipos mediante el algoritmo "*median joining network*" implementado en el programa Network 4.6 (Bandelt *et al.*, 1999) con las opciones por defecto.

7.4.3. Estimación de tiempos de divergencia

7.4.3.1. Evaluación del reloj molecular

Dado que en muchos casos los genes o linajes parecen no estar de acuerdo con la hipótesis del reloj molecular, para poder estimar tiempos de divergencia es fundamental verificar primeramente si las secuencias de ADN están evolucionando de acuerdo con esta hipótesis (Schneider, 2007).

Como la hipótesis del reloj molecular asume que las tasas de sustitución entre las ramas de una filogenia son homogéneas, es factible aplicar una prueba de razón de verosimilitud (del inglés Likelihood Ratio –LR– o Likelihood Ratio Test –LRT–) para comparar valores generados por un análisis de máxima verosimilitud (MV) en dos situaciones diferentes, relajando y forzando el reloj molecular. Los modelos de sustitución, en ambos casos, serán los mismos difiriendo sólo en la opción del reloj molecular (Schneider, 2007).

Así, dado un árbol filogenético de secuencias y un modelo de sustitución nucleotídica, se computa la verosimilitud asociado al árbol. Posteriormente, la verosimilitud promedio del árbol es obtenido, bajo la suposición de sitios independientes, al multiplicar la verosimilitud (o, equivalentemente, sumando los logaritmos de sus verosimilitudes) para todos los sitios (Battistuzzi *et al.*, 2011). Este cálculo se realiza dos veces, permitiendo diferentes tasas entre las ramas del árbol y bajo el supuesto de tasa constante, indistintamente de cual se compute primero. Finalmente, se calcula el LR, que sigue aproximadamente una distribución de χ -cuadrado con n (número de taxa en la filogenia) menos dos grados de libertad (Felsenstein, 1981), de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$LR = 2 \left| \ln L - \ln LC \right|$$

Donde LC representa el valor obtenido para la hipótesis nula bajo la suposición de tasa constante (p.e. reloj forzado) y L el valor de verosimilitud bajo la hipótesis alternativa (p.e. reloj relajado). Vale aclarar que como la suposición de un reloj molecular sólo asume una única tasa de sustitución, esta constituye la hipótesis nula por ser la opción más simple.

Para el análisis del reloj molecular mediante la prueba de razón de verosimilitud global, se utilizaron las 14 secuencias provenientes del alineamiento del gen COI (una o dos representativo de cada localidad). Mediante PAUP v4.0 b10 (Swofford, 2003) se realizaron dos corridas de MV, relajando y forzando el reloj molecular, respectivamente. Para el análisis el modelo óptimo de sustitución nucleotídica fue evaluado con jModelTest (Darriba *et al.*, 2012) seleccionado según un Criterio de Akaike corregido (AICc). Finalmente, a partir de los valores de verosimilitud obtenidos se realizó el cálculo de la razón de verosimilitud de acuerdo a la fórmula mencionada más arriba. El valor crítico a un nivel de significancia $p = 0.05$, se obtuvo revisando en una tabla de distribución χ -cuadrado con grados de libertad ($gl = 12$).

7.4.3.2. Calibración del Reloj molecular

El reloj molecular es una técnica para datar la divergencia de dos taxones (Bromham & Penny, 2003) y es una herramienta importante en la sistemática molecular. Para ello se construyeron árboles con procedimientos bayesianos llevados a cabo con el programa BEAST v2.3.3 (Bouckaert, 2014) para el conjunto de datos obtenidos en el presente trabajo, se empleó el gen COI ocupando un modelo evolutivo Hasegawa–Kishino–Yano (HKY + I). Los análisis fueron corridos asumiendo un reloj molecular relajado con una tasa log-normal (Drummond *et al.*, 2006) y el Modelo de especiación Yule. Las cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) fueron corridas con 50.000.000 generaciones. El tamaño efectivo de la muestra (ESS) para las estimaciones de los parámetros y la convergencia se revisó utilizando el programa Tracer v 1.6 (Rambaut & Drummond, 2007). Las estimaciones de las divergencias temporales y los intervalos superiores e inferiores al 95 % de las densidades posteriores mayores (HPD) de estos parámetros al igual que las medias, fueron también estimados con el programa Tracer v 1.6. El árbol final se estimó en TreeAnnotator v 2.3.3 (Rambaut & Drummond, 2007) y visualizado en FigTree v. 1.4.2.

En este trabajo, se implementó un punto de calibración con base en el registro fósil de *Rhinoptera*, que se extiende desde 60 a 50 Ma (Cappetta, 2012), con una distribución normal y el percentil 95 % de la distribución. Se tomó solamente la información que brindan los árboles basados en COI, dado que es en estos análisis es donde se puede observar la mayor cantidad de especies y se incluyó como outgroup a *Mobula japonica* y *Myliobatis californica*.

VIII. RESULTADOS

Los individuos recolectados en el Golfo de México (Veracruz, Campeche y Quintana Roo) presentaron nueve series de placas dentales con tres hileras centrales grandes (Figura 8). El análisis de las mandíbulas sugiere que las especies que se distribuyen en el Golfo de México, en costas mexicanas desde Tamihaua, Veracruz a Chuquilá, Quintana Roo, tienen una afinidad morfológica cercana a *R. brasiliensis*. En el clado formado con COI se observa que los ejemplares del Golfo de México se agruparon con la secuencia de *R. brasiliensis* de Sao Paulo, Brasil. Además los ejemplares del Golfo de México mostraron una configuración de las placas dentales idénticas a *R. brasiliensis* (nueve hileras), por esta razón se identificaron como *R. brasiliensis GM* (Golfo de México).

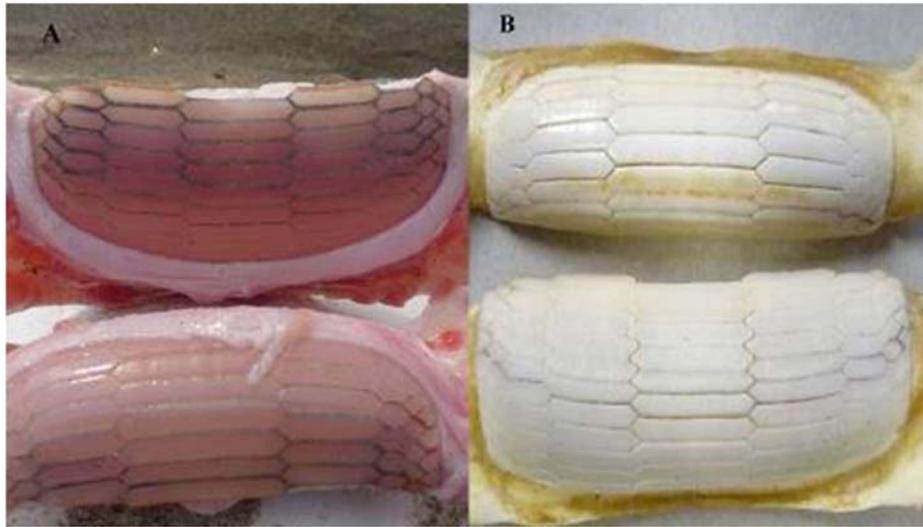


Figura 8. Mandíbulas recolectadas en el Golfo de México. A. Chachalacas, Veracruz. B. Seybaplaya, Campeche

Los estimadores de diversidad genética para las secuencias de ADNmt variaron entre región mitocondrial analizada y especie. La región mitocondrial COI presentó la más alta diversidad haplotípica (h), pero los valores más altos por especie de diversidad haplotípica ($h = 1.000$) se

presentaron con el gen NADH2. Similarmente el gen mitocondrial NADH2, presentó el mayor valor de diversidad nucleotídica (π). Los individuos de *R. bonasus* del Caribe colombiano obtuvieron un valor alto de diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π) con respecto a las demás especies para Cit-b y RAG 1. Así mismo, *R. steindachneri* del Golfo de California presentó el mayor número de sitios segregantes (s), mientras que *R. brasiliensis* tuvo en general valores bajos de diversidad para todos los marcadores y estimadores, pese a ser la especie con mayor número de muestras analizadas (Tabla 8).

Tabla 8. Estimadores de diversidad genética por especie para algunos genes de ADNmt y ADNn. Número de secuencias (n), número de haplotipos (A), número de sitios polimórficos (s), diversidad haplotípica (h) con desviación estándar y nucleotídica (π) con desviación estándar.

Especie	COI					Cytb					NADH2					RAG 1				
	n	A	s	$h \pm sd$	$\pi \pm sd$	n	A	s	$h \pm sd$	$\pi \pm sd$	n	A	s	$h \pm sd$	$\pi \pm sd$	n	A	s	$h \pm sd$	$\pi \pm sd$
<i>R. bonasus</i> Col	8	3	2	0.750±0.096	0.0021±0.0003	9	7	5	0.944±0.070	0.0064±0.0006	4	2	2	0.500±0.265	0.0011±0.0006	2	2	3	1.000±0.500	0.0037±0.0018
<i>R. bonasus</i> ANte	7	4	3	0.714±0.181	0.0026±0.0008	3	2	1	0.667±0.314	0.0015±0.0007						2	1	0	0.000±0.000	0.0000±0.0000
<i>R. brasiliensis</i>	19	2	1	0.515±0.052	0.0010±0.0001	23	3	1	0.435±0.111	0.0010±0.0002	13	2	2	0.154±0.126	0.0003±0.0003	11	1	0	0.000±0.000	0.000±0.000
<i>R. steindachneri</i> PM	5	3	2	0.800±0.164	0.0020±0.0005	6	1	0	0.000±0.000	0.0000±0.0000	6	2	2	0.333±0.215	0.0007±0.0005					
<i>R. steindachneri</i> GC											5	5	52	1.000±0.126	0.026±0.0085					
<i>R. jayakari</i>	6	3	4	0.600±0.215	0.0026±0.0013						4	2	9	0.500±0.265	0.0056±0.0030					
<i>R. javanica</i>	3	2	1	0.667±0.314	0.0134±0.0063						2	2	4	1.000±0.500	0.0047±0.0023					
Total	49	18	75	0.911±0.024	0.0463±0.0031	41	13	37	0.804±0.055	0.0357±0.0023	39	17	203	0.862±0.043	0.0586±0.0055	17	6	27	0.588±0.135	0.0074±0.0022

8.1. Análisis basado en COI

Para esta región génica del género *Rhinoptera* se logró la amplificación de un fragmento de 496 pares de bases (pb) y comprendió 50 secuencias, de las cuales 31 provienen de individuos recolectados en las diferentes localidades y 19 secuencias disponibles en el GenBank (Tabla 9).

Tabla 9. Secuencias de las especies del género *Rhinoptera* utilizadas en este estudio con el gen mitocondrial COI. Número de secuencias (n).

Especie	localidad	n	Identificación	Procedencia
<i>R. brasiliensis</i>	Campeche, Golfo de México	8	RbCam	Este estudio
<i>R. brasiliensis</i>	Veracruz, Golfo de México	10	RbVer	Este estudio
<i>R. steindachneri</i>	Mazatlán, Pacífico mexicano	2	RsMaz	Este estudio
<i>R. steindachneri</i>	Oaxaca, Pacífico mexicano	2	RsOax	Este estudio
<i>R. steindachneri</i>	Chiapas, pacífico mexicano	1	RsCh	Este estudio
<i>R. bonasus</i>	Guajira, caribe colombiano	8	RbCol	Este estudio
<i>R. bonasus</i>	Atlántico Norte	7	Rbon	JX241049, JX241050, JX241051, JX241052 KF245598, KF245597 KF245596
<i>R. brasiliensis</i>	Sao Paulo, Brasil	1	RbraSao	JX124888
<i>R. steindachneri</i>	Golfo de California	1	Rstgb	JN184076
<i>R. jayakari</i>	Mar Rojo	6	Rjay	KM073015, KF89963 KF899680, KF899682 KF899679, KF899681 KM073013, KM0731
<i>R. javanica</i>	Indonesia	3	Rjav	DQ108133
<i>Mobula japonica</i>	Oceano Pacífico central	1	Mobula	JX392983

Las comparaciones mediante BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information) de las secuencias de nucleótidos del gen COI de las muestras de Campeche y Veracruz obtenidas en este estudio tienen una mayor e igual proporción de identidades encontradas con *R. brasiliensis*, mientras que las muestras de Colombia, Mazatlán, Chiapas y Oaxaca obtuvieron una mayor proporción de identidades encontradas en el BLAST con *R. bonasus*. El modelo de evolución que mejor se ajustó a este juego de datos según el jModelTest fue HKY+I.

Los valores de divergencia intraespecífica estimados a partir del COI osciló entre 0.001 (*R. brasiliensis*, Golfo de México) y 0.014 (*R. javanica*) (Tabla 10). Para las especies o linajes que estuvieron representadas mediante una sola secuencia, la divergencia intraespecífica no se pudo calcular (Tabla 10). Los valores interespecíficos fluctuaron entre 0.001 (*R. brasiliensis*, Golfo de México vs *R. brasiliensis*, Sao Paulo) y 0.150 (*R. javanica* vs *R. bonasus*, Atlántico Norte) y (*Mobula japonica* vs *R. javanica*) (Tabla 10).

Tabla 10. Distancias genéticas para el género *Rhinoptera* calculadas a partir del modelo K-2P con el gen mitocondrial COI. Valores en color rojo de la tabla, son las distancias intraespecíficas. De la diagonal hacia abajo se muestran las distancias interespecíficas. Colombia (Col), Brasil (Br), Golfo de México (GM), Pacífico mexicano (PM), Atlántico Norte (ANte).

Especies	<i>R. boCol</i>	<i>R. braBr</i>	<i>R. brGM</i>	<i>R. stPM</i>	<i>R. boNte</i>	<i>R. stGC</i>	<i>R. jay</i>	<i>R. jav</i>	<i>Mobula</i>
<i>R. bonasus Col</i>	0.002								
<i>R. brasiliensis Br</i>	0.075	-							
<i>R. brasiliensis GM</i>	0.073	0.001	0.001						
<i>R. steindachneri PM</i>	0.015	0.071	0.069	0.002					
<i>R. bonasus ANte</i>	0.018	0.072	0.071	0.015	0.003				
<i>R. steindachneri GC</i>	0.069	0.004	0.005	0.065	0.066	-			
<i>R. jayakari</i>	0.078	0.034	0.033	0.074	0.129	0.033	0.003		
<i>R. javanica</i>	0.100	0.103	0.101	0.095	0.150	0.096	0.089	0.014	
<i>Mobula japonica</i>	0.134	0.134	0.133	0.144	0.133	0.133	0.129	0.150	-

De los diferentes métodos para inferir filogenias (MP/MV/IB), la topología mejor soportada por sus valores de apoyo a las ramas fue la Inferencia Bayesiana (Apéndice 3). No obstante, las tres topologías concuerdan con una estructura compuesta por dos grupos principales (Apéndices 1 y 2); el primero compuesto por el 93 % y 61 % bootstrap (BT) y 0.99 Probabilidad Posterior (PP) presentando tres clados. El primero coloca a *R. bonasus* del Caribe colombiano y *R. steindachneri* del Pacífico mexicano como especies hermanas con el 74 % y 62 % de soporte BT (MP y MV) y el 0.99 de PP (IB), mientras que las secuencias de *R. bonasus* que corresponden al Atlántico Norte, obtenidas del GenBank formando otro clado soportado (70 % y 76 % BT, 0.61 PP) y aparentemente es parafilético con respecto al clado anterior (*R. bonasus* + *R. steindachneri*), mientras que el tercer clado corresponde a las secuencias de *R. javanica* del GenBank (Figura 9). El segundo grupo (con un soporte del 93 % y 89 % de BT (MP y MV) y 0.99 PP (IB)) conformado por dos clados, el primero con el 69 % y 96 % de soporte BT (MP y MV) y el 1 de PP (IB) formado por las muestras de las localidades de Campeche y Veracruz (Golfo de México), en el mismo clado se agrupan las secuencias obtenidas del GenBank de *R. brasiliensis* de Sao Paulo, Brasil y la secuencia de *R. steindachneri* del Golfo de California, mismas que aparecen como especies hermanas con *R. jayakari* que forman el segundo clado (Figura 9).

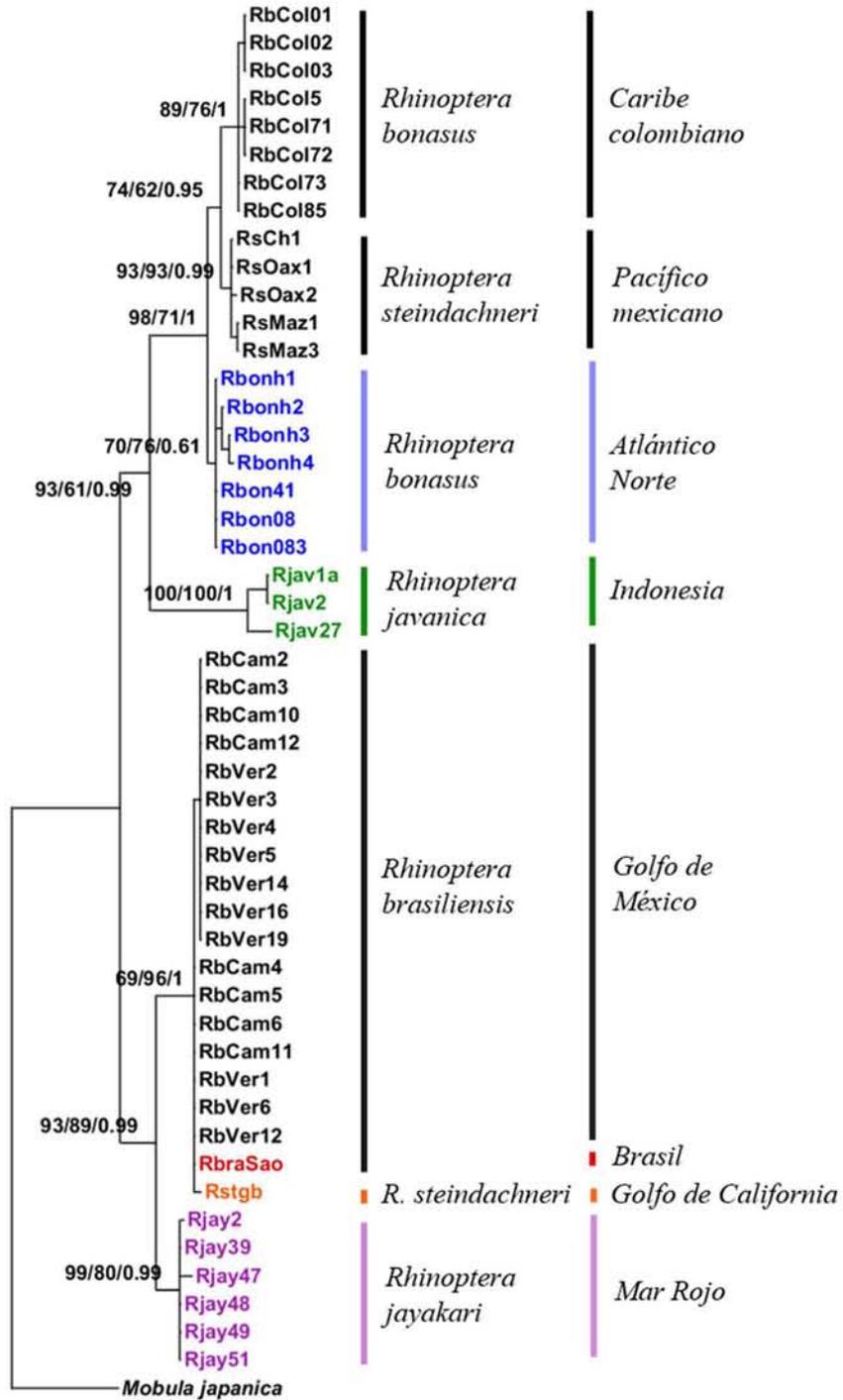


Figura 9. Árbol filogenético del gen COI del ADNmt del género *Rhinoptera*. Las secuencias en colores indican que provienen del GenBank. Los valores son los soportes de Bootstrap calculados con 1000 réplicas (MP/MV) y Probabilidad Posterior (IB).

Con la red de haplotipos las relaciones que se presentan con las localidades de la distribución de las especies del género *Rhinoptera* apoya la validez de las agrupaciones realizadas en la topología del árbol, donde se observa que los ejemplares de *R. brasiliensis* del Golfo de México (Campeche y Veracruz) comparten el mismo haplotipo con *R. brasiliensis* disponible en GenBank de Sao Paulo, Brasil (Figura 10), también se observa a los individuos recolectados de *R. steindachneri* en el Pacífico oriental mexicano (Mazatlán, Oaxaca y Chiapas), muestran una amplia divergencia con respecto a las secuencias de *R. steindachneri* disponibles en GenBank del Golfo de California. Las secuencias del Golfo de México son más cercanas con el Golfo de California, separados por dos pasos mutacionales (Figura 10).

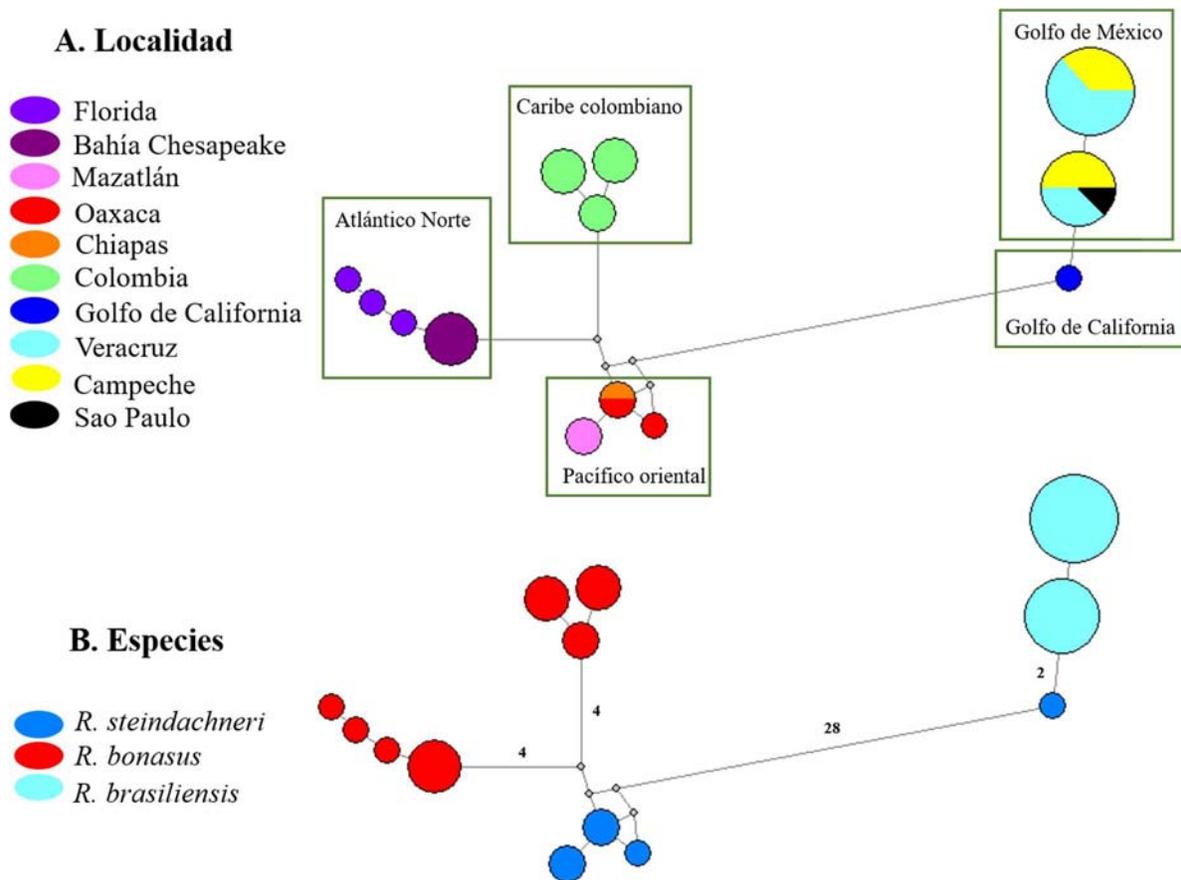


Figura 10. Red de haplotipos del gen COI del ADNmt del género *Rhinoptera* distribuido en América. Los números indican los pasos mutacionales, sin número existe un solo paso mutacional entre los haplotipos. Los círculos indican los haplotipos, A. Localidad y B. Especie. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de los haplotipos; puntos pequeños representan los vectores intermedios que representan haplotipos extintos o no muestreados.

8.2. Análisis basado en Cit-b

Para esta región génica del género *Rhinoptera* se logró la amplificación de un un fragmento de 423 pb y comprendió 42 secuencias, de las cuales 38 provienen de individuos recolectados en las diferentes localidades y cuatro secuencias disponibles en el GenBank (Tabla 11).

Tabla 11. Secuencias de las especies del género *Rhinoptera* utilizadas en este estudio con el gen mitocondrial COI. Número de secuencias (n).

Especie	localidad	n	Identificación	Procedencia
<i>R. brasiliensis</i>	Campeche, Golfo de México	8	RbrCam	Este estudio
<i>R. brasiliensis</i>	Veracruz, Golfo de México	10	RbrVer	Este estudio
<i>R. steindachneri</i>	Mazatlán, Pacífico mexicano	2	RsMaz	Este estudio
<i>R. steindachneri</i>	Oaxaca, Pacífico mexicano	2	RsOax	Este estudio
<i>R. steindachneri</i>	Chiapas, pacífico mexicano	1	RsCh	Este estudio
<i>R. bonasus</i>	Guajira, caribe colombiano	8	RbCol	Este estudio
<i>R. bonasus</i>	Atlántico Norte	4	Rbon	JX241053,JX241054, JX241055,KM593339
<i>Mobula japonica</i>	Oceano Pacífico central	1	Mobula	JX392983

Del análisis de homología mediante BLAST de las secuencias del gen Cit-b se obtuvo que las muestras de Campeche y Veracruz obtenidas en este estudio tienen mayor proporción de identidades encontradas con *R. steindachneri*, mientras que las muestras de Colombia, Mazatlán, Chiapas y Oaxaca, obtuvieron una mayor proporción de identidades encontradas en el BLAST con *R. bonasus*. El modelo de evolución que mejor se ajusta a este juego de datos según el jModelTest es HKY+I.

Los valores de divergencia intraespecífica oscilaron entre 0 (*R. steindachneri*, Pacífico mexicano) y 0.006 (*R. bonasus*, Colombia) (Tabla 12). Para las especies o linajes que estuvieron representadas mediante una sola secuencia, la divergencia intraespecífica no se pudo calcular (Tabla 12). Los valores interespecíficos fluctuaron entre 0.018 (*R. bonasus*, Atlántico Norte vs *R. steindachneri*, Pacífico mexicano) y 0.126 (*Mobula japonica* vs *R. steindachneri*, Pacífico mexicano) (Tabla 12).

Tabla 12. Distancias genéticas para el género *Rhinoptera* calculadas a partir del modelo K-2P con el gen mitocondrial Cit-b. Valores en color rojo de la tabla, son las distancias intraespecíficas. De la diagonal hacia abajo se muestran las distancias interespecíficas. Colombia (Col), Golfo de México (GM), Pacífico mexicano (PM), Atlántico Norte (ANte).

Especies	<i>R. boCol</i>	<i>R. braGM</i>	<i>R. stPM</i>	<i>R. boNte</i>	<i>Mobula</i>
<i>R. bonasus</i> Col	0.006				
<i>R. brasiliensis</i> GM	0.069	0.001			
<i>R. steindachneri</i> PM	0.022	0.073	0.000		
<i>R. bonasus</i> ANte	0.021	0.060	0.018	0.002	
<i>Mobula japonica</i>	0.122	0.094	0.126	0.118	-

La topología derivada con el gen Cit-b mediante los tres métodos de reconstrucción filogenética (MP/MV/IB) fue similar a la topología con el gen COI, donde se observan dos clados principales. Sin embargo, para esta región mitocondrial no se obtuvieron secuencias de las especies *R. javanica* y *R. jayakari* al no estar disponibles en el GenBank. El árbol obtenido con Máxima verosimilitud presentó una incongruencia con las secuencias del Golfo de México al no quedar bien apoyadas con los valores de bootstrap (Apéndice 5). Las topologías obtenidas con MP e IB concuerdan con una estructura compuesta por dos grupos principales (Apéndice 4 y 6 respectivamente).

La topología mejor soportada por sus valores de apoyo a las ramas fue la de Inferencia Bayesiana. El primer clado está sustentado por el 100 % y 100 % BT (MP y MV respectivamente) y el 1 de PP, está dividido en dos grupos. El primero contiene a *R. bonasus* del Caribe colombiano y *R. steindachneri* del Pacífico Mexicano como especies hermanas con el 56 % y 72 % de soporte BT (MP y MV respectivamente) y el 0.99 de PP (IB) y el tercer clado lo forman secuencias de *R. bonasus* del Atlántico Norte, disponibles en el GenBank (79 % y 90 % BT, 0.96 PP). El segundo grupo contiene a las muestras de Campeche, las cuales son parafileticas y las muestras de Veracruz (Golfo de México) (Figura 11).

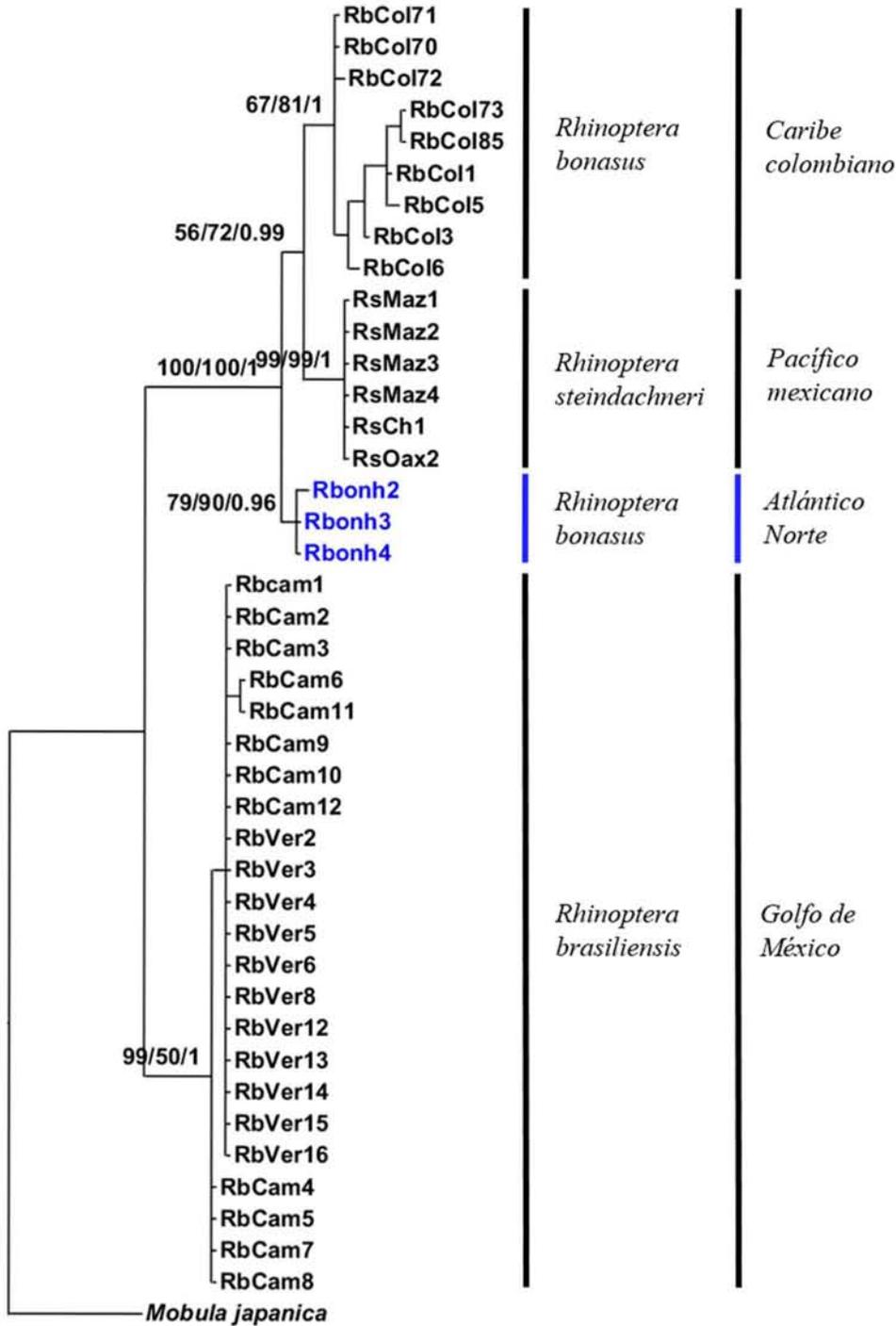


Figura 11. Árbol filogenético del gen *Cit-b* del ADNmt del género *Rhinoptera*. Las secuencias en colores indican que provienen del GenBank. Los valores son los soportes de Bootstrap calculados con 1000 réplicas (MP/MV) y Probabilidad Posterior (IB).

La red de haplotipos fue similar a la realizada con el gen COI, donde coincide con la agrupación cercana de los individuos recolectados de *R. steindachneri* del Pacífico oriental mexicano entre los individuos de *R. bonasus* recolectados en el Caribe colombiano y las secuencias del GenBank del Atlántico Norte. El Pacífico oriental mexicano exhibió un haplotipo dominante presente en los tres registros geográficos analizados de *R. steindachneri* (Figura 12).

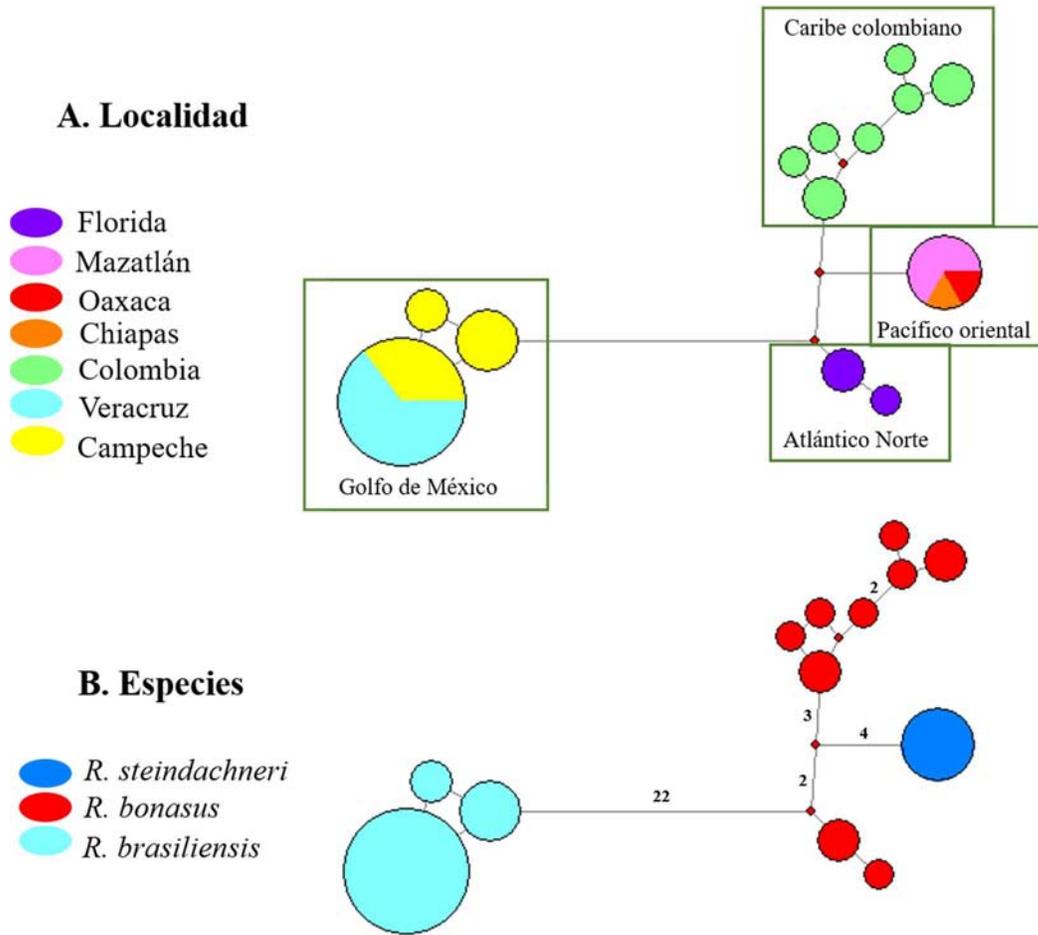


Figura 12. Red de haplotipos del gen Cit-b del ADNmt del género *Rhinoptera* distribuido en América. Los números indican los pasos mutacionales, sin número existe un solo paso mutacional entre los haplotipos. Los círculos indican los haplotipos, A. Localidad y B. Especie. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de los haplotipos; puntos pequeños representan los vectores intermedios que representan haplotipos extintos o no muestreados

8.3. Análisis basado en NADH2

Para esta región génica del género *Rhinoptera* se logró la amplificación de un un fragmento de 845 pares de bases (pb) y comprendió 40 secuencias, de las cuales 23 provienen de individuos recolectados en las diferentes localidades y 17 secuencias disponibles en el GenBank (Tabla 13).

Tabla 13. Secuencias de las especies del género *Rhinoptera* utilizadas en este estudio con el gen mitocondrial COI. Número de secuencias (n)

Especie	localidad	n	Identificación	Procedencia
<i>R. brasiliensis</i>	Campeche, Golfo de México	8	RbrCam	Este estudio
<i>R. brasiliensis</i>	Veracruz, Golfo de México	10	RbrVer	Este estudio
<i>R. steindachneri</i>	Mazatlán, Pacífico mexicano	2	RsMaz	Este estudio
<i>R. steindachneri</i>	Oaxaca, Pacífico mexicano	2	RsMaz	Este estudio
<i>R. steindachneri</i>	Chiapas, pacífico mexicano	1	RsOax	Este estudio
<i>R. bonasus</i>	Guajira, Caribe colombiano	8	RbCol	Este estudio
<i>R. bonasus</i>	Atlántico Norte	1	Rb	JQ518919
<i>R. cf. bonasus</i>	Senegal, oceano Atlántico	4	Rcfbon	JQ518923 JQ518918
<i>R. steindachneri</i>	Golfo de California	4	Rsth	HQ540559, HQ540560 HQ540561
<i>R. steindachneri</i>	Costa Pacífica Baja California	1	Rsth4	HQ540562
<i>R. cf. steindachneri</i>	Mississippi, Golfo de México	1	Rcfst	JQ518921
<i>R. jayakari</i>	Mar Rojo	6	Rjay	KF899683, KF899680, KF899682, KF899679, KF899681
<i>R. neglecta</i>	Golfo de Carpentaria	1	Rneg	JQ518920
<i>R. javanica</i>	Indonesia	3	Rjav	JQ518924, KM396924
<i>Mobula japonica</i>	Oceano Pacífico central	1	Mobula	JX392983

El análisis de homología mediante BLAST de las secuencias de nucleótidos del gen NADH2 se obtuvo que las muestras de Campeche y Veracruz obtuvieron un mayor porcentaje de identidad con *R. cf. steindachneri*, mientras que las muestras de Colombia, Mazatlán, Chiapas y Oaxaca obtuvieron un 99 % de identidad con *R. cf. bonasus*. El modelo de evolución que mejor se ajustó a este set de datos según el jModelTest fue HKY+I.

Los valores de divergencia intraespecífica oscilaron entre 0 (*R. steindachneri*, Pacífico mexicano y *R. brasiliensis*, sureste del Golfo de México) y 0.028 (*R. steindachneri*, Golfo de California) (Tabla 14). Para las especies o linajes que estuvieron representadas mediante una sola secuencia, la

divergencia intraespecífica no se pudo calcular (Tabla 14). Los valores interespecíficos fluctuaron entre 0.000 (*R. cf. steindachneri*, Norte del Golfo de México vs *R. brasiliensis*, sureste del Golfo de México), 0.001 (*R. cf. bonasus*, Senegal vs *R. bonasus*, Caribe colombiano) y 0.202 (*Mobula japonica* vs *R. steindachneri*, costa del Pacífico de Baja California) (Tabla 14).

Tabla 14. Distancias genéticas para el género *Rhinoptera* calculadas a partir del modelo K-2P con el gen mitocondrial NADH2. Valores en color rojo de la tabla, son las distancias intraespecíficas. De la diagonal hacia abajo se muestran las distancias interespecíficas. Colombia (Col), Golfo de México (GM), Pacífico mexicano (PM), Atlántico Norte (ANte), Costa Pacífico Baja California (CPBC).

Especies	<i>R. boCol</i>	<i>R. brGM</i>	<i>R. stPM</i>	<i>R. boNte</i>	<i>R. stCP</i>	<i>R. jay</i>	<i>R. jav</i>	<i>R. ne</i>	<i>R. stGC</i>	<i>R cf. b</i>	<i>R cf. s</i>	<i>Mobula</i>
<i>R. bonasus Col</i>	0.001											
<i>R. brasiliensis GM</i>	0.086	0.000										
<i>R. steindachneri PM</i>	0.016	0.080	0.000									
<i>R. bonasus ANte</i>	0.020	0.094	0.019	-								
<i>R. steindachneri CPBC</i>	0.073	0.101	0.062	0.073	-							
<i>R. jayakari</i>	0.095	0.051	0.098	0.103	0.121	0.006						
<i>R. javanica</i>	0.120	0.117	0.113	0.121	0.147	0.109	0.005					
<i>R. neglecta</i>	0.118	0.117	0.112	0.120	0.146	0.112	0.017	-				
<i>R. steindachneri GC</i>	0.099	0.018	0.095	0.109	0.112	0.063	0.127	0.127	0.028			
<i>R cf. bonasus</i>	0.001	0.086	0.015	0.019	0.073	0.095	0.120	0.118	0.100	-		
<i>R cf. steindachneri</i>	0.086	0.000	0.080	0.094	0.101	0.051	0.117	0.117	0.018	0.086	-	
<i>Mobula japonica</i>	0.166	0.147	0.168	0.172	0.202	0.147	0.170	0.163	0.158	0.166	0.147	-

La mejor topología derivada de las diferentes inferencias filogenéticas analizadas con la región mitocondrial NADH2 por sus valores de apoyo a las ramas fue por Inferencia Bayesiana. A diferencia de las otras dos regiones mitocondriales COI y Cit-b, se observó que la secuencia que corresponden a *R. cf. bonasus* de Senegal, Atlántico disponible en GenBank tiene mayor afinidad con *R. bonasus* del Caribe colombiano con el 98 % y 97 % de soporte BT (MP y MV respectivamente) y el 1 de PP (IB) (Figura 13). Así mismo, las muestras de las localidades de Campeche y Veracruz (Golfo de México) contienen la secuencia de *R. cf. steindachneri* del Norte del Golfo de México, disponible en GenBank sustentado por el 80 % y 89 % (BT) y 0.99 (PP), también se observa que *R. javanica* es especie hermana con *R. neglecta* (Figura 13). Este análisis difiere de MP en las secuencias de *R. jayakari* que están como especie hermana en el clado que contiene a las muestras del Golfo de México y Golfo de California (Apéndice 7), mientras que en las topologías derivadas de MV e IB se encuentra formando un clado aparte (Apéndice 8 y 9).

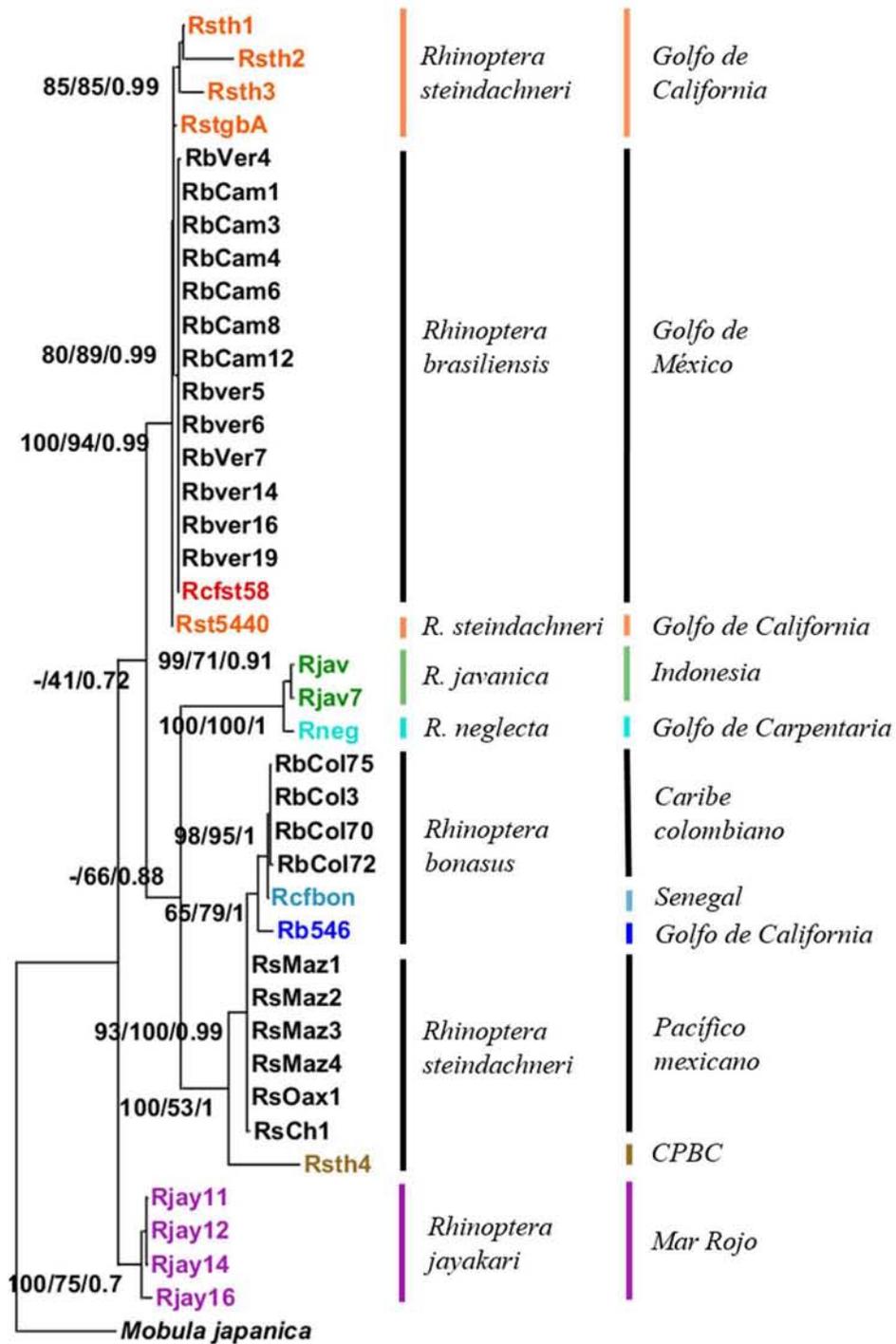


Figura 13. Árbol filogenético del gen NADH2 del ADNmt del género *Rhinoptera*. Las secuencias en colores indican que provienen del GenBank. Los valores son los soportes de Bootstrap calculados con 1000 réplicas (MP/MV) y Probabilidad Posterior (IB).

En la red de haplotipos se presenta la agrupación de acuerdo a las localidades y por especie, en la cual se puede observar a los individuos de *R. steindachneri* recolectados en el Pacífico oriental mexicano (Mazatlán, Oaxaca y Chiapas) muestran una amplia divergencia con respecto a las secuencias disponibles de *R. steindachneri* en GenBank del Golfo de California y la Costa del Pacífico de la península de Baja California (CPBC). Mientras que la secuencia disponible en GenBank *R. cf. steindachneri* que corresponde al Norte del Golfo de México (Mississippi) comparte el mismo haplotipo con los individuos de *R. brasiliensis* recolectados en el Golfo de México (Veracruz y Campeche) (Figura 14).

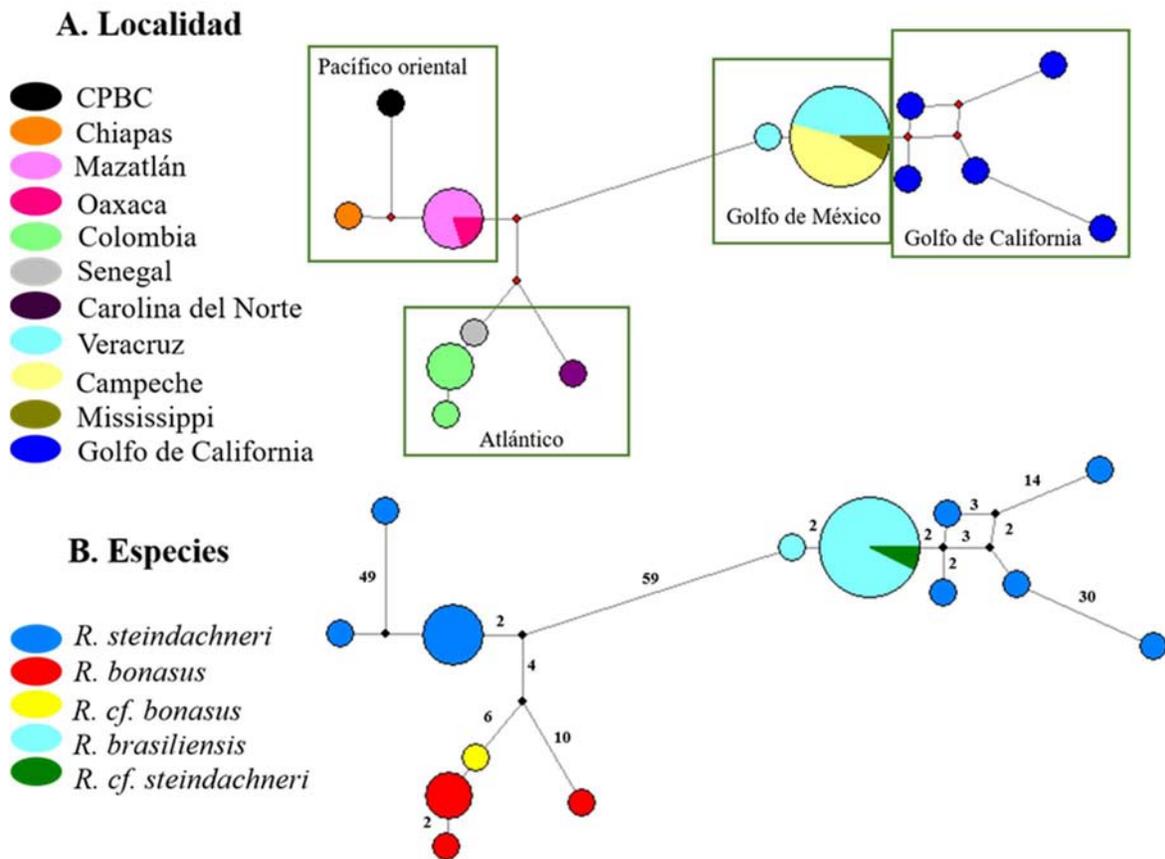


Figura 14. Red de haplotipos del gen NADH2 del ADNmt del género *Rhinoptera* distribuido en América. Los números indican los pasos mutacionales, sin número existe un solo paso mutacional entre los haplotipos. Los círculos indican los haplotipos, A. Localidad y B. Especie. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de los haplotipos; puntos pequeños representan los vectores intermedios que representan haplotipos extintos o no muestreados.

8.4. Análisis basado en RAG1

El alineamiento final del gen RAG1 del ADNn para el género *Rhinoptera* se logró la amplificación de un un fragmento de 801 pb y comprendió 17 secuencias de las cuales 14 se amplificaron en este estudio, también se incluyeron tres secuencias disponibles en el Genbank (Tabla 15).

Tabla 15. Secuencias de las especies del género *Rhinoptera* utilizadas en este estudio con el gen mitocondrial COI. Número de secuencias (n).

Especie	localidad	n	Identificación	Procedencia
<i>R. brasiliensis</i>	Campeche, Golfo de México	8	RbrCam	Este estudio
<i>R. brasiliensis</i>	Veracruz, Golfo de México	10	RbrVer	Este estudio
<i>R. steindachneri</i>	Mazatlán, Pacífico mexicano	2	Rbs	Este estudio
<i>R. steindachneri</i>	Oaxaca, Pacífico mexicano	2	RsMaz	Este estudio
<i>R. steindachneri</i>	Chiapas, pacífico mexicano	1	RsOax	Este estudio
<i>R. bonasus</i>	La Guajira, caribe colombiano	8	RsCh	Este estudio
<i>R. bonasus</i>	Atlántico Norte	1	RbCol	AY949029
<i>R. steindachneri</i>	Sri Lanka	1	Rbon	KM364982
<i>Mobula japanica</i>	Oceano Pacífico central	1	Mobula	JX392983

El análisis de homología BLAST del NCBI de las secuencias de nucleótidos del gen RAG 1 se obtuvo que las muestras de Campeche, Veracruz, Colombia y Chiapas tienen mayor proporción de identidades encontradas con *R. bonasus* del BLAST. El modelo de evolución que mejor se ajusta a este set de datos según el jModelTest es HKY.

Para las especies o linajes que estuvieron representadas mediante una sola secuencia, la divergencia intraespecífica no se pudo calcular (Tabla 16). El valor interespecífico fluctuaron entre 0.000 (*Mobula japanica* vs *R. steindachneri*, GenBank), 0.001 (*R. steindachneri*, Pacífico mexicano vs *R. bonasus*, Atlántico Norte, GenBank) y 0.026 (*R. steindachneri*, GenBank vs *R. bonasus*, Atlántico Norte y *Mobula japanica* vs *R. bonasus*, Atlántico Norte) valores en la diagonal (Tabla 16).

Tabla 16. Distancias genéticas para el género *Rhinoptera* calculadas a partir del modelo K-2P con el gen nuclear RAG1. Valores en color rojo de la tabla, son las distancias intraespecíficas. De la diagonal hacia abajo se muestran las distancias interespecíficas.

	<i>R. boCol</i>	<i>R. braGM</i>	<i>R. stPM</i>	<i>R. boNte</i>	<i>R. stgb</i>	<i>Mobula</i>
<i>R. bonasus Col</i>	0.004					
<i>R. brasiliensis GM</i>	0.012	0.000				
<i>R. steindachneri PM</i>	0.003	0.009	-			
<i>R. bonasus ANte</i>	0.004	0.010	0.001	0.000		
<i>R. steindachneri gbank</i>	0.026	0.025	0.024	0.026	-	
<i>Mobula japonica</i>	0.026	0.025	0.024	0.026	0.000	-

Con el gen nuclear RAG 1, la topología mejor soportada por sus valores de apoyo a las ramas fue la derivada de Inferencia Bayesiana (Apéndice 12); Sin embargo, las topologías de MP y MV (Apéndice 18 y 19) concuerdan con una estructura compuesta por dos grupos principales con altos valores de soporte y como especie hermana de estos dos grupos esta *R. steindachneri*. (Apéndice 10 y 11). El primer clado con 94 % y 99 % de soporte BT (MP y MV respectivamente) y el 1 de PP (IB) (Figura 15) contiene agrupadas las muestras que corresponden a *R. bonasus* del Caribe colombiano, las secuencias de *R. bonasus* del Atlántico Norte, disponibles en el GenBank y por último a *R. steindachneri* del Pacífico Mexicano. El otro grupo contiene las muestras que corresponden a *R. brasiliensis* de las localidades de Campeche y Veracruz (Golfo de México) soportado por el 98 % y 100 % (BT) y 1 (PP) (Figura 15).

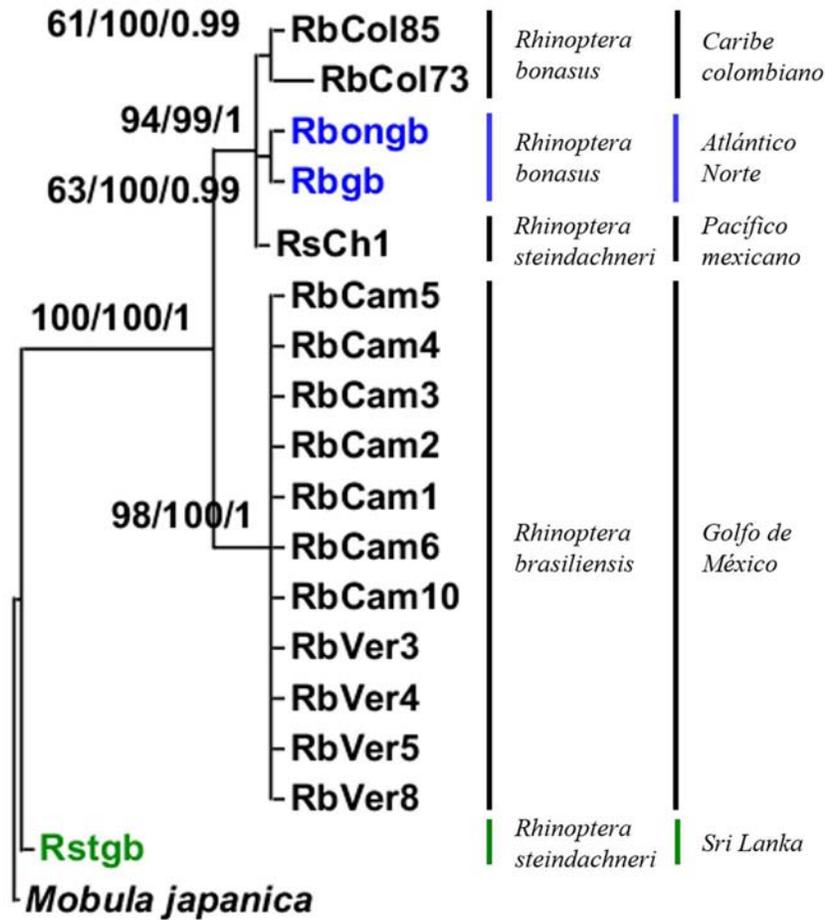


Figura 15. Árbol filogenético del gen RAG 1 del ADNn del género *Rhinoptera*. Las secuencias en colores indican que provienen del GenBank. Los valores son los soportes de Bootstrap calculados con 1000 réplicas (MP/MV) y Probabilidad Posterior (IB).

Con la red de haplotipos las relaciones que se presentan con las localidades de la distribución de las especies del género *Rhinoptera* apoya la validez de las agrupaciones realizadas en la topología del árbol, donde se observa que los ejemplares de *R. brasiliensis* del Golfo de México (Campeche y Veracruz) exhibió un haplotipo dominante y separado por siete pasos mutacionales de los demás haplotipos, también se observa al individuo recolectado de *R. steindachneri* en el Pacífico oriental mexicano (Chiapas), es más cercanas con los individuos de *R. bonasus* recolectados en el Caribe colombiano y la secuencia del GenBank del Atlántico Norte, separados por un pasos mutacionales (Figura 16).

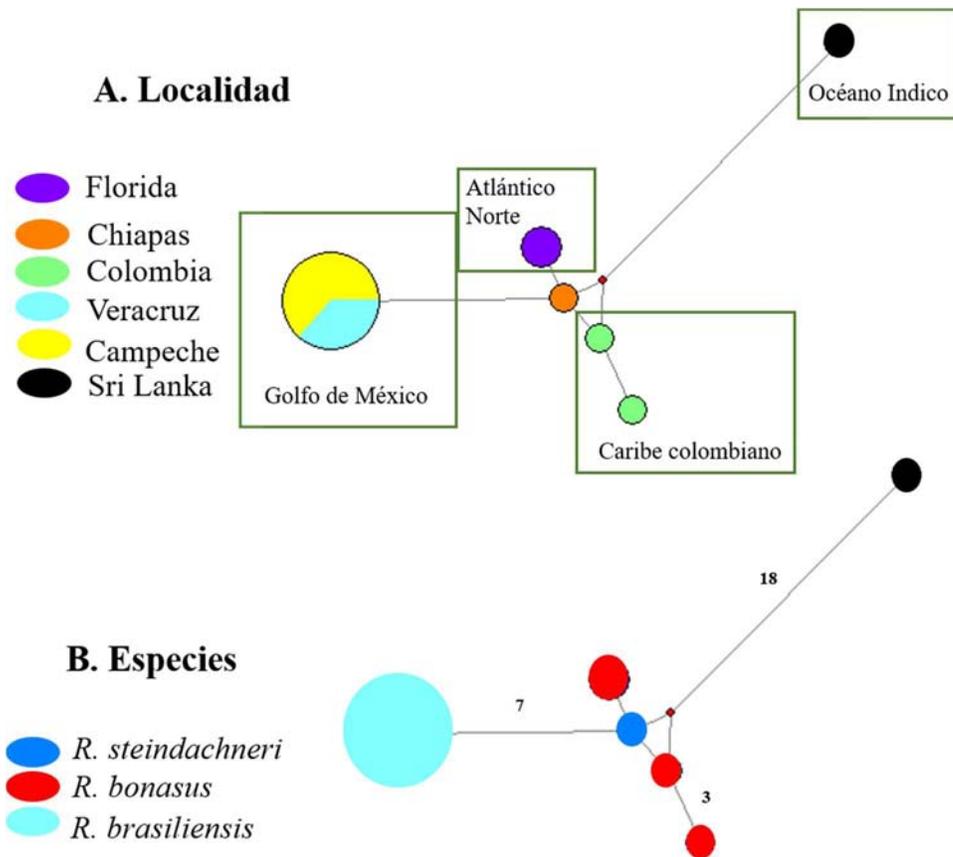


Figura 16. Red de haplotipos del gen RAG 1 del ADNn del género *Rhinoptera* distribuido en América. Los números indican los pasos mutacionales, sin número existe un solo paso mutacional entre los haplotipos. Los círculos indican los haplotipos, A. Localidad y B. Especie. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de los haplotipos; puntos pequeños representan los vectores intermedios que representan haplotipos extintos o no muestreados.

8.5. Análisis basado en múltiples genes

El alineamiento final utilizado en este análisis de genes concatenados de la región del ADNmt (Cit- b + NADH2 + COI) para el género *Rhinoptera* se logró la amplificación de un fragmento de 1764 pb y comprendió 18 secuencias, de las cuales se seleccionaron las mismas secuencias que amplificaron en cada uno de los genes y se incluyó tres secuencia disponibles en el GenBank (Tabla 17).

Tabla 17. Secuencias de las especies del género *Rhinoptera* utilizadas en este estudio de la región del ADNmt (Cit-b + NADH2 + COI). Número de secuencias (n).

Especie	localidad	n	Identificación	Procedencia
<i>R. brasiliensis</i>	Campeche, Golfo de México	4	RbrCam	Este estudio
<i>R. brasiliensis</i>	Veracruz, Golfo de México	5	RbrVer	Este estudio
<i>R. steindachneri</i>	Mazatlán, Pacífico mexicano	2	Rbs	Este estudio
<i>R. steindachneri</i>	Chiapas, pacífico mexicano	1	RsOax	Este estudio
<i>R. bonasus</i>	La Guajira, caribe colombiano	3	RsCh	Este estudio
<i>R. bonasus</i>	Atlántico Norte	1	RbCol	GenBank
<i>R. steindachneri</i>	Sri Lanka	1	Rbon	KM364982
<i>Mobula japonica</i>	Oceano Pacífico central	1	Mobula	JX392983

Los valores de divergencia intraespecífica oscilaron entre 0.001 (*R. brasiliensis*, Golfo de México) y 0.002 (*R. steindachneri*, Pacífico mexicano) (Tabla 18). Para las especies o linajes que estuvieron representadas mediante una sola secuencia, la divergencia intraespecífica no se pudo calcular (Tabla 18). Los valores interespecíficos fluctuaron entre 0.017 (*R. bonasus*, Atlántico Norte vs *R. steindachneri*, Pacífico mexicano) y 0.151 (*Mobula japonica* vs *R. steindachneri*, Pacífico mexicano) (Tabla 18). El modelo de evolución que mejor se ajustó a este juego de datos de cada gen según el jModelTest fue HKY+G.

Tabla 18. Distancias genéticas para el género *Rhinoptera* calculadas a partir del modelo K-2P de la región del ADNmt (Cit-b + NADH2 + COI). Valores en color rojo de la tabla, son las distancias intraespecíficas. De la diagonal hacia abajo se muestran las distancias interespecíficas.

Especies	<i>R. boCol</i>	<i>R. braGM</i>	<i>R. stPM</i>	<i>R. boNte</i>	<i>R. stgb</i>	<i>Mobula</i>
<i>R. bonasus Col</i>	0.003					
<i>R. brasiliensis GM</i>	0.079	0.001				
<i>R. steindachneri PM</i>	0.018	0.077	0.002			
<i>R. bonasus ANte</i>	0.019	0.079	0.017	-		
<i>R. steindachneri gbank</i>	0.092	0.075	0.088	0.091	-	
<i>Mobula japonica</i>	0.145	0.127	0.151	0.146	0.146	-

La topología basada en los tres genes del ADNmt mejor soportada por sus valores de apoyo a las ramas fue la derivada de de Máxima parsimonia (Apéndice 13); No obstante, las topologías de MV e IB (Apéndice 14 y 15) concuerdan con una estructura compuesta por dos grupos principales, el primero de ellos incluye solo a la especie *R. steindachneri* de Sri Lanka, disponible en el GenBank, el otro clado se divide en dos subclados: el primero contiene a las muestras de *R. steindachneri* del Pacífico mexicano con el 100 % y 98 % de soporte BT (MP y MV respectivamente) y el 1 de PP (IB) (Figura 19). En el otro subclado con el 87 % y 71 % de soporte BT (MP y MV respectivamente) y el 0.51 de PP (IB) incluye a *R. bonasus* del Caribe colombiano y la secuencia del Atlántico Norte disponible en el GenBank (Figura 17).

El segundo grupo está compuesto por las muestras de las localidades de Campeche y Veracruz (Golfo de México) con el 100 % y 34 % de soporte BT (MP y MV respectivamente) y el 1 de PP (IB) (Figura 17).

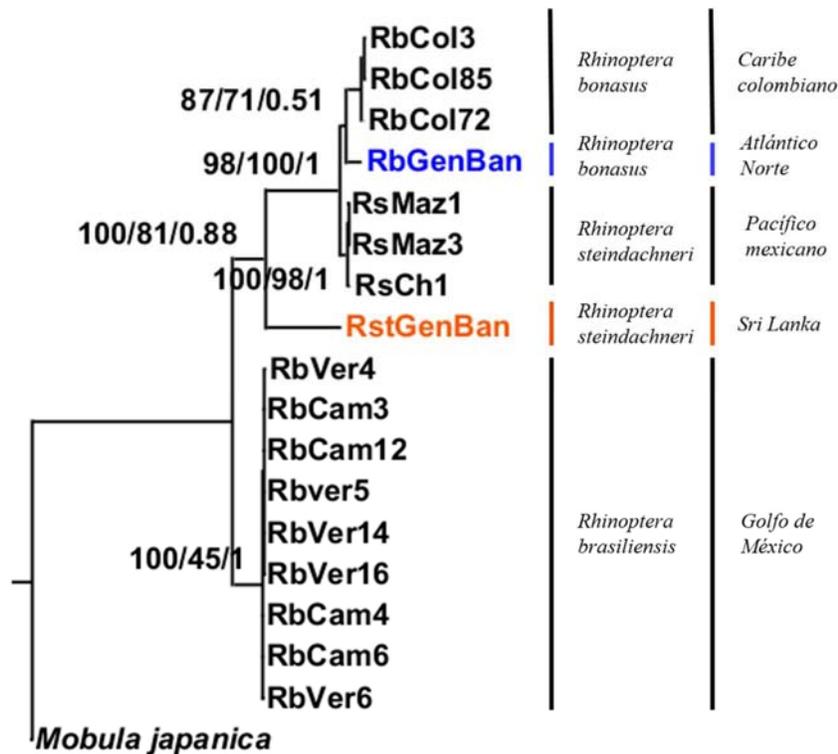


Figura 17. Árbol filogenético secuencias concatenadas de los genes (*Cit-b* + ND2 + COI) del ADNmt del género *Rhinoptera*. Las secuencias en colores indican que provienen del GenBank. Los valores son los soportes de Bootstrap calculados con 1000 réplicas (MP/MV) y Probabilidad Posterior (IB).

Con la red de haplotipos las relaciones que se presentan con las localidades de la distribución de las especies del género *Rhinoptera* apoya la validez de las agrupaciones realizadas en la topología del árbol, donde se observa haplotipos exclusivos para cada localidad, los ejemplares de *R. brasiliensis* del Golfo de México (Campeche y Veracruz) están separados de los otros haplotipos por más de 100 pasos mutacionales, mientras los individuos recolectados de *R. steindachneri* en el Pacífico oriental mexicano (Mazatlán, Oaxaca y Chiapas), muestran una amplia divergencia con respecto a las secuencias de *R. steindachneri* disponibles en GenBank de Sri Lanka y son más cercanas con las secuencias de *R. bonasus* del Atlántico Norte y Caribe colombiano (Figura 18).

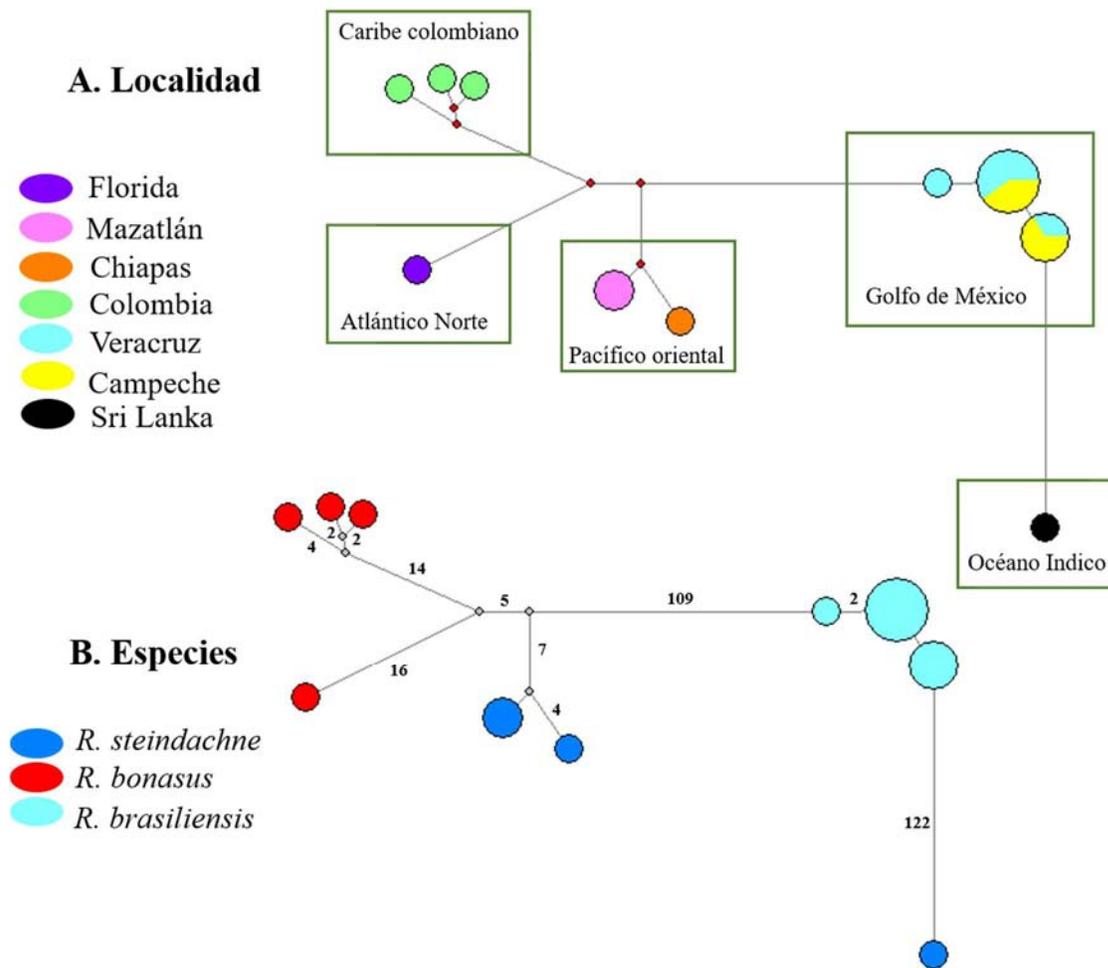


Figura 18. Red de haplotipos ecuencias concatenadas de los genes (*Cit-b* + ND2 + COI) del ADNmt del género *Rhinoptera* distribuido en América. Los números indican los pasos mutacionales, sin número existe un solo paso mutacional entre los haplotipos. Los círculos indican los haplotipos, A. Localidad y B. Especie. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de los haplotipos; puntos pequeños representan los vectores intermedios que representan haplotipos extintos o no muestreados.

8.6. Estimación del tiempo de divergencia.

La prueba de razón de verosimilitud global (LRT), de acuerdo al criterio AICc empleado para la selección del mejor modelo de sustitución nucleotídica HKY+G proporcionó el mejor ajuste a los datos ($2(\log L_0 - \log L_1) = 7.21826$; g.l. = 12; $(p = 0,05) = 21.026$). Los puntajes de máxima verosimilitud para los modelos de reloj molecular relajando y forzando el reloj molecular fueron:

H_0 = Reloj molecular forzado (HKY+G + Reloj = L_0): $LnL = 1147,32735$

H_1 = Reloj molecular relajado (HKY+G = L_1): $LnL = 1150,93648$

Este resultado indica que las secuencias de los ejemplares incluidos en el análisis (Ingroup) evolucionan con una tasa que es homogénea a lo largo del árbol filogenético. La topología obtenida con COI fue congruente entre los tres análisis (MP, MV e IB). La divergencia entre *Myliobatis californica* y *Mobula japonica* quedó fechada en 53.94 Ma (Nodo 1, Figura 19); la divergencia entre *Mobula japonica* y las distintas especies de *Rhinopteras* se ubica en 43.25 Ma (95 % HPD: 53.18 – 33.2) (Nodo 2). El origen del Clado 1 (*R. brasiliensis*, *R. steindachneri* GC + *R. jayakari*) fue estimado en 9.52 Ma (95 % HPD: 15.46 – 4.93) (nodo 5), el origen del Clado 2 (*R. bonasus* + *R. steindachneri*) fue estimado en 5.84 Ma (95 % HPD: 10.08 – 2.73) (nodo 9) para el clado 3 (*R. javanica*) su divergencia fue estimada en 4.99 Ma (95 % HPD: 9.07 – 2.02) (nodo 13, Figura 19). Las fechas de las estimaciones e intervalos superiores e inferiores al 95 % de las densidades posteriores mayores (HPD 95 %) se encuentran en el apéndice 16.

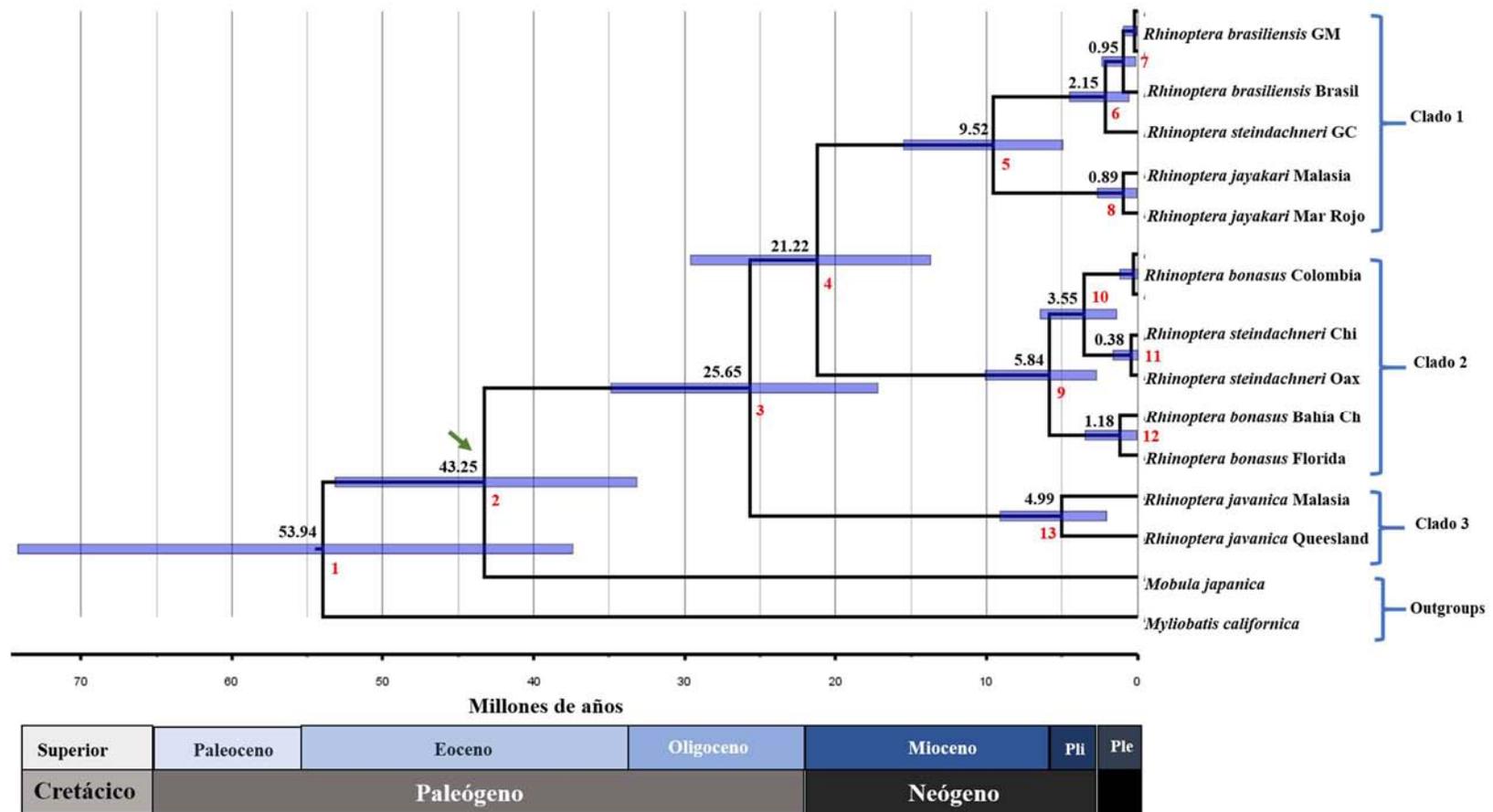


Figura 19. Árbol filogenético con estimación de los tiempos de divergencia para *Rhinoptera* y grupos cercanamente relacionados (*Mobula* y *Myliobatis*) basados en el análisis del gen COI del ADNmt con BEAST. La flecha señala el punto de calibración. Los números en rojo son los nodos. Las estimaciones puntuales de las edades se dan por encima de cada nodo y barras horizontales azules transparentes, denotan las estimaciones de las divergencias en intervalos superiores e inferiores al 95 % de las densidades posteriores mayores (HPD).

Los eventos durante el Mioceno-Plioceno marcaron la divergencia de las *Rhinoptera* distribuidas en América. La especiación ocurrida entre *R. bonasus* del Caribe colombiano y *R. steindachneri* del Pacífico oriental mexicano fue estimado en 3.55 Ma (95 % HPD: 6.44 – 1.37) mientras que los eventos de divergencia entre las muestras de *R. brasiliensis* del Golfo de México y la secuencia de *R. brasiliensis* de Sao Paulo, Brasil fue estimada en 0.95 Ma (95 % HPD: 2.35 – 0.1) siendo la más reciente. La divergencia entre (*R. steindachneri* GC + *R. brasiliensis* GM) fue estimada en 2.15 Ma (95 % HPD: 4.49 – 0.56) (Figura 20).

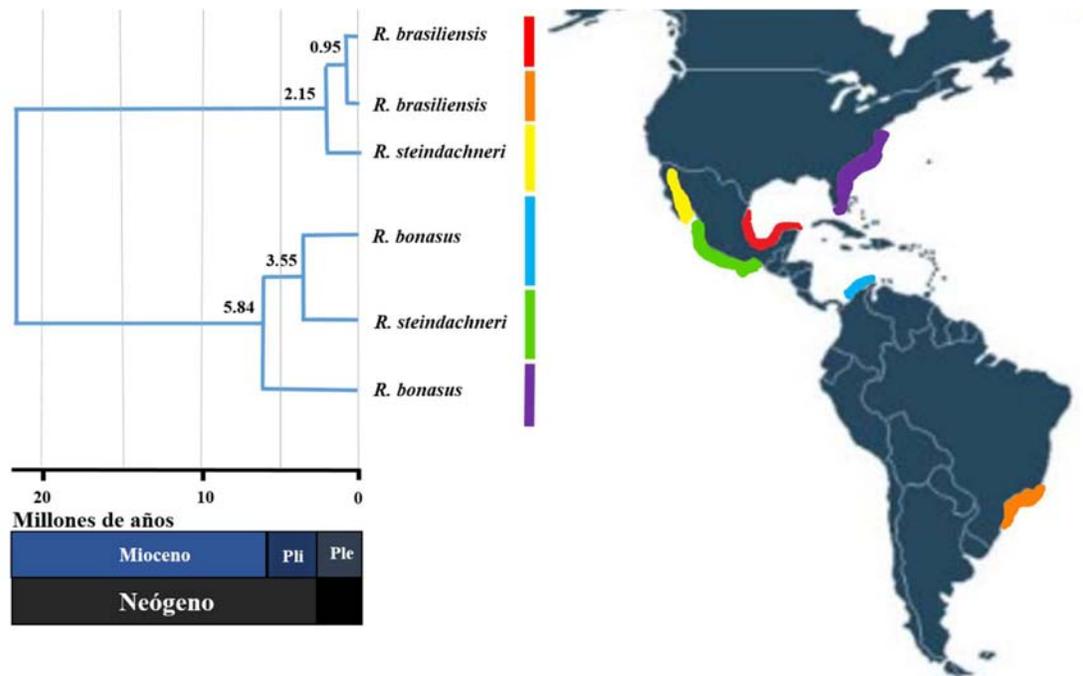


Figura 20. Árbol filogenético con estimación de los tiempos de divergencia para las especies de *Rhinoptera* distribuidas en América basados en el análisis del gen COI del ADNmt con BEAST. Las estimaciones puntuales de las edades se dan por encima de cada nodo las barras de colores indican la distribución geográfica.

IX. DISCUSIÓN

9.1. Inferencia filogenética.

Las relaciones evolutivas del género *Rhinoptera* que ofrece el análisis de los genes mitocondriales COI, *Cit-b*, NADH2 y el gen nuclear RAG1, utilizando tres métodos de inferencias de reconstrucción, resultaron árboles filogenéticos con topologías muy similares. El hecho de que diferentes conjuntos de datos y métodos de reconstrucción muestren las mismas relaciones filogenéticas, constituyen criterios más sólidos referente a la confiabilidad de las topologías (Chen *et al.*, 2003).

La reconstrucción filogenética indica la existencia de dos clado o linajes evolutivos fundamentales, uno de los linajes incluye las especies de *Rhinoptera brasiliensis*, mientras que en el otro se agrupan las especies *Rhinoptera bonasus* y *Rhinoptera steindachneri*. El arreglo de las especies en el linaje de *R. brasiliensis* corresponde con las similitudes que éstas presentan en cuanto a la característica morfológica de nueve hileras dentales definidos para la especie por Bigelow & Schroeder (1953) y Menni & Stehmann (2000). De acuerdo a lo planteado por estos autores y la notable afinidad genética y morfológica entre los ejemplares de Campeche y Veracruz del presente estudio con *R. brasiliensis* coincide con lo reportado por Naylor *et al.* (2012) y McDowell & Fisher (2013). Por lo tanto es importante destacar que en este estudio se ha podido verificar la presencia y distribución de *R. brasiliensis* en el sureste del Golfo de México.

Con base en los resultados de este estudio se puede sugerir que *R. brasiliensis* no debería seguir siendo considerada endémica y restringida a las costas de Brasil entre Río de Janeiro y Rio Grande do Sul (Bigelow & Schroeder, 1953; Menni & Stehmann, 2000), esto es confirmado por los registros de su presencia en la costa del Caribe colombiano en Isla Salamanca, Magdalena (Acero & Garzón, 1983), Golfo de México frente a las costas de Tuxpan, Veracruz (González & Montes, 1996) y en las costas de Venezuela (delta del río Orinoco) (Lasso-Alcalá, 2004), Crooked Island (Islas Bahamas) y la Bahía de Tampa, costa oeste central de Florida (Norte del Golfo de México) (McDowell & Fisher, 2013). Con lo cual se ampliaría su rango de distribución.

Schwartz (1990), Neer & Thompson (2005) y Collins *et al.* (2007), mencionaban que las poblaciones de *R. bonasus* en el Atlántico occidental (sur de Nueva Inglaterra a Brasil) y el Golfo de México (Florida a la Península de Yucatán) están separadas. Sin embargo, los datos de éste estudio concuerdan con lo reportado por McDowell & Fisher (2013), quienes sugieren la presencia de dos linajes separados de *R. bonasus*, uno en la zona del Norte del Golfo de México junto con las muestras de la Bahía de Chesapeake, Atlántico Norte y *R. bonasus* de Brasil con las muestras de Colombia. Esto es sustentado por las topologías de los tres análisis de inferencias filogenéticas, en la que *R. bonasus* del Atlántico Norte se presenta como especies parafiléticas con respecto al clado (*R. bonasus* + *R. steindachneri*).

Según el catálogo sistemático de las rayas y especies afines de México de 1996, el único registro positivo de la presencia de *R. bonasus* en México fue el que proporcionó Castro-Aguirre (1965), con base en un individuo capturado durante un arrastre tipo camarero, donde se le identificó con relativa facilidad, por la presencia de siete filas de dientes en la placa dentaria superior. No obstante, a pesar de realizar amplios esfuerzos de muestreo en el Golfo de México, no se logró corroborar la presencia de *R. bonasus* usando el criterio de la placa dental con siete hileras, con lo cual, se descartaría la presencia de *R. bonasus* en el sureste del Golfo de México.

Respecto a *Rhinoptera steindachneri* Sandoval-Castillo & Rocha-Olivares (2011), indicaron que los ejemplares del Golfo de California y la Costa del Pacífico de Baja California se caracterizaron por linajes mitocondriales muy divergentes; las topologías de las diferentes inferencias filogenéticas en el presente estudio también muestra una amplia divergencia de la secuencia disponible en GenBank de *R. steindachneri* de la CPBC con respecto a las secuencias de *R. steindachneri* disponibles en GenBank del Golfo de California y los individuos de *R. steindachneri* recolectados en el Pacífico oriental mexicano (Mazatlán, Oaxaca y Chiapas). Sin embargo, otros estudios genéticos también han revelado una ruptura filogeográfica de los linajes mitocondriales y una distinción genética entre los batoideos que habitan el Golfo de California en relación con los de la Costa del Pacífico de Baja California. Tal es el caso de *Rhinobatos productus* (Sandoval-Castillo *et al.*, 2004), *Rhinoptera steindachneri* (Sandoval-Castillo & Rocha-Olivares, 2011), *Gymnura marmorata* (Smith *et al.*, 2009) y *Zapteryx exasperata* (Castillo-Páez *et al.*, 2014).

Por otra parte, el entendimiento de las relaciones filogenéticas mencionadas puede refinarse parcialmente a partir de la red de haplotipos. Según Vázquez-Domínguez *et al.* (2009) a partir de

una red pueden efectuarse las siguientes predicciones: 1) los haplotipos con mayor frecuencia tienen alta probabilidad de representar alelos ancestrales; 2) los haplotipos con múltiples conexiones muy probablemente son ancestrales; 3) dentro de la red, los haplotipos ancestrales están en el interior y los haplotipos nuevos tienen mayor probabilidad de ser terminales; 4) se espera que los haplotipos ancestrales tengan una amplia distribución geográfica, básicamente porque los individuos que poseen esos haplotipos han tenido mucho tiempo para dispersarse; y 5) se predice que los haplotipos con una conexión estén unidos a los haplotipos de la misma población, dado que han evolucionado recientemente y por lo tanto sin tiempo para dispersarse. Sobre la base de estas predicciones y a partir de la red obtenida es posible sugerir entonces para *R. brasiliensis* que: a) muy probablemente representa un haplotipo ancestral, dada su mayor frecuencia y amplia distribución geográfica (Desde el Golfo de México hasta Brasil); b) *R. bonasus* presenta dos poblaciones separadas geográficamente, una al norte del Golfo de México junto con el Atlántico Norte y la otra en el Caribe colombiano, al no existir la unión de sus haplotipos y por lo tanto con el tiempo se han dispersado entre ellos; c) *R. steindachneri* del Golfo de California, posiblemente constituya un haplotipo nuevo, dada su posición terminal en la red, el cual se habría originado dentro del mismo Golfo de California sin que haya transcurrido aún el tiempo suficiente para que se disperse. Por otra parte, el elevado número de pasos mutacionales que separan *R. steindachneri* del CPBC con el Golfo de California y del GC con el Pacífico mexicano, es consistente con la sugerencia de que posiblemente sean linajes diferentes.

En relación con esto último, y atendiendo las relaciones plasmadas en los árboles obtenidos para *R. steindachneri* del GC, CPBC y Pacífico mexicano, es trascendente traer a colación que constituyen linajes notoriamente divergentes en términos de distancia genética, con una divergencia estimada superior a la reportada por Sandoval-Castillo & Rocha-Olivares (2011), quienes sugieren la presencia de las fuerzas de la diversificación en la región y la posible existencia de especiación críptica debido a que la localidad tipo de *R. steindachneri* está dentro del GC. El nivel de divergencia evolutiva como criterio para definir límites entre especies congénicas ha recibido una atención particular por parte de los investigadores y ha conducido a la revisión del estatus taxonómico de las especies de varios grupos zoológicos. De este modo, es uno de los mayores grados de divergencia intraespecífica reportada en elasmobranquios, incluso superando las divergencias interespecíficas en otros Batoideos (Heist, 1999; Sandoval-Castillo *et al.*, 2004; Richards *et al.*, 2009; Sandoval-Castillo & Rocha-Olivares, 2011) (Apendice 17).

Con base en el porcentaje de diferenciación del 2 % establecido por Hebert *et al.* (2003), Ward *et al.* (2005) y Steinke *et al.* (2009) la clara divergencia genética de los clados en el análisis filogenético y de acuerdo al nivel de divergencia intraespecífica observada en el género *Rhinoptera* se sugiere la validación de las especies *R. brasiliensis* en el Golfo de México la cual tuvo una divergencia menor a 2 % (0.10 ± 0.001), de la misma manera la secuencia disponible en GenBank del Norte del Golfo de México denominada *R. cf. steindachneri*, en la topología obtenida con el gen NADH2 se encuentra contenida en el clado con las muestras de Campeche y Veracruz, la distancia interespecífica fue nula (0.00 ± 0.000). De igual forma, los valores de distancia genética de *R. bonasus* de Colombia respecto a las del Atlántico Norte fueron cercanos al 2 %. En relación a la secuencia disponible en GenBank de *R. cf. bonasus* del Atlántico Oriental (Senegal), muestra una afinidad con las muestras del Caribe colombiano en la topología obtenida con el gen NADH2 y un valor de distancia interespecífica menor a 2 % (0.06 ± 0.000), lo que podría confirmaría su afinidad con la población del Atlántico suroccidental.

De acuerdo con Hebert *et al.* (2004), las especies también pueden reconocerse a partir de un valor umbral de divergencia de diez veces la variación intraespecífica media (*10x rule*) para delimitar especies y la idea subyacente es que la divergencia intraespecie sea menor que la divergencia interespecie (Frézal & Leblois, 2008). Esta propuesta fue sugerida basándose en evidencia empírica obtenida para grandes conjuntos de secuencias (principalmente de organismos sexuales), a partir de la universalización de las secuencias del gen COI para la identificación de especies (Birky *et al.*, 2010). Entonces comparando nuevamente con el valor obtenido por medio de la regla de 10x (Heber *et al.* 2004) en el caso de *R. steindachneri* del Pacífico mexicano es adecuado demostrando que podría ser un buen candidato para la búsqueda del denominado “Barcode gap” con el gen COI del ADNmt ya que el espacio obtenido entre la máxima variación intraespecífica (2.02 %) y la mínima variación interespecífica (7.85 %) es bastante amplio. Según Meyer & Paulay (2005) mientras el “Barcode gap” sea mas amplio es mucho mas útil para delimitar especies.

En este sentido, dado que la divergencia obtenida entre *R. steindachneri* del Pacífico mexicano y *R. steindachneri* del Golfo de California claramente supera el umbral recomendado, podría otorgársele el estatus de nueva especie a los individuos del GC. Sin embargo, a pesar de que la utilización de umbrales de divergencia ha resultado eficiente en diversos grupos animales como arañas, aves, crustáceos, lepidópteros y peces, entre otros (Hebert *et al.*, 2004; Ward *et al.*, 2005; Hajibabaei *et al.*, 2006), su uso ha sido totalmente desaconsejado (Frézal & Leblois, 2008). Una de las principales críticas se fundamenta en el hecho de que la identificación de especies aplicando la

regla 10X utiliza límites empíricos de diferencias de secuencias, los cuales carecen de fundamentos teóricos sólidos (Birky *et al.*, 2010). Se podría en este caso proponer que a los individuos del Golfo de California denominarlos *R. aff. steindachneri*, siendo *aff.* especie afín y se utiliza para indicar que no todos los rasgos observados coinciden con el taxón indicado, pero que las observaciones son insuficientes para definirlo como un nuevo taxón.

Los elasmobranquios no tienen una etapa de vida larval, lo que significa que la dispersión está mediada principalmente por los movimientos activos individuales (Chapman *et al.*, 2015). Las características físicas que inhiben el movimiento en el tiempo evolutivo, tales como extensiones oceánicas para las especies costeras, zonas de afloramiento para especies de aguas cálidas y zonas ecuatoriales para especies de aguas frías, pueden promover la estructura de la población y finalmente, la especiación (Pardini *et al.*, 2001; Richards *et al.*, 2009; Benavides *et al.*, 2011). La estructura de las poblaciones en elasmobranquios se ha observado cuando los individuos tienen un rango de dispersión limitado o cuando las hembras tienen fidelidad por un sitio regional específico de crianza (es decir, filopatría regional; Keeney *et al.*, 2005; Schultz *et al.*, 2008; Chapman *et al.*, 2009; Karl *et al.*, 2011) o es un área de crianza natal exacto para dar a luz (es decir, filopatría natal; Feldheim *et al.*, 2014). Esto también se ha planteado en *R. steindachneri* en el GC y la CPBC, basado en el uso de áreas de reproducción específicas y localizadas (Villavicencio Garayzar, 1995; Sandoval-Castillo & Rocha-Olivares, 2011). Por lo tanto, también podría presentarse en el caso de *R. bonasus* del Atlántico Norte y Caribe colombiano, ya que presentan una capacidad de dispersión de larga distancia y la recurrencia de zonas específicas de reproducción y alimentación se han documentado para *R. bonasus* en Atlántico Norte (Smith & Merriner, 1987). Sin embargo, es necesario realizar estudios de marcaje para evaluar el grado de movilidad realizado y la hipótesis de filopatría en estas especies del género *Rhinoptera*.

Por otra parte, la poca divergencia detectada entre las *R. steindachneri* del Golfo de California con *R. brasiliensis* del Golfo de México, al igual que lo reportado por Naylor *et al.* (2012) quienes sugirieron que *R. steindachneri* no se encontraba sólo en el Pacífico oriental, sino también en el Golfo de México y posiblemente también al oeste del océano Atlántico es característica de las denominadas especies gemelas o especies crípticas, las cuales son aquellas extremadamente similares en apariencia (morfología, fisiología y comportamiento) pero se hallan reproductivamente aisladas entre sí y se presenta una incertidumbre taxonómica (Funk & Omland, 2003; Meyer & Paulay, 2005) y que por lo tanto todavía predominen polimorfismos compartidos indicativos de una retención de variabilidad ancestral dada la baja tasa mutacional característica de elasmobranquios

(Kingman, 1982; Martin & Palumbi, 1993). Según varios autores (Chouinard *et al.*, 1996; Schluter, 1996; Taylor *et al.*, 1997) en estos casos las especies incipientes pueden ser molecularmente indistinguibles o distinguibles solo en un nivel intraespecífico de variación. Similarmente, *R. bonasus* se presentan como especie hermana respecto a *R. steindachneri* del Pacífico mexicano (Mazatlán, Oaxaca y Chiapas) y quizás aun no se han vislumbrado otros caracteres morfológicos a parte del número de la placa dental que podrían ser informativas concurrente en el género *Rhinoptera* (Sandoval-Castillo & Rocha-Olivares, 2011; Naylor *et al.*, 2012).

9.2. Tiempos de divergencia

La estimación de los tiempos de divergencia a través de las pruebas efectuadas permitió aceptar el uso de un reloj molecular. A partir de los cálculos efectuados con la prueba de razón de verosimilitud global no fue posible rechazar la hipótesis nula de que las secuencias evolucionan a tasas homogéneas entre todas las ramas de la filogenia.

De acuerdo a Cranston & Rannala (2005), una aproximación filogenética relajada, en donde la filogenia y los tiempos de divergencia son co-estimados bajo un modelo de reloj molecular relajado, es preferida sobre uno bajo un modelo estricto. Con base al punto de calibración fósil en el análisis BEAST, se fechó la divergencia de *Myliobatis californica* y *Mobula japonica* en 53.94 (74.22 a 37.44 Ma) (nodo 1, Figura 20), la cual concuerda con la estimación de Aschliman *et al.* (2012), quienes estimaron que Myliobatidae comenzó a divergir en el último periodo del cretáceo (aprox. 66 - 75Ma). Conjuntamente, los primeros fósiles asignados de forma fiable a Myliobatidae son del Cretácico superior, encontrándose abundante en el Terciario y algunos fósiles asignados a un género común existente en el Eoceno (Maisey, 1984; Kriwet & Benton, 2004; Underwood, 2006).

La estimación obtenidas en este estudio de la divergencia entre las *Rhinopteras* y *Mobula japonica* fue entre aproximadamente 43.25 (53.18 a 33.2 Ma), la cual concuerda con la aparición de los primeros fósiles de Rhinopteridos entre 56.0 y 33.9 Ma (Cappetta, 1987; 2006), pero no concuerda con las estimaciones entre (*Rhinopteras/Mobúlidos*) realizadas por Aschliman *et al.* (2012) (29.9 a 22.6 Ma) y Poortvliet *et al.* (2014) (34.88 a 25.33 Ma). Sin embargo, Aschliman (2014) sugirió más tarde que su estimación era demasiado reciente. Adnet *et al.* (2012) estimaron que la divergencia entre estos dos linajes (*Rhinopteras/Mobúlidos*) fue aproximadamente hace 50 Ma, en el Paleoceno o Eoceno temprano con base en los dientes del fósil *Mobúlido* más antiguo † *Burnhamia* (59.2 a 47.8 Ma) (Pfeil, 1981; Cappetta, 1985; Woodward, 1889) y estaría más cercana a la estimación del

presente estudio. Sumado a lo anterior, los restos fósiles con morfología de los dientes muestran linajes mobúlidos intermedios entre durófagos (trituration de conchas) y los mobúlidos no durófagos datan del Paleoceno tardío al Eoceno temprano (58.7 a 47.8Ma) (Adnet *et al.*, 2012).

Dos eventos geológicos son las principales causas cronológicas de la distribución y especiación marina en el Atlántico Occidental y el Pacífico Oriental: la primera es, la apertura en el Cretácico (145.4 a 65.5 Ma) del Océano Atlántico Sur, este fenómeno es la base del modelo biogeográfico de Rosen (Navia *et al.*, 2016), el cual propone que el corredor del mar de Tethys sirvió como canal de dispersión para muchos taxones distribuidos globalmente y que por lo tanto, las especies marinas del Atlántico occidental serían ancestros de las poblaciones distribuidas en el Nuevo Mundo (Banford *et al.*, 2004). McEachran & Aschliman (2004) proponen, basados en la actual riqueza de especies, que el mar de Tethys (Proto-Atlántico Central), es el segundo centro de radiación de estos elasmobranquios, luego de la región del Indo-Pacífico oeste, la separación durante el Eoceno del Indo-Pacífico y el Atlántico Central permitió que los taxones de la región del Indo-Pacífico se mantuvieran aisladas durante más tiempo de aquellas del Atlántico occidental, y aún más de los taxones del Pacífico Oriental Tropical, los cuales se aislaron por completo solo hasta el Mioceno. Esta situación podría ser evidente al observar la topología presentada con la divergencia de las especies de *R. javanica* respecto al resto de *Rhinopteras*.

Coates *et al.* (2004) estiman que a partir del Paleoceno, la comunicación se comienza a interrumpir debido a la emergencia de Centroamerica ancestral, misma que volvió a sumergirse a mediados del Plioceno. El canal sufrió un cierre alrededor de los 24 Ma, lo cual es congruente con el periodo estimado de tiempo para la diversificación entre el clado 1 (*R. brasiliensis* + *R. steindachneri*GC + *R. jayakari*) y clado 2 (*R. bonasus* + *R. steindachneri* PM) inferido en el presente estudio hace 29.59 a 13.71 Ma. Este evento vicariante representó una barrera para la dispersión y por lo tanto de flujo genético entre las especies distribuidas actualmente en los océanos Atlántico y el océano Pacífico que tuvo lugar entre el 3.1 a 2.8 Ma (Coates & Obando, 1996; Marko, 2002; Coates *et al.*, 2003, el cual fue fundamental en la determinación de los patrones biogeográficos de organismos acuáticos (Collin & Maintenon, 2002), favoreciendo la ampliación del rango de distribución de unos y reduciendo o llevando a la extinción a otros en procesos de depredación y uso de hábitats, como es el caso de muchas especies marinas (Lessios, 2008) incluyendo varios elasmobranquios (Daly-Engel *et al.*, 2012; Keeney & Heist, 2006; Schultz *et al.*, 2008; Stelbrink *et al.*, 2010).

La divergencia en el clado 2 entre las especies de *R. bonasus* del Atlántico Norte y *R. bonasus* del Caribe colombiano + *R. steindachneri* del Pacífico Oriental Tropical ocurrió entre los 10.08 y 2.73 Ma, mismo que se facilitó debido a los cambios ocurridos en las condiciones oceanográficas. Antes del cierre definitivo del Istmo de Panamá hubo varios eventos de inundación y de cierres previos, provocados por cambios en el nivel del mar, el inicio de esta sucesión de pasos marinos empezó a mediados del mioceno (16.5 a 11Ma) (Coates & Obando, 1996; Collins, 1996; Roopnarine, 2001; Vermeij, 2001). Terminando el Mioceno (~5 Ma) hubo un aumento del nivel del mar mayor al actual, el cual pudo promover el intercambio de flujo genético entre *R. steindachneri* del Pacífico con *R. bonasus* del Atlántico Norte, debido a una inundación somera del Istmo, que pudo propiciar el paso efímero permitiendo el último contacto entre especies a través de un sistema de canales someros el cual se menciona sólo afecto a especies costeras y estuarinas (Knowlton & Weight, 1998; Marko, 2002); siendo éste el hábitat preferido por las especies de *Rhinoptera* (Acero & Garzón, 1983; Cervigón *et al.*, 1992; Gallo-Dasilva *et al.*, 1997; Cervigón & Alcalá, 1999; Neer & Thompson, 2005). Se considera que las especies gemelas son el producto de un proceso reciente de especiación, este podría ser el caso para el evento de divergencia entre (*R. steindachneri* GC + *R. brasiliensis* GM) que fue estimada en 2.15 Ma.

X. CONCLUSIONES

Los análisis de distancias genéticas, permitieron identificar un nivel de divergencia suficiente para considerar como unidades taxonómicas a *R. bonasus*, *R. brasiliensis* y *R. steindachneri* en América.

Se confirma la presencia de dos poblaciones divergentes de *R. bonasus*, una al Norte del Atlántico occidental y la otra en el Caribe colombiano,

No se logró registrar la presencia de *R. bonasus* en el sureste del Golfo de México en tanto que se confirmó la presencia de la especie *R. brasiliensis* en dicha zona, para la cual se amplía su distribución.

El origen de la divergencia entre *R. steindachneri* del Golfo de California y *R. brasiliensis* del Golfo de México presentan una especiación reciente hace 2.15 ma (4.49 a 0.56), dichas especies exhiben un grado de semejanza morfológica que permite tratarlas como especies gemelas.

Se confirma una marcada divergencia entre las *R. steindachneri* de la costa Pacífica de Baja California respecto a las del Golfo de California y a su vez de las que se distribuyen en las costas del Pacífico mexicano, las cuales se podrían considerar como linajes divergentes en el Pacífico Oriental, lo cual amerita una revisión de su estatus de poblaciones/especies.

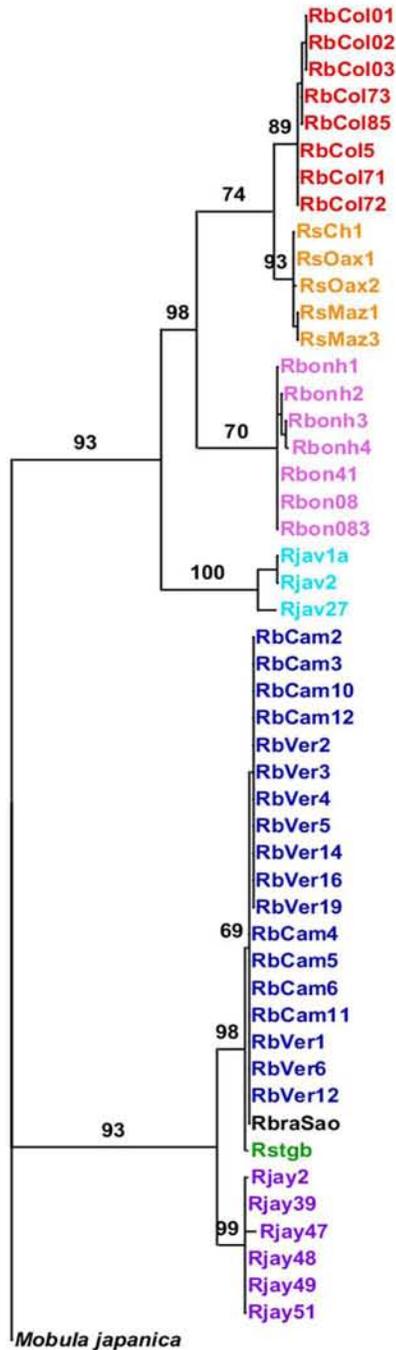
Eventos geológicos durante el Mioceno-Plioceno podrían haber influido en la historia evolutiva de las *Rhinopteras* distribuidas en América, como lo fue la clausura del Istmo de Panamá la cual representa una explicación coherente para la posible especiación entre *R. bonasus* y *R. steindachneri* del Pacífico oriental presentándose como especies hermanas dentro del género, misma que fue estimada en el presente estudio en 3.55 millones de años (6.44 a 1.37).

XI. RECOMENDACIÓN

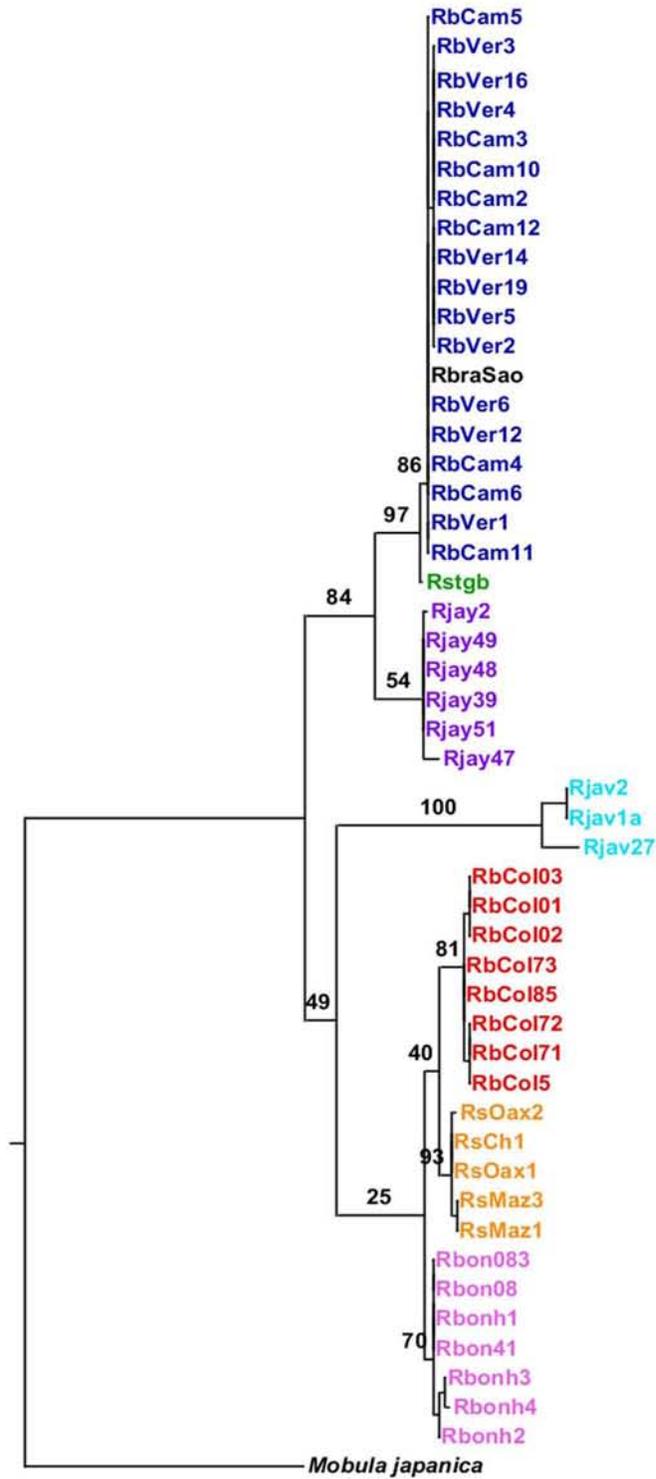
La Unión Internacional para la Conservación de la naturaleza (UICN) declaró a *R. brasiliensis*, en Peligro de extinción (EN), se considera a las especies en esta categoría, cuando la mejor evidencia disponible indica la reducción en el tamaño poblacional de ≥ 70 % en los últimos 10 años y la disminución de individuos maduros; por lo cual se encuentran comprometida su existencia globalmente, ya sea por causas antropogénicas, cambios en el hábitat o por cambios graduales del clima, esta sería la primera raya en aguas mexicanas con esta categoría, por esta razón es necesario fomentar y mejorar los estudios que permitan incrementar el conocimiento biológico, ecológico y pesquero de la especie, robustecer las medidas de manejo para su uso no extractivo sustentable, prevenir y mitigar las posibles amenazas para la especie y su hábitat.

XII. APÉNDICES

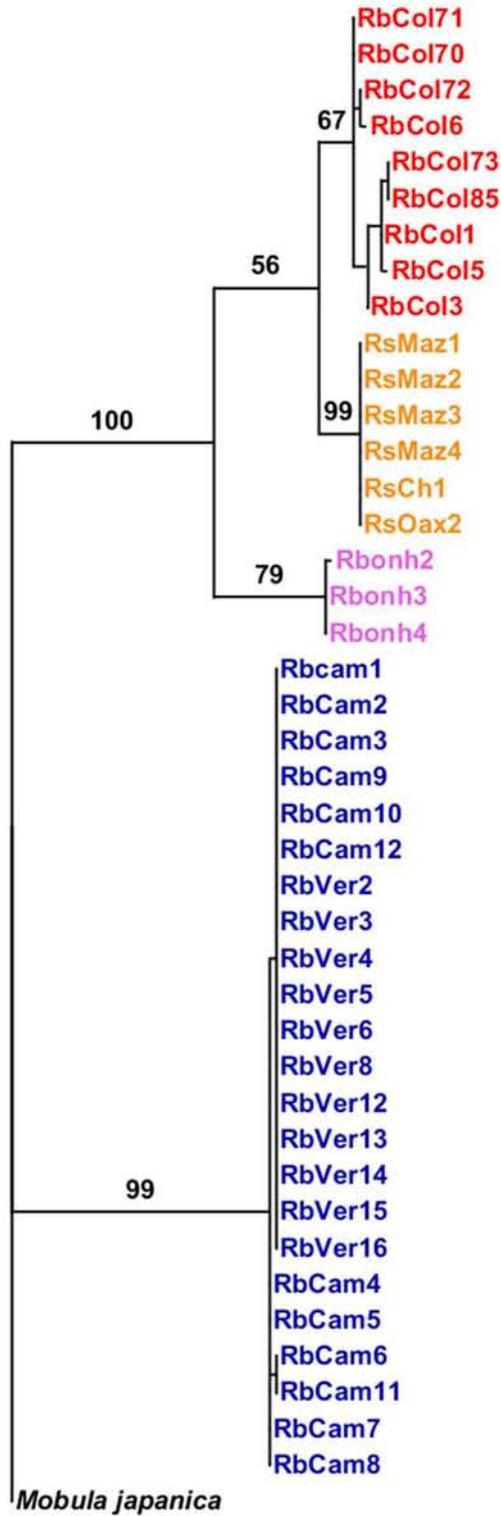
Apéndice 1. Árbol filogenético inferido con Máxima Parsimonia del gen COI del ADNmt del género *Rhinoptera*. (RbVer)=Veracruz, (RbCam)=Campeche, (RbraSao)=*R. brasiliensis* GenBank, (Rjay)=*R. jayakari* GenBank, (Rbonh y Rbon)=*R. bonasus* GenBank, (RsMaz)=Mazatlán, (RsOax)=Oaxaca, (RsCh)=Chiapas, (RbCo)=Colombia y (Rjav)=*R. javanica*. Los valores son los soportes de Bootstrap calculados con 1000 réplicas.



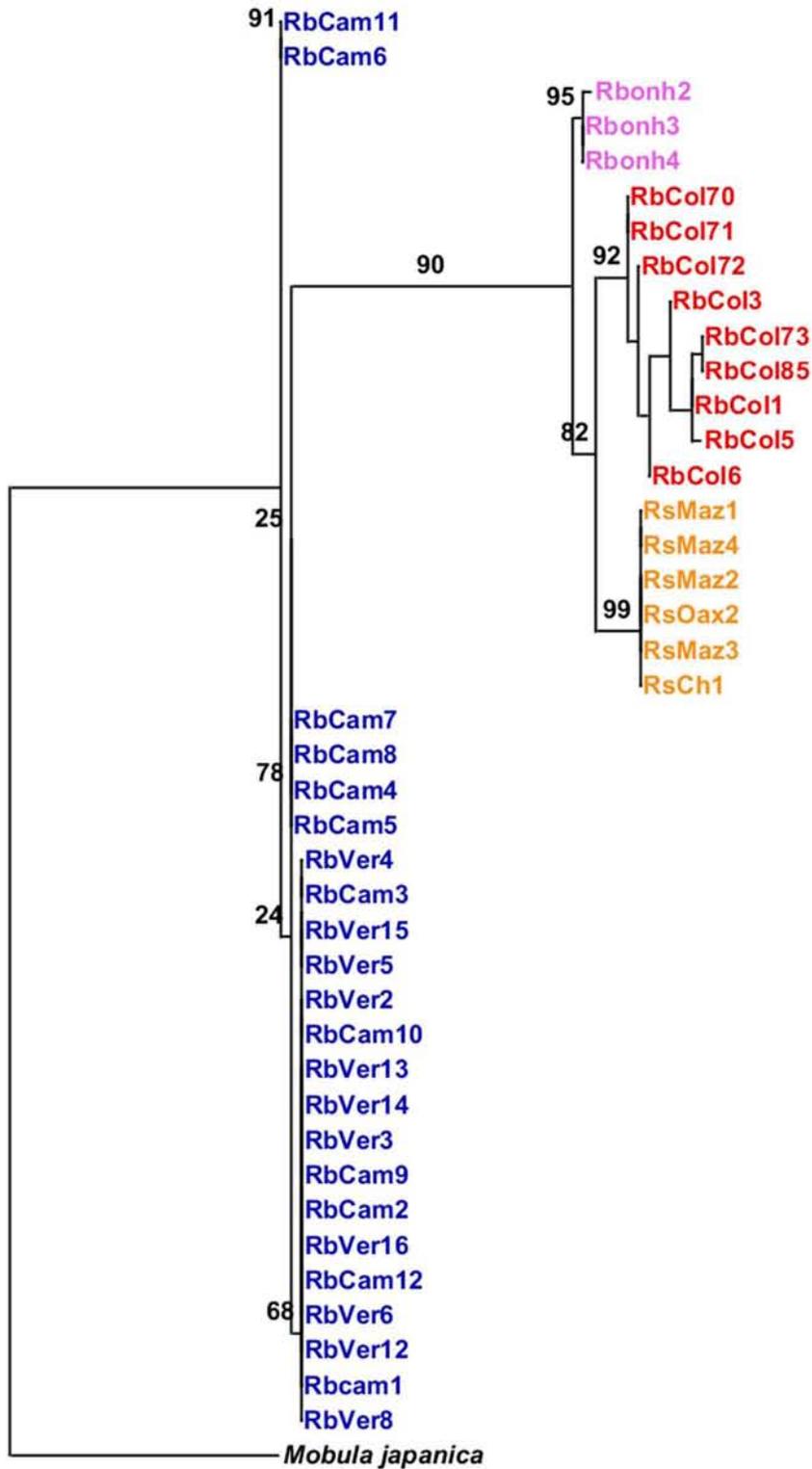
Apéndice 2. Árbol filogenético inferido con Máxima Verosimilitud del gen COI del ADNmt del género *Rhinoptera*. (RbVer)=Veracruz, (RbCam)=Campeche, (RbraSao)=*R. brasiliensis* GenBank, (Rjay)=*R. jayakari* GenBank, (Rbonh y Rbon)=*R. bonasus* GenBank, (RsMaz)=Mazatlán, (RsOax)=Oaxaca, (RsCh)=Chiapas, (RbCo)=Colombia y (Rjav)=*R. javanica*. Los valores son los soportes de Bootstrap calculados con 1000 réplicas.



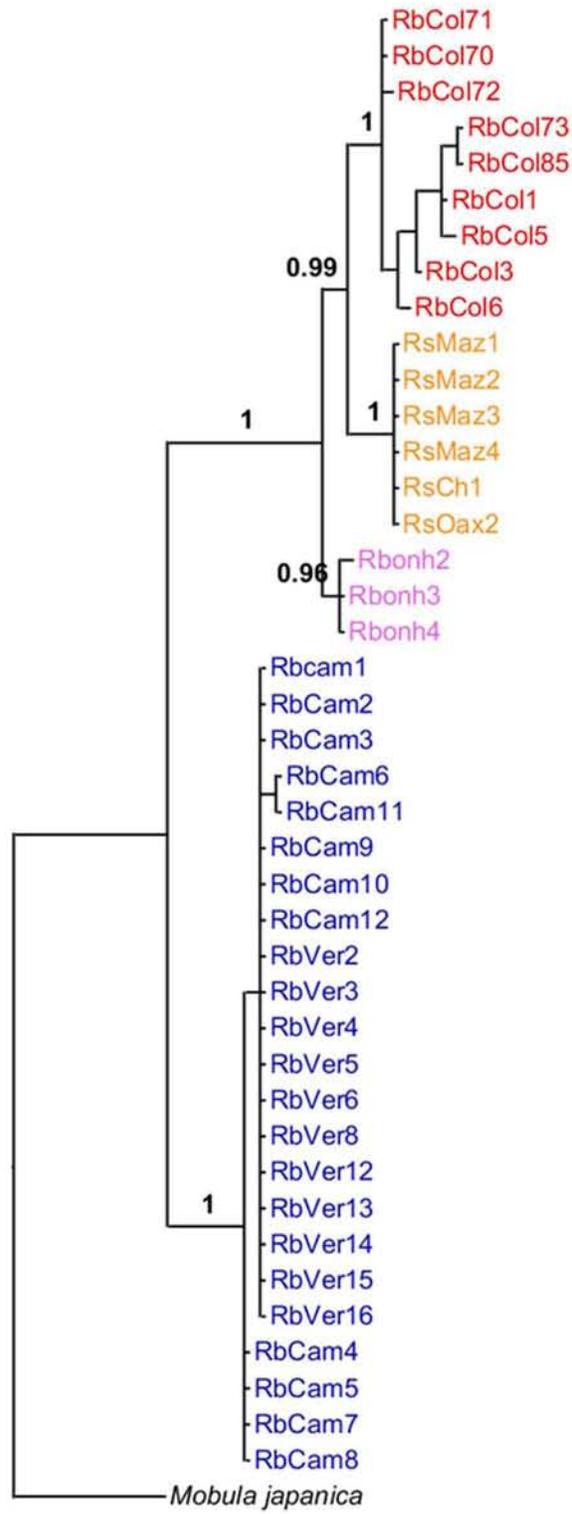
Apéndice 4. Árbol filogenético inferido con Máxima Parsimonia del gen *Cit-b* del ADNmt del género *Rhinoptera*. (RbCo)=Colombia, (RsMaz)=Mazatlán, (RsOax)=Oaxaca, (RsCh)=Chiapas, (Rbonh)=*R. bonasus* GenBank, (RbVer)=Veracruz, (RbCam)=Campeche. Los valores son los soportes de Bootstrap calculados con 1000 réplicas.



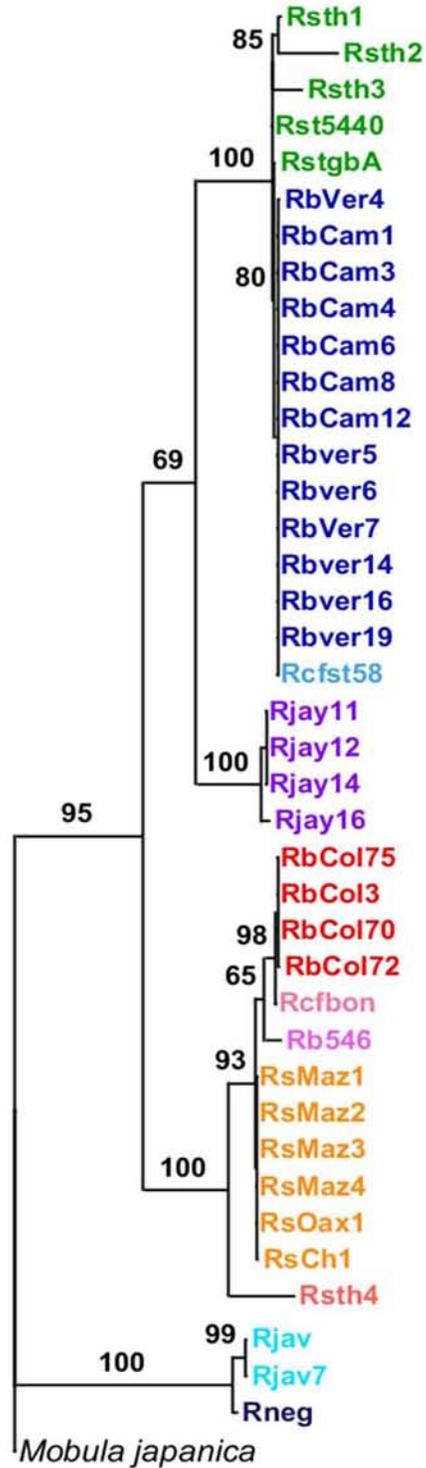
Apéndice 5. Árbol filogenético inferido con Máxima Verosimilitud del gen Cit-b del ADNmt del género *Rhinoptera*. (RbCo)=Colombia, (RsMaz)=Mazatlán, (RsOax)=Oaxaca, (RsCh)=Chiapas, (Rbonh)=*R. bonasus* GenBank, (RbVer)=Veracruz, (RbCam)=Campeche. Los valores son los soportes de Bootstrap calculados con 1000 réplicas.



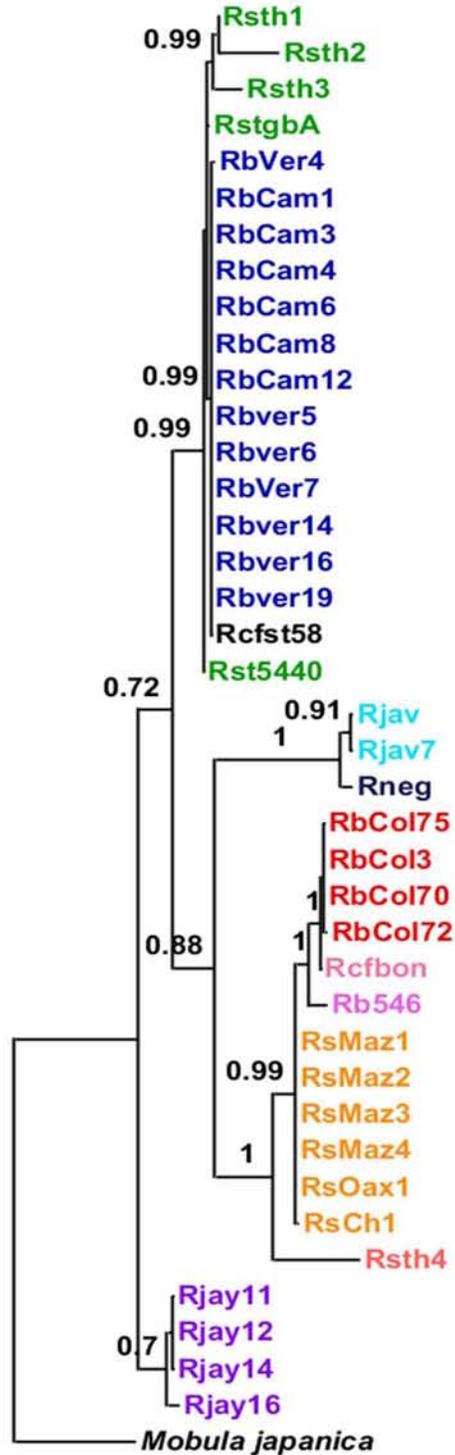
Apéndice 6. Árbol filogenético de Inferencia Bayesiana del gen *Cit-b* del ADNmt del género *Rhinoptera*. (RbCo)=Colombia, (RsMaz)=Mazatlán, (RsOax)=Oaxaca, (RsCh)=Chiapas, (Rbonh)=*R. bonasus* GenBank, (RbVer)=Veracruz, (RbCam)=Campeche. Los valores son de las probabilidades posteriores.



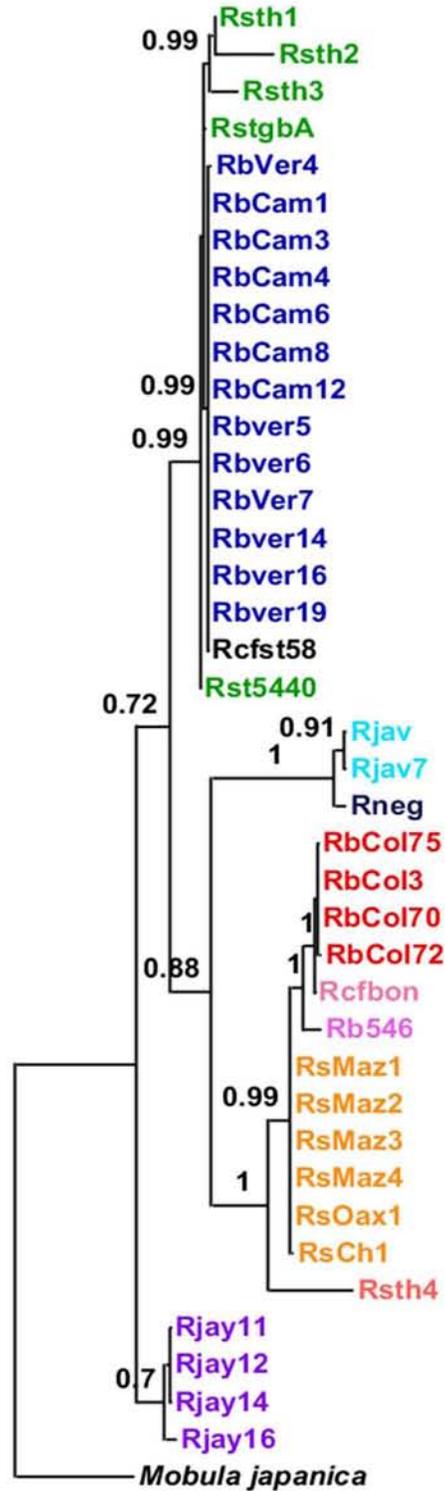
Apéndice 7. Árbol filogenético inferido con Máxima Parsimonia del gen ND2 del ADNmt del género *Rhinoptera*. (RbCo)=Colombia, (Rcfbon)=*R. cf. bonasus* GenBank, (RsMaz)=Mazatlán, (RsOax)=Oaxaca, (RsCh)=Chiapas, (RbVer)=Veracruz, (RbCam)=Campeche, (Rcfst)=*R. cf. steindachneri* GenBank, (Rsth)=*R. steindachneri* GenBank, (Rjay)=*R. jayakari* GenBank, (Rjav)=*R. javanica* GenBank y (Rneg)=*R. neglecta*. Los valores son los soportes de Bootstrap calculados con 1000 réplicas.



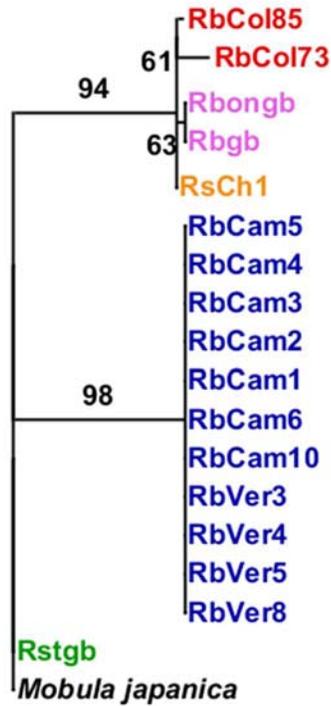
Apéndice 8. Árbol filogenético inferido con Máxima Verosimilitud del gen ND2 del ADNmt del género *Rhinoptera*. (RbCo)=Colombia, (Rcfbon)=*R. cf. bonasus* GenBank, (RsMaz)=Mazatlán, (RsOax)=Oaxaca, (RsCh)=Chiapas, (RbVer)=Veracruz, (RbCam)=Campeche, (Rcfst)=*R. cf. steindachneri* GenBank, (Rsth)=*R. steindachneri* GenBank, (Rjay)=*R. jayakari* GenBank, (Rjav)=*R. javanica* GenBank y (Rneg)=*R. neglecta*. Los valores son los soportes de Bootstrap calculados con 1000 réplicas.



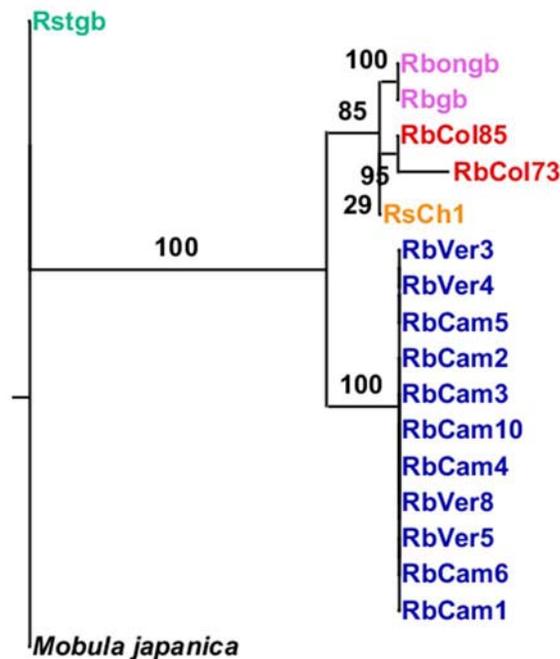
Apéndice 9. Árbol de Inferencia Bayesiana del gen ND2 del ADNmt del género *Rhinoptera*. (RbCo)=Colombia, (Rcfbon)=*R. cf. bonasus* GenBank, (RsMaz)=Mazatlán, (RsOax)=Oaxaca, (RsCh)=Chiapas, (RbVer)=Veracruz, (RbCam)=Campeche, (Rcfst)=*R. cf. steindachneri* GenBank, (Rsth)=*R. steindachneri* GenBank, (Rjay)=*R. jayakari* GenBank, (Rjav)=*R. javanica* GenBank y (Rneg)=*R. neglecta*. Los valores son las probabilidades posteriores.



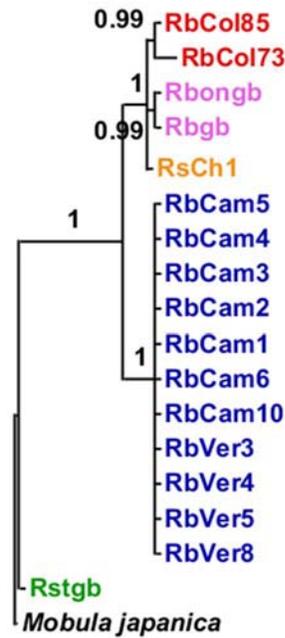
Apéndice 10. Árbol filogenético inferido con Máxima Parsimonia del gen RAG1 del ADNn del género *Rhinoptera*. (RsGenBan)=*R. steindachneri* GenBank, (RbVer)=Veracruz, (RbCam)=Campeche, (RbCol)=Colombia, (RbGenBan)=*R. bonasus* GenBank y (RsCh)=Chiapas. Los valores son los soportes de Bootstrap calculados con 1000 réplicas.



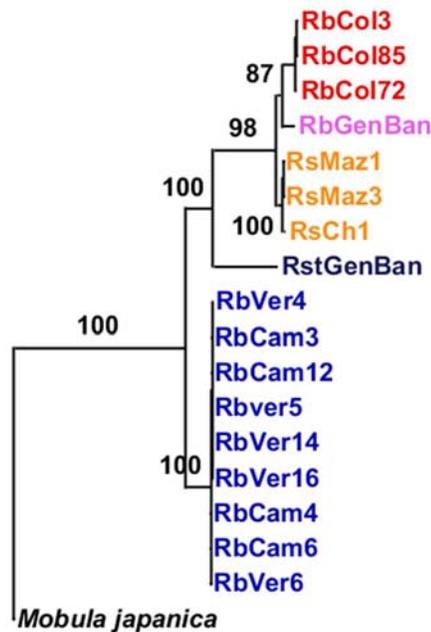
Apéndice 11. Árbol filogenético inferido con Máxima Verosimilitud del gen RAG1 del ADNn del género *Rhinoptera*. (RsGenBan)=*R. steindachneri* GenBank, (RbVer)=Veracruz, (RbCam)=Campeche, (RbCol)=Colombia, (RbGenBan)=*R. bonasus* GenBank y (RsCh)=Chiapas. Los valores son los soportes de Bootstrap calculados con 1000 réplicas.



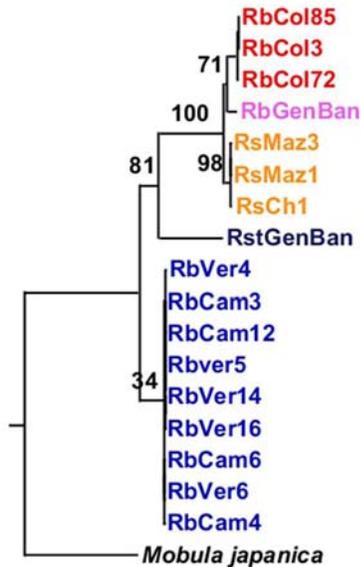
Apéndice 12. Árbol de Inferencia Bayesiana del gen RAG1 del ADNn del género *Rhinoptera*. (RsGenBan)=*R. steindachneri* GenBank, (RbVer)=Veracruz, (RbCam)=Campeche, (RbCo)=Colombia, (RbGenBan)=*R. bonasus* GenBank y (RsCh)=Chiapas. Los valores son las probabilidades posteriores.



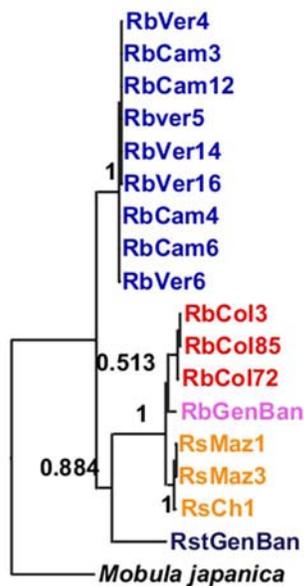
Apéndice 13. Árbol filogenético inferido con Máxima Parsimonia de los genes (*Cit-b* + ND2 + COI) del ADNmt del género *Rhinoptera*. (RbCol)=Colombia, (RbGenBan)=*R. bonasus* GenBank, (RsMaz)=Mazatlán, (RsCh)=Chiapas, (RstGenBan)=*R. steindachneri* GenBank, (RbVer)=Veracruz y (RbCam)=Campeche. Los valores son los soportes de Bootstrap calculados con 1000 réplicas.



Apéndice 14. Árbol filogenético inferido con Máxima Verosimilitud de los genes (*Cit-b* + ND2 + COI) del ADNmt del género *Rhinoptera*. (RbCol)=Colombia, (RbGenBan)=*R. bonasus* GenBank, (RsMaz)=Mazatlán, (RsCh)=Chiapas, (RstGenBan)=*R. steindachneri* GenBank, (RbVer)=Veracruz y (RbCam)=Campeche. Los valores son los soportes de Bootstrap calculados con 1000 réplicas



Apéndice 15. Árbol filogenético de Inferencia Bayesiana de los genes (*Cit-b* + ND2 + COI) del ADNmt del género *Rhinoptera*. (RbCol)=Colombia, (RbGenBan)=*R. bonasus* GenBank, (RsMaz)=Mazatlán, (RsCh)=Chiapas, (RstGenBan)=*R. steindachneri* GenBank, (RbVer)=Veracruz y (RbCam)=Campeche. Los valores son las probabilidades posteriores.



Apéndice 16. Estimación de los tiempos de divergencia con los intervalos superiores e inferiores al 95 % de las densidades posteriores mayores (HPD) para el género *Rhinoptera* del gen COI del ADNmt.

Nodo	Media	95 % HPD
1	53.94	37.44 - 74.22
2	43.25	33.2 - 53.18
3	25.65	17.22 - 34.87
4	21.22	13.71 - 29.59
5	9.52	4.93 - 15.46
6	2.15	0.56 - 4.49
7	0.95	0.1 - 2.35
8	0.89	0.02 - 2.67
9	5.84	2.73 - 10.08
10	3.55	1.37 - 6.44
11	0.38	0 - 1.61
12	1.18	0.03 - 3.46
13	4.99	2.02 - 9.07

Apéndice 17. Valores de divergencia genética intraespecífica e interespecífica en especies de elasmobranquios, utilizando genes del ADNmt. Golfo de California (GC), Costa del Pacífico de Baja California (CPBC), Pacífico occidental y Central (POcC), Golfo de México (GM), Costa Atlántica (CA), , Pacífico oriental (PO), Caribe colombiano (Cc). Tomado y modificado de Sandoval-Castillo & Rocha-Olivares, 2011.

Distancias Intraespecíficas	localidad	n	Gen	d (%)	Referencias
<i>Rhinoptera steindachneri</i>	GC/PO	6	COI	6.5	Este estudio
<i>Rhinoptera bonasus</i>	CA/Cc	15	COI	1.8	Este estudio
<i>Aetobatus narinari</i>	CA/PO	8	COI	1.1	Richards et al.(2009)
<i>Aetobatus narinari</i>	POcC/CA	33	COI	2.8	Richards et al.(2009)
<i>Aetobatus narinari</i>	POcC/PO	11	COI	3.9	Richards et al.(2009)
<i>Rhinoptera bonasus</i>	CA/Cc	12	Cit-b	1.6	Este estudio
<i>Aetobatus narinari</i>	CA/PO	8	Cit-b	2.5	Richards et al.(2009)
<i>Aetobatus narinari</i>	POcC/PO	11	Cit-b	2.7	Richards et al.(2009)
<i>Aetobatus narinari</i>	POcC/CA	28	Cit-b	3.0	Richards et al.(2009)
<i>Gymnura marmorata</i>	GC/CPBC	120	NADH2	<0.01	Sandoval-Castillo y Rocha-Olivares (2011)
<i>Narcine entemedor</i>	GC/CPBC	80	NADH2	0.0	Sandoval-Castillo y Rocha-Olivares (2011)
<i>Rhinobatos productus</i>	GC/CPBC	136	NADH2	1.2	Sandoval-Castillo y Rocha-Olivares (2011)
<i>Myliobatis californica</i>	GC/CPBC	75	NADH2	0.3	Sandoval-Castillo y Rocha-Olivares (2011)
<i>Rhinoptera steindachneri</i>	GC/CPBC	76	NADH2	10.0	Sandoval-Castillo y Rocha-Olivares (2011)
<i>Rhinoptera bonasus</i>	CA/Cc	6	NADH2	2.0	Este estudio
<i>Rhinoptera steindachneri</i>	CPBC/PO	7	NADH2	6.2	Este estudio
<i>Rhinoptera steindachneri</i>	GC/PO	11	NADH2	9.5	Este estudio
<i>Rhinoptera steindachneri</i>	GC/CPBC	6	NADH2	11.2	Este estudio
<i>Rhizoprionodon terranovae</i>	GM/CA	52	RC	<0.01	Heist (1999)
<i>Rhinobatos productus</i>	GC/CPBC	64	RC	2.5	Sandoval-Castillo et al. (2004)
Distancias Interespecíficas	Especie 1	Especie 2	Gen	d (%)	Referencia
	<i>Narcine entemedor</i>	<i>N. vermiculata</i>	NADH2	4.0	Sandoval-Castillo y Rocha-Olivares (2011)
	<i>Rhinobatos productus</i>	<i>R. glaucostigma</i>	NADH2	5.0	Sandoval-Castillo y Rocha-Olivares (2011)
	<i>Myliobatis californica</i>	<i>M. longirostris</i>	NADH2	8.8	Sandoval-Castillo y Rocha-Olivares (2011)
	<i>Dasyatis dipterura</i>	<i>D. longa</i>	NADH2	3.3	Sandoval-Castillo y Rocha-Olivares (2011)
	<i>Himantura pacifica</i>	<i>H. Schmardae</i>	Cit-b	6.5	Richards et al. (2009)
	<i>Potamotrygon motoro</i>	<i>P. castexi</i>	Cit-b	4.1	Richards et al. (2009)

XIII. BIBLIOGRAFIA

Acero A. & J. Garzón. (1982). On an interesting specimen of cow nose ray (Pisces:Rhinopteridae) from the colombian Caribbean. Bol. Inst. Ocean., 31(2):9-11.

Acero A. P., José J. Tavera R. A., & Hernández L. (2016). A New Southern Caribbean Species of Angel Shark (Chondrichthyes, Squaliformes, Squatinidae), Including Phylogeny and Tempo of Diversification of American Species. Copeia: July 2016, Vol. 104, No. 2, pp. 577-585.

Adnet. S. & H. Cappetta. (2008). New fossil triakid shark from the early Eocene of Prémontré, France, and comments on fossil record of the family. Acta Paleontologica Polonica 53(3): 433-448.

Adnet S., Cappetta H., Guinot G., & G. Notarbartolo di Sciara (2012). Evolutionary history of the devilrays (Chondrichthyes:Myliobatiformes) from fossil and morphological inference. Zool J Linnean Soc 166:132–159.

Afonso A. F. & V. Gallo (2001). Estudo do escápulo-coracóide e da cartilagem sinarcual cérvico-torácica de *Rhinoptera brasiliensis* Müller & Henle e *Rhinoptera bonasus* (Mitchill) Elasmobranchii, Rhinopteridae). Rev. Bras. Zool. vol.18 no.2. pp.319-331.

Applegate S. P., Espinosa L., & F. Sotelo. (1993). An overview of Mexican shark fisheries, with suggestions for shark conservation in Mexico. In: Branstetter, S. (Ed.), Conservation Biology of Sharks, NOAA Tech. Rep. NMFS 115, pp. 31–37.

Aschliman N. C. (2011). The batoid tree of life: recovering the patterns and timing of the evolution of skates, rays and allies (Chondrichthyes: Batoidea). Dissertation, Florida State University.

Aschliman N. C. (2014). Interrelationships of the durophagous stingrays (Batoidea:Myliobatidae). Environ. Biol. Fishes 97, 967–979.

Aschliman N. C., Nishida M., Miya M., Inoue J.G., Rosana K.M., & G. J. Naylor. (2012). Body plan convergence in the evolution of skates and rays (Chondrichthyes:Batoidea). *Mol. Phylogenet. Evol.* 63, 28–42.

Avise J. C. (1994). *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman and Hall, New York.

Avise J. C., Nelson W. S., Bowen B. W. & Walker D. (2000). Phylogeography of colonially nesting seabirds, with special reference to global matrilineal patterns in the sooty tern (*Sterna fuscata*). *Molecular Ecology*, vol. 9, no 11, p. 1783-1792.

Bade L. M., Pilgrim E. M., Balakrishnan C. N., McRae S. B. & Luczkovich J. J. (2013). Use of genetic techniques to identify the diet of cownose rays, *Rhinoptera bonasus*, in North Carolina and Virginia: an analysis of shellfish prey items. Submitted Biology, East Carolina University, 1001. East 5th Street, Greenville, NC 27858, USA.

Bandelt H. J., Forster P. & Röhl A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.

Banford H. M., E. Bermingham & B. B. Collette. (2004). Molecular phylogenetics and biogeography of transisthmian and amphi-Atlantic needlefishes (Belontiidae: Strongylura and Tylosurus): perspectives on New World marine speciation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 833-851.

Barracough T. G., & S. Nee. (2001). Phylogenetics and speciation. *Trends Ecol. Evol.* 16:391-399.

Bartoli G., M. Sarnthein & M. Weinelt. (2005). Final closure of Panama and the onset of Northern Hemisphere glaciation, *Earth Planet. Sci. Lett.*, 237, 33 – 44, doi:10.1016/j.epsl. 2005.06.020.

Battistuzzi F. U., Billing-Ross P., Paliwal A & Kumar S. (2011). Fast and slow implementations of relaxed clock methods show similar patterns of accuracy in estimating divergence times. *Mol Biol Evol.*28:2439–2442.

Bernardi G., Findley, L & A. Rocha-Olivares. (2003). Vicariance and dispersal across Baja California in disjunct marine fish populations. *Evolution* 57 (7), 1599–1609.

Bigelow H. & Schroeder, W. (1953). *Fishes of the Western North Atlantic. Sawfishes, guitarfishes, skates and rays.* Sears Foundation for Marine Research. Yale University. Dinamarca. Vol. 2. P. 588.

Birky C. W., Adams Jr., Gemmel J. & Perry M. J. (2010). Using population genetic theory and DNA sequences for species detection and identification in asexual organisms. *PLoS ONE* 5: e10609.

Bizzarro J., W. D. Smith, F. Márquez-Farías & R. E. Hueter. (2007). Artisanal fisheries and reproductive biology of the Golden cownose ray, *Rhinoptera steindachneri* (Evermann and Jenkins, 1981), in the northern Mexican Pacific. *Fisheries Research* 84 (2007) 137-146.

Bizzarro J. J., Smith. D., Castillo-Géniz, L., Ocampo-Torres, A., Márquez-Farías, F & Hueter, R. E. (2009). The seasonal importance of small coastal sharks and rays in the artisanal elasmobranch fishery of Sinaloa, Mexico. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*. Vol. 4(4): 513-531.

Blaylock R. A. (1989). A Massive School of Cownose Rays, *Rhinoptera bonasus* (Rhinopterae), in Lower Chesapeake Bay, Virginia. *Copeia* 1989:744-748.

Blaylock R.A. (1992). Distribution, abundance and behavior of the cownose ray, *Rhinoptera bonasus* (Mitchill 1815), in lower Chesapeake Bay. PhD Dissertation, College of William and Mary, Virginia, USA.

Blaylock R. A. (1993). Distribution and abundance of the cownose ray, *Rhinoptera bonasus*, in lower Chesapeake Bay. *Estuaries and Coasts* 16:255-263.

Bogorodsky S. V., Last, P. R., Tilman, J., Alpermann & A. O. Mal. (2014). Records of *Himantura granulata* (Dasyatidae) and *Rhinoptera jayakari* (Rhinopterae) from the Red Sea Zoology in the Middle East Vol. 60, Iss. 2

Bouckaert R., Heled J., Kühnert D., Vaughan T. & C. H. Wu. (2014). BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLoS Comput Biol* 10(4): e1003537. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003537.

Bromham L., & Penny D. (2003). The modern molecular clock. *Nature Reviews Genetics* 4:216-224.

Bowen B. W., Rocha L. A., Toonen R. J. & Karl S. A. (2013). The origins of tropical marine biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution* **28**, 359–366.

Caldas J. P., E. M. Díaz-Trujillo, C. B. García & L. O. Duarte. (2009). Revisión histórica de la pesca de tiburones y rayas en el mar Caribe continental de Colombia. Pp. 99-130. En: Puentes, V., A.F. Navia P. A. Mejía-Falla, J. P. Caldas, M. C. Diazgrandos y L. A. Zapata (Eds). *Avances en el Conocimiento de tiburones, rayas y quimeras de Colombia*. Fundación SQUALUS, Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, Instituto Colombiano Agropecuario, COLCIENCIAS, Conservación Internacional, WWF, p 245.

Cappetta H. (1976). Sélaciens nouveaux du London Clay de l'Essex (Yprésien du Bassin de Londres). *Geobios* 9: 551–575.

Cappetta H. (1985). Sur une nouvelle espèce de *Burnhamia* (Batomorphii, Mobulidae) dans l'Yprésien des Ouled Abdoun, Maroc. *Tertiary Research* 7: 27–33.

Cappetta H. (1987). Chondrichthyes II. Mesozoic and Cenozoic Elasmobranchii. In: Schultze HP (ed) *Handbook of paleoichthyology*, vol 3B. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, pp 1–193.

Cappetta H. (2006). Elasmobranchii post-Triadici (index specierum et generum). *Fossilium Catalogus, I. Animalia Pars* 142: 1–472.

Cappetta H. (2012). *Handbook of Paleoichthyology, Vol. 3E: Chondrichthyes Mesozoic and Cenozoic Elasmobranchii: Teeth*. Verlag Dr. Friedrich Pfeil, pp. 512.

Carvalho M. R., Maisey J. G & Grande L. (2004). Freshwater stingrays of the Green River formation of Wyoming (Early Eocene), with the description of a new genus and species and an

analysis of its phylogenetic relationships (Chondrichthyes: Myliobatiformes). *Bull Am Mus Nat Hist* 284:1–136.

Casey J. M. & R. M. Meyers. (1998). Near extinction of a large, widely distributed fish. *Science*. 281: 690- 692.

Castillo-Géniz J. L., Márquez-Farías J. F., Rodríguez de la Cruz M. C., Cortés E & Cid del Prado A. (1998). The Mexican artisanal fishery in the Gulf of Mexico: towards a regulated fishery. *Mar. Freshw. Res.* 49, 611–620.

Castillo-Páez A., Sosa-Nishizaki O., Sandoval-Castillo J., Galván-Magaña F., Blanco-Parra M. P. & Rocha-Olivares, A. (2014). Strong population structure and shallow mitochondrial phylogeny in the banded guitarfish, *Zapteryx exasperata* (Jordan y Gilbert, 1880), from the Northern Mexican Pacific. *J. Hered.* 105, 91–100. doi: 10.1093/jhered/est067.

Castro-Aguirre J. L. & Espinosa-Pérez H. (1996). Listados Faunísticos de México VII. Catálogo Sistemático de las Rayas y Especies Afines de México (Chondrichthyes: Elasmobranchii: Rajiformes: Batoideiomorpha). Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología, Coyoacán, México.

Castro-Aguirre J.L. (1965). Peces, sierra, rayas, mantas, y especies afines de México. *Anales del Instituto Nacional de Investigación Biológico-Pesqueras*. México. Vol. 1. p.259.

Cervigón F. & A. Alcalá. (1999). Los peces marinos de Venezuela. Tiburones y rayas. Vol. 5. Fundación Museo del Mar, Estado Nueva Esparta, Venezuela, pp.230.

Chapman D., Abercrombie D., Douady C., Pikitch E., Stanhope M. & M. Shivji. (2003). A streamlined, bi-organelle, multiplex PCR approach to species identification: Application to global conservation and trade monitoring of the great white shark, *Carcharodon carcharias*. *Conservation Genetics* 4: 415-425.

Cheng X., Narahari B., Simha R., Cheng M. X. & Liu D. (2003). Strong minimum energy topology in wireless sensor networks: NP-completeness and heuristics. *IEEE transactions on mobile computing*, vol. 2, no 3, p. 248-256.

Chenoweth S. F., Hughes J. M., Keenan C. P. & Lavery S. (1998). Concordance between dispersal and mitochondrial gene flow: isolation by distance in a tropical teleost, Lates calcarifer (Australian barramundi). *Heredity*. 80:187–197.

Chevolot M., G. Hoarau., A. Rijnsdorp., W. Stam & J. Olsen. (2006). Phylogeography and population structure of thornback rays (*Raja clavata* L., Rajidae). *Molecular Ecology*, 15/12: 3693-3705. Accessed February 23, 2011 at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-294X.2006.03043.x/full>

Choat H. (2006). Phylogeography and reef fishes: bringing ecology back into the argument. *J. Biogeogr.* 33, 967–968

Claeson K. M., O’Leary M. A., Roberts E. M., Sissoko F., Bouareál M., Tapanila L., Goodwin D., Gottfried M. D. (2010). First Mesozoic record of the stingray *Myliobatis wurnoensis* from Mali and a phylogenetic analysis of Myliobatidae incorporating dental characters. *Acta Palaeontologica Polonica* 55: 655–674.

Coates A. G. & Obando J.A. (1996). *The geological evolution of the Central American Isthmus*. Chicago Press, Chicago, IL.

Coates A. G., Collins M. P., Aubry W. A. & Berggren. (2004). The Geology of the Darien, Panama, and the late Miocene-Pliocene collision of the Panama arc with northwestern South America. *Geol. Soc. Am. Bull.*, 116:1327-1344.

Coates A. G., Aubry M. P., Berggren W. A., Collins L. S. & Kunk M. (2003). Early Neogene history of the Central American arc from Bocas del Toro, western Panama. *Geol. Soc. Am. Bull.* 115, 271–287.

Collin & De Maintenon. (2002). Integrative approaches to biogeography: patterns and processes on land and in the sea. *Integr. Comp. Biol.*, 42, pp. 911–912

Collins A. B., M. R. Heupel., R. E. Hueter., & P. J. Motta. (2007). Hard prey specialists or opportunistic generalists? an examination of the diet of the CownoseRay, *Rhinoptera bonasus*. *Marine and Freshwater Research* 58:135–144.

Collins A. B., Heupel M. R., & Simpfendorfer C. A. (2008). *Estuaries and Coasts*. 31: 1174. doi:10.1007/s12237-008-9100-5

Compagno L. J., V. F. Krupp. & W. Schneider. (1995). En: *Guia FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico centro-oriental* W. Fischer. F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K. E. Carpenter y V. H. Niem (Eds). Vol. II: 648-746.

Compagno L. J. V. (1990). Shark exploitation and conservation. En: *Elasmobranchs as Living Resources: Advances in the Biology, Systematics, and the status of the Fisheries* (H. L. Pratt Jr., S. H. Gurber y T. Taniuchi, eds.). NOAA Technical Report NMFS 90: 391 – 414.

Chouinard A., Pigeon D. & Bernatchez L. 1996. Lack of specialization in trophic morphology between genetically differentiated dwarf and normal forms of the lake

Compagno L. J. V. (1999). Systematics and body form. In: Hamlett, W.C. (Ed.), *Sharks, Skates, and Rays the Biology of Elasmobranchs*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp.1–42

Compagno L. J. V. (2005). Checklist of living Chondrichthyes. Chapter 16. In: Hamlett, W.C. (Ed.), *Reproductive Biology and Phylogeny of Chondrichthyes*, pp. 503–548.

Correa F. A. & L. M. Manjarrés. (2004). Inventario y caracterización general de las unidades económicas de pesca artesanales de La Guajira, Mar Caribe de Colombia. pp. 23-35. En: Manjarrés, L.M. (Ed). *Pesquerías demersales del área norte del Mar Caribe de Colombia y parámetros biológico – pesqueros y poblacionales del recurso pargo*. Universidad del Magdalena, Santa Marta.

Corrigan S. & Beheregaray L. B. (2009). A recent shark radiation: molecular phylogeny, biogeography and speciation of wobbegong sharks (family: Orectolobidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 52, 205–216

Coyne J. A. & Orr H. A. (2004). Speciation, Sinauer Associates. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 353: 287-305.

Craig J. K., Gillikin P. C., Magelnicki M. A. & May L.N. (2010). Habitat use of cownose rays (*Rhinoptera bonasus*) in a highly productive, hypoxic continental shelf ecosystem. Fisheries Oceanography 19:301-317.

Cranston K. & B. Rannala. (2005). News and Commentary (Molecular Clocks): Closing the gap between rocks and clocks. Heredity 94: 461-462.

Crooks G. E., Hon G. Chandonia J. M. & Brenner S. E. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. Genome research, vol. 14, no 6, p. 1188-1190.

Daly-Engel T. S., Seraphin K. D., Holland K. N., Coffey J. P., Nance H. A. (2012) Global Phylogeography with Mixed-Marker Analysis Reveals Male-Mediated Dispersal in the Endangered Scalloped Hammerhead Shark (*Sphyrna lewini*). PLoS ONE 7(1): e29986. doi: 10.1371/journal.pone.0029986

Darriba D., Taboada G. L., Doallo R., Posada D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nature Methods 9(8), 772.

Dawson M. N., J. L. Staton., & D. K. Jacobs. (2001). Phylogeography of the tidewater goby, *Eucyclogobius newberryi* (Teleostei, Gobiidae), in coastal California. Evolution 55:1167–1179.

Dawson M. N. (2001). Phylogeography in coastal marine animals: a solution from California? J. Biogeogr. 28:723–736.

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 sharks. Molecular Ecology. 17:3337–3351.

Dobzhansky T. (1937). Genetics and the Origin of Species, Columbia University Press.

DOF, Diario Oficial de la Federación. (2010). Proyecto de modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001, Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

Doherty P. J., Planes S., Mather P. (1995). Gene flow and larval duration in seven species of fish from the Great Barrier Reef. *Ecology*. 76:2373–2391.

Drummond A.J., Ho S. Y. W., Phillips M. J., Rambaut A. (2006). Relaxed Phylogenetics and Dating with Confidence. *PLoS Biol* 4(5): e88. doi: 10.1371/journal.pbio.0040088

Dulvy N. K., Reynolds J. D. (1997). Evolutionary transitions among egg-laying, livebearing and maternal inputs in sharks and rays. *Proc. Roy. Soc. B – Biol. Sci.* 264, 1309–1315.

Dulvy N. K., Reynolds J. D. (2002). Predicting extinction vulnerability in skates. *Conserv. Biol.* 16 (2), 440–450.

Duncan K. M., Martin A. P., Bowen B. W., De Couet H.G. (2006). Global phylogeography of the scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*). *Mol Ecol.* 15:2239–2251.

Dunn K.A. & Morrissey J. F. (1995). Molecular phylogeny of elasmobranchs. *Copeia* 3, 526–531.

Dunn K. A., McEachran J. D., Honeycutt R. L. (2003). Molecular phylogenetics of myliobatiform fishes (Chondrichthyes: Myliobatiformes), with comments on the effects of missing data on parsimony and likelihood. *Mol. Phylogen. Evol.* 27, 259–270.

Frézal L. & Leblois R. (2008). Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. *Infection, Genetics and Evolution* 8: 727-736.

Ebert D. A. & Bizzarro J. J. (2007). Standardized diet compositions and trophic levels of skates (Chondrichthyes: Rajiformes: Rajoidei). *Env. Biol. Fish.*, 80:221–237.

Edelaar P., Siepielski A. M., Clobert J. (2008). Matching habitat choice causes directed gene flow: a neglected dimension in evolution and ecology. *Evolution* 62, 2462–2472.

Eschmeyer W. N., R. Fricke., J. D. Fong & D. A. Polack. (2010). Marine fish diversity: history of knowledge and discovery (Pisces). *Zootaxa* 2525:19-50.

Eslahchi C., Habibi M., Hassanzadeh R. & Mottaghi, E. 2010. MC-Net: a method for the construction of phylogenetic networks based on the Monte-Carlo method. *BMC Evolutionary Biology* 10: 254.

Felsenstein J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17:368–376.

Fischer W., Krupp W., Schneider C., Sommer K., Carpenter E. & Niems V. (1995). Guía FAO para identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico Centro-oriental. Vol. 3. FAO, Rome

Fisher R. (2010). Life History, Trophic Ecology, and Prey Handling by Cownose Ray, *Rhinoptera bonasus*, from Chesapeake Bay. National Oceanic and Atmospheric Administration.

Fogarty M. J., & Murawski S. A. (1998). Large-scale disturbance and the structure of marine systems: fishery impacts on Georges Bank. *Ecol. Appl.* 8(1): S6–S22.

Forey P. L. (1992). Formal classification, pp. 160-168. In *Cladistics. A practical course in systematics*. Clarendon Press, Oxford.

Frisk M. G., Miller T. J., Fogarty M. J. (2002). The population dynamics of the Little skate *Leucoraja erinacea*, winter skate *Leucoraja ocellata*, and barndoor skate *Dipturus laevis*: predicting exploitation limits using matrix analyses. *ICES J. Mar. Sci.* 59, 576–586.

Funk D. J., Omland K. E. (2003). Species-level paraphyly and polyphyly: Frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 34: 397–423.

Gaither M. R., Bernal M. A., Coleman R. R., Bowen B. W., Jones S. A., Simison W. B. & Rocha L. A. (2015). Genomic signatures of geographic isolation and natural selection in coral reef fishes. *Molecular Ecology* **24**, 1543–1557.

Gallo-da-silva V., Afonso A. F. & Gomes U.L. (1997). Estudo taxonômico das espécies de *Rhinoptera Cuvier*, 1829 ocorrentes no litoral brasileiro. Parte I: Condroncocrânio de exemplares jovens de *Rhinoptera brasiliensis* Müller & Henle, 1841 e *Rhinoptera bonasus* (Mitchill, 1815) (Elasmobranchii, Myliobatiformes, Rhinopteridae). *An. Acad. bras. Ci.* 69(4):585-600.

González-Isais M. & Montes-Domínguez H.M., (1996). Primer registro de *Rhinoptera brasiliensis* (Batoidei: Rhinopteridae) en Veracruz, México. *Revista de Biología Tropical*, 44(2B): 947–948.

González-Isáis M. & Domínguez H. M. M. (2004). Comparative anatomy of the superfamily Myliobatoidea (Chondrichthyes) with some comments on phylogeny. *J Morphol* 262:517–535

Grant W. S. & Bowen B. W. (1998). Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *J Hered* 89:415–426

Grant W.S. & R.W Leslie. (2001). Inter-ocean dispersal is an important mechanism in the zoogeography of Hakes (Pisces: Merluccius spp.) *Journal of Biogeography* 28 (6):699-721

Gray A. E., Mulligan T. J., Hannah R.W. (1997). Food habits, occurrence, and population structure of the bat ray, *Myliobatis californica*, in Humboldt Bay, California. *Environ Biol Fishes.* 49:227–238.

Griffiths A. M., Griffiths A. M., Sims D. W., Cotterell S. P., El Nagar A. E., Ellis J. R., Lynghammar A., Mchugh M., Neat F. C., Pade N. G., Queiroz N., Serra-Pereira B., Rapp T., Wearmouth V. J. & Genner M. J. (2010). Molecular markers reveal spatially segregated cryptic species in a critically endangered fish, the common skate (*Dipturus batis*). *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences Series B* 227 (1687):1497–1503.

Grusha, D. (2005). Investigation into the life history of the cownose ray, *Rhinoptera bonasus*, (Mitchill 1815). MS thesis, Virginia Institute of Marine Science, College of William and Mary.

Haimovici M., Martins A.S. & Vieira P.C. (1996). Distribuicao e abundancia de peixes teleosteos demersais sobre a plataforma continental do sul do Brasil. [Distribution and abundance of demersal bony fishes in the continental shelf of southern Brazil]. *Revista Brasileira de Biologia*, 56(1), 27-50.

Hajibabaei M., Janzen D. H., Burns J. M., Hallwachs W. & Hebert, P.D.N. (2006). DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 968-971.

Hall T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41, 95-98.

Hamlett J. A., Musick A. M., Eulitt R. L., Jarrell & M. A Kelly. (1996). Ultrastructure of uterine trophonemata, accommodation for urolactation, and gas exchange in the southern stingray, *Dasyatis americana*. *Canadian J. Zool.* 74:1417-1430.

Head M. L., Kozak G. M., Boughman J. W. (2013). Female mate preferences for male body size and shape promote sexual isolation in threespine sticklebacks. *Ecol. Evol.* 3, 2183-2196.

Heads M. (2005). Dating nodes on molecular phylogenies: a critique of molecular biogeography. *Cladistics*, 21(1), 62-78.

Hebert P. D. N., A. Cywinska., S. L Ball & J. R. De Waard. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 270, 313-21.

Hebert P. D. N., Stoeckle M. Y., Zemplak T. S. & Francis C. M. (2004). Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology* 2: e312.

Heist E. J. (1999). A review of population genetics in sharks. *Am Fish Soc Symp* 23:161-168

Holmes B., D. Steinke & R. Ward. (2009). Identification of shark and ray fins using DNA barcoding. *Fisheries Research* 95 (2-3):280-288.

Horman S. R., Frank M. & Luning-Prak N. (2005). A Two Hit Transposon Model for the Origin of Immunoglobulin Gene Rearrangement. Submitted Pathology and Laboratory Medicine, University of Pennsylvania, 422 Curie Blvd., Philadelphia, P. 19104, USA

Huelsenbeck J. P. & F. Ronquist. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17:754–755.

Hueter R. E., Heupel M. R., Heist E. J., Keeney D. B. (2005). Evidence of philopatry in sharks and implications for the management of shark fisheries. *J Northw Atl Fish Sci.* 35:239–247.

Human B. A., Owen E. P., Compagno L. J. V., Harley E. H., (2006). Testing morphologically based phylogenetic theories within the cartilaginous fishes with molecular data, with special reference to the catshark family (Chondrichthyes; Scyliorhinidae) and the interrelationships within them. *Mol. Phylogen. Evol.* 39, 384–391.

Jacobs D. K., Haney T. A., Louie K. D. (2004). Genes, diversity, and geologic process on the Pacific coast. *Annu Rev Earth Planet Sci.* 32:601–652.

Kashiwagi T., Marshall A. D., Bennett M. B., Ovenden J. R. (2012). The genetic signature of recent speciation in manta rays (*Manta alfredi* and *M. birostris*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 64: 212–218.

Keeney D. B., & Heist E. J. (2006). Worldwide phylogeography of the blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) inferred from mitochondrial DNA reveals isolation of western Atlantic populations coupled with recent Pacific dispersal. *Molecular Ecology*, 15(12), 3669-3679.

Kent G. y Carr R. (2001). *Comparative anatomy of the vertebrates*. Novena edition. Nueva Cork. McGraw-Hill. p 524.

Kimura D. K. (1980). Likelihood methods for the von Bertalanffy growth curve. *U.S. National Marine Fisheries Service Fishery Bulletin* 77:765–776.

Kingman J. F. C. (1982). The coalescent. *Stochastic processes and their applications*, 13(3), 235-248.

Kinlan B. P., Gaines S.D., & Lester S. E. (2005). Propagule dispersal and the scales of marine community process. *Diversity and Distributions*, 11(2), 139-148.

Kitamura T., Takemura A., Watabe S., Taniuchi T. & Shimizu M. (1996). Molecular phylogeny of the sharks and rays of superorder Squalia based on mitochondrial cytochrome b gene. *Fisheries Sci.* 62, 340–343.

Knowlton N. & L.A. Weigt. (1998). New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci* 265:2257-2263.

Kriwet J. & Benton M. J. (2004). Neoselachian (Chondrichthyes, Elasmobranchii) diversity across the Cretaceous-tertiary boundary. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 214:181–194.

Lasso C., O. Lasso-Alcalá., C. Pombo., M. Smith. (2004). Ictiofauna de las aguas estuarinas del delta del río Orinoco (caños Pedernales, Mánamo, Manamito) y golfo de Paria (río Guanipa): diversidad, distribución, amenazas y criterios para su conservación. Pp. 70-84. En: C. A. Lasso, L. E. Alonso, A. L. Flores, G. Love (eds.). *Evaluación rápida de la biodiversidad y aspectos sociales de los ecosistemas acuáticos del delta del río Orinoco y golfo de Paria, Venezuela*. Boletín RAP de Evaluación Biológica 37. Conservation Internacional, Washington D.C.

Last P. R., Naylor G. J. & Manjaji-Matsumoto B. M. (2016). A revised classification of the family Dasyatidae (Chondrichthyes: Myliobatiformes) based on new morphological and molecular insights. *Zootaxa*, vol. 4139, no 3, p. 345

Last P.R. & Stevens J.D. (1994). *Sharks and Rays of Australia*. CSIRO, Australia.

Last, P. R & Stevens J. D. (2009). *Shark and Rays of Australia*. Second Edition. CSIRO Publishing. Melbourne. p 656.

Le Port A. & Lavery S. (2012). Population structure and phylogeography of the short-tailed stingray, *Dasyatis brevicaudata* (Hutton 1875), in the Southern Hemisphere. *J Hered.* 103:174–185.

Lessios H. A. (2008). The great American schism: divergence of marine organisms after the rise of the Central American Isthmus. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 39, 63–91.

Librado P. & Rozas J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, vol. 25, no 11, p. 1451-1452.

Lim K. C., Lim P-E., Chong V. C., Loh K-H. (2015). Correction: Molecular and Morphological Analyses Reveal Phylogenetic Relationships of Stingrays Focusing on the Family Dasyatidae (Myliobatiformes). *PLoS ONE* 10(5): e0129411. doi:10.1371/journal.pone.0129411

Lisney T. J., Yopak K. E., Montgomery J. C. & Collin S. C. (2008). Variation in brain organization and cerebellar foliation in chondrichthyans: batoids. *Brain Behav. Evol.* 72, 262–282.

Lovejoy N. R. (1996). Systematics of myliobatoid elasmobranchs: with emphasis on the phylogeny and historical biogeography of neotropical freshwater stingrays (Potamotrygonidae: Rajiformes). *Zool J Lin Soc* 117:207–257.

Lynghammar A., Christiansen J. S., Mecklenburg C. W., Karamushko O. V., Møller P. R. & Gallucci V. F. (2013). Species richness and distribution of chondrichthyan fishes in the Arctic Ocean and adjacent seas. *Biodiversity*, 14, 57–66.

Maisey J. G., Naylor G. J. P. & Ward D. J. (2004). Mesozoic elasmobranchs, neoselachian phylogeny and the rise of modern elasmobranch diversity. In: Arriata, G., Tintori, A. (Eds.), *Mesozoic Fishes 3*. Verlag Dr Friedrich Pfiel, München, pp. 17–56.

Maisey J. G. (1984). Higher elasmobranch phylogeny and biostratigraphy. *Zool J Linnean Soc* 82:33–54.

Manjarrés L. M., A. Fernandez., A. Espeleta., B. Gonzalez & L. De La Hoz. (1988). Estructura y perspectivas de desarrollo del subsector pesquero costa Guajira. Evaluación de captura y de esfuerzo pesquero por procedimiento de pesca. Vol II. Universidad del Magdalena y Carbones de Colombia. Magdalena, p 352.

Mardulyn P. 2012. Trees and/or networks to display intraspecific DNA sequence variation? *Molecular Ecology* 21: 3385-3390.

Márquez G. E. (1990). Ecosistemas marinos. Caribe Colombia. Fondo FEN Colombia, Bogotá: pp. 115-133.

Marko P. B. & A.L Moran. (2002). Correlated evolutionary divergence of egg size and a mitochondrial protein across the Isthmus of Panama *Evolution* 56:1303-1309.

Márquez-Farías J. F. (2005). Gillnet mesh selectivity for the shovelnose guitarfish (*Rhinobatos productus*) from fishery-dependent data in the artisanal ray fishery of the Gulf of California, Mexico. *J. Northwest Atl. Fish. Sci.* (35): 443–452.

Márquez-Farías F. (2002). The artisanal ray fishery in the Gulf of California: development, fisheries research and management issues. *Shark News*. 14:7–8.

Marshall A. D., Compagno L. J. V., Leonard J. V. & Bennett M. B. (2009). Redescription of the genus *Manta* with resurrection of *Manta alfredi* (Krefft, 1868) (Chondrichthyes; Myliobatoidei; Mobulidae). *Zootaxa* 2301, 1–28.

Martin A. P. & Naylor G. J. P. (1997). Independent origins of Wlter-feeding in megamouth and basking sharks (Order Lamniformes) inferred from phylogenetic analysis of cytochrome b gene sequences. In: Yano K., Morrissey J.F., Yabumoto Y., Nakaya K. (Eds.), *Biology of the Megamouth Shark*. Tokai University Press, Tokyo, pp.39–50.

Martin A. P., Naylor G.J.P. & Palumbi S.R. (1992). Rates of mitochondrial DNA evolution in sharks are slow compared with mammals. *Nature* 357, 153–155.

Martin A. P. & Palumbi S. R. (1993). Protein evolution in different celular environments Cytochrome b in sharks and mammals. *Mol Biol Evol.* 10:873–891.

Mayr E. (1942). *Systematics and the Origin of Species, From the Viewpoint of a Zoologist*, Columbia University Press

- Mayr E. (1963). Animal species and evolution. Belknap Press, Cambridge, MA
- McComb D. M. & S.M. Kajiura (2008). Visual fields for four batoid fishes: a comparative study. *J. Exp. Biol.* 211, 482–490.
- Mc Dowell J. & R.A. Fisher. (2013). Final Report. Discrimination of Cownose Ray, *Rhinoptera bonasus*, stocks base don microsatellite DNA Markers. Virginia Institute of Marine Science College of William and Mary P. O. Box 1346. Gloucester Point, Virginia. VIMS Marine Resource Report No. 2013-8. pp 18.
- McEachran J. D. & N. Aschliman (2004). Phylogeny of batoidea. In: Carrier, J. C., Musick, J.A., Heithaus, M. R. (Eds.), *Biology of Sharks and their relatives*. CRC Press, Boca Raton, FL. 79-114 p.
- McEachran, J. D. & de Carvalho, M. R. (2002). Rays. En: Carpenter K, editor. *The Living Marine Resources of the Western Central Atlantic*. FAO Species Identification Guide for Fishery Purposes and American Soviet of Ichthyologists and Herpetologists Special Publication No. 5, 3 v. Rome: FAO; p 508-590.
- McEachran J. D. & J. D. Fechhelm. (1998). *Fishes of the Gulf of Mexico*. Volume 1. University of Texas Press.
- McEachran J. D. & di-Sciara Notarbartolo G. (1995). Batoideos, p. 745–792. En: *Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca Centro Oriental: vol. 2 Vertebrados – Part 1* (W. Fischer, F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K.E. Carpenter, y V.H. Niem, eds.). FAO: Rome, Italy
- McEachran J. D., Dunn K. A., & T. Miyake. (1996). Interrelationships of the batoid fishes (Chondrichthyes: Batoidea). In: Stiassny, M.J., Parenti, L.R., Johnson, G.D. (Eds.), *Interrelationships of Fishes*. Academic Press, London, pp. 63–82.
- Menni R. C. & F. W. Stehmann. (2000). Distribution, environment and biology of batoid fishes off Argentina, Uruguay and Brazil. A review. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales*, n.s. 2(1): 69- 109.

Meyer C. P. & G. Paulay. (2005). DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *Public Library of Science Biology* 3, 10 pp.e422.

Morgan G. J. (1998). Emile Zuckerkandl, Linus Pauling, and the Molecular Evolutionary Clock, 1959-1965. *Journal of the History of Biology* 31: 155-178.

Morin P. A., Archer F. I., Foote A. D., Vilstrup J., Allen E. E., Wade P., Durban J., Parsons K., Pitman R., Li L., Bouffard P., Abel Nielsen S. C., Rasmussen M., Willerslev E., Gilbert M.T., Harkins T., (2010). Complete mitochondrial genome phylogeographic analysis of killer whales (*Orcinus orca*) indicates multiple species. *Genome Res.* 20, 908–916.

Moritz C. & D. M. Hillis. (1996). Molecular systematics: context and controversies, pp. 1-13. En: D. M. Hillis, C. Moritz & B. K.Mable (eds.). *Molecular systematics*, 2da ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.

Morrissey J. F., Dunn K. A. & Mülle, F. (1997). The phylogenetic position of *Megachasma pelagios* inferred from mtDNA sequence data. In: Yano, K., Morrissey, J. F., Yabumoto, Y. y Nakaya, K. (Eds.), *Biology of the Megamouth Shark*. Tokai University Press, Tokyo, Japan, pp.33–37.

Moura C. J., Harris D. J., Cunha M. R. (2008). DNA barcoding reveals cryptic diversity in marine hydroids (Cnidaria, Hydrozoa) from coastal and deep-sea environments. *Zoologica Scripta*, 37: 93–108.

Mugnier J. L., Huyghe P., Leturmy P. & F Jouanne. (2004). Episodicity and rates of thrust sheet motion in Himalaya (Western Nepal). In: McClay (Ed.), *Thrust Tectonics and Hydrocarbon Systems*. A. A. P. G. Mem, 82, pp. 91–114.

Musick J. A., Burgess G., Cailliet G., Camhi M., & S. Fordham. (2000). Management of sharks and their relatives (Elasmobranchii). *Fisheries* 25(3): 9–13.

Myers R. A., Baum J. K., Shepherd T. D., Powers S. P & C. H. Peterson. (2007). Cascading effects of the loss of apex predatory sharks from a coastal ocean. *Science* 315:1846–1850

Navarro J. A. (2011). Ecomorfología del aparato mandibular de peces batoideos. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. La Paz, B.C.S. 149 pp.

Navia, Andrés Felipe, Mejía-Falla, Paola Andrea, & Hleap, José Sergio. (2016). Zoogeography of Elasmobranchs in the Colombian Pacific Ocean and Caribbean Sea. *Neotropical Ichthyology*, 14(2), e140134. Epub July 07, 2016. <https://dx.doi.org/10.1590/1982-0224-20140134>

Naylor G. J. P., Martin A. P., Mattison E. G. & W. M. Brown. (1997). Interrelationships of lamniform sharks: Testing phylogenetic hypotheses with sequence data. In: Kocher, T.D., Stepien, C. (Eds.), *Molecular Systematics of Fishes*. Academic Press, New York, pp. 199–218.

Naylor G. J. P., Ryburn J. A., Fedrigo O. & A. Lopez. (2005). Phylogenetic relationships among the major lineages of modern elasmobranchs. In: Hamlett W.C., Jamieson B.G.M., editors. *Reproductive Biology and Phylogeny of Chondrichthyes: Sharks, batoids, and chimaeras*. vol. 3. Enfield, NH: Science Publishers, Inc. p. 1–25.

Naylor G. J. P., Caira J. N., Jensen K., Rosana K. A. M., White W. T. & P. R. Last. (2012). A DNA Sequence-Based Approach To the Identification of Shark and Ray Species and Its Implications for Global Elasmobranch Diversity and Parasitology. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 367, 1-262

NCDMF (North Carolina Division of Marine Fisheries). (2007). North Carolina Bay Scallop Fishery Management Plan. North Carolina Department of Environment and Natural Resources. North Carolina Division of Marine Fisheries. Morehead City, NC. p 199

Neer J. A. & B.A. Thompson. (2005). Life history of the cownose ray, *Rhinoptera bonasus*, in the northern Gulf of Mexico, with comments on geographic variability in life history traits. *Environmental Biology of Fishes* 73:321–331.

Neer J. A., Kenneth A. R. & C. Enric. (2007). Simulating the effects of temperature on individual and population growth of *Rhinoptera bonasus*: a coupled bioenergetics and matrix modeling approach. Marine Ecology Progress Series 329:211-223.

Nei M. & S. Kumar. (2000). Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press. E. U. A. p. 339

Nelson G. & D. E. Rosen. (1981). Vicariance Biogeography, A Critique, Columbia University Press

Nelson J. S. (2006). Fishes of the world. Cuarta Ed. Wiley, Hoboken, EE.UU., p.601

Nishida K. (1990). Phylogeny of the suborder Myliobatoidei. Mem. Facul. Fish. Hokkaido Univ. 37, 1–108

Palacios-Barreto P. & A. Ramírez-Hernández. (2010). Aspectos Biológico pesqueros de los batoideos de interés comercial (Chondrichthyes:Elasmobranchii) capturados artesanalmente en Mayapo, El Pájaro y Manaure, Media Guajira, Caribe colombiano. Tesis. Facultad de Ciencias. Universidad del Magdalena.

Palumbi S. R. (1992). Marine speciation on a small planet. Trends Ecol Evol 7:114–118.

Pank M., Stanhope M., Natanson L., Kohler N. & M. Shivji. (2001). Rapid and simultaneous identification of body parts from the morphologically similar sharks *Carcharhinus obscurus* and *Carcharhinus plumbeus* (Carcharhinidae) using multiplex PCR. Mar Biotechnol 3:231-240.

Patterson C., Williams D. M. & C. J. Humphries. (1993). Congruence between molecular and morphological phylogenies. Annual Review of Ecology and Systematics 24: 153-188.

Pérez-Jiménez J. C. (2011). Biología reproductiva de la raya *Rhinoptera bonasus* (Elasmobranchii) en el sureste del Golfo de México. Hidrobiológica 21(2):159-167.

Peterson C. H., Fodrie F. J., Summerson H. C. & S.P. Powers. (2001). Site-specific and density-dependent extinction of prey by schooling rays: generation of a population sink in top-quality habitat for bay scallops. *Oecologia* 129, 349-356.

Pfeil F. H. (1981). Eine nektonische Fischfauna aus dem unteroligozänen Schönecker Fischeschiefer des Galon-Grabens in Oberbayern. *Geologica Bavarica* 82: 357–388.

Phillips N. M., Chaplin J. A., Morgan D. L., Peverell S. C. (2011). Population genetic structure and genetic diversity of three critically endangered *Pristis* sawfishes in Australian waters. *Marine Biology* 158: 903-915

Plank S. M., Lowe C. G., Feldheim K. A., Wilson R. R., Brusslan J. A. (2010). Population genetic structure of the round stingray *Urobatis halleri* (Elasmobranchii:Rajiformes) in southern California and the Gulf of California. *J. Fish Biol.* 77:2 (329-340).

Poortvliet M., Olsen J. L., Croll D. A., Bernardi G., Newton K., Kollias S., O'Sullivan J., Fernando D., Stevens G., Galván Magaña F., Seret B., Wintner S., Hoarau G. (2014). A dated molecular phylogeny of manta and devil rays (Mobulidae) based on mitogenome and nuclear sequences. *Mol Phylogenet Evol.* 2015 Feb;83:72-85. doi: 10.1016/j.ympev.2014.10.012. Epub 2014 Nov 13.

Posada D. & Crandall K. A. (2001). Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 37-45.

Powers S. P. & D. G. Gaskill. (2005). Bay scallop–cownose ray interactions. Report to North Carolina Sea Grant, Fishery Resource Program. 03-EP-02. p 24.

Pratt H. L. Jr., & Casey J. G. (1990). Shark reproductive strategies as a limiting factor in directed fisheries, with a review of Holden's method of estimating growth parameters, p. 97–109. En: *Elasmobranchs as living resources: advances in the biology, ecology, systematics, and the status of fisheries* (Pratt, H.L. Jr., Gruber, S.H., y Taniuchi, T., eds.). NOAA Tech. Rep. NMFS. 90.

Puckridge M., Andreakis N., Appleyard S. A. & Ward R. D. (2013). Cryptic diversity in flathead fishes (Scorpaeniformes: Platycephalidae) across the Indo-West Pacific uncovered by DNA barcoding. *Mol. Ecol. Res.*13:32–42.

Rambaut A. & J. Drummond. (2007). Tracer v1.4. (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>).

Ribeiro A. D. E. O., Oliveira C. & Ribeiro A. D. (2012). Molecular identification of Brazilian marine fishes through DNA barcodes.

Richards V. P., Henning M., Witzell W., Shivji M. S. (2009). Species delineation and evolutionary history of the globally distributed spotted eagle ray (*Aetobatus narinari*). *J Hered.* 100:273–283.

Riddle B. R., Dawson M. N., Hadly E. A., Hafne, D. J., Hickerson M. J., Mantooth S. J., & Yoder A. D. (2008). The role of molecular genetics in sculpting the future of integrative biogeography. *Progress in Physical Geography*, 32(2), 173-202.

Robert E. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Research* 32(5), 1792-97.

Robertson D. & G. Allen. (2008). Peces costeros del Pacífico oriental Tropical: un sistema de información en línea. Versión 1.0. Smithsonian Tropical Research Institute, Balboa, Panamá., www.stri.org/sftep.

Rocco L., Liguori I., Costagliola D., Morescalchi M. A, Tinti F. & Stingo V. (2007). Molecular and karyological aspects of Batoidea (Chondrichthyes, Elasmobranchi) phylogeny. *Gene* 389:80–86.

Rocha L. A. & Bowen B. W. (2008). Speciation in coral reef fishes. *J. Fish Biol.* 72, 1101–1121.

Roopnarine P. D. (2001). A history of diversification, extinction, and invasion in tropical America as derived from species-level phylogenies of chionine genera (Family Veneridae). *J. Paleontol* 75:644-657.

Rosenberger L. J. (2001). Pectoral fin locomotion in batoid fishes: undulation versus oscillation. *J. Exp. Biol.* 204, 379–394.

Sandoval-Castillo J. & Rocha-Olivares A. (2011). Deep mitochondrial divergence in Baja California populations of an aquilopelagic elasmobranch: the golden cownose ray J. Hered. 102 (3), 269-274.

Sandoval-Castillo J. R., Rocha-Olivares A., Villavicencio Garayzar C., Balart E. (2004). Cryptic isolation of Gulf of California shovelnose guitarfish evidenced by mitochondrial DNA. Mar Biol. 145:983–988.

Santana-Morales O., J. L. Castillo-Géniz., Sosa-Nishizaki O. & Rodriguez-Medrano C. (2004). Catálogo de tiburones, rayas y quimera (Chondrichthyes) que habitan en las aguas del norte del Golfo de California. Reporte técnico. Centro de investigación científica y de educación superior de Ensenada (CICESE).

Schaefer J. T. & Summers A. P. (2005). Batoid wing skeletal structure: novel morphologies, biomechanical implications, and phylogenetic patterns. J. Morphol. 264, 298–313.

Schluessel V., Broderick D., Collin S. P., Ovenden J. R. (2010). Evidence for extensive population structure in the white-spotted eagle ray within the Indo-Pacific inferred from mitochondrial DNA gene sequences. J Zool. 281:46–55.

Schluter D. (1996). Ecological speciation in postglacial fishes. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 351: 807-814.

Schneider H. (2007). Métodos de análise filogenética: um guia prático. 3ra ed. Riberão Preto: Holos Editora & Sociedade Brasileira de Genética. p 200.

Schneider T. D. & Stephens R. M. (1990). Sequence logos: a new way to display consensus sequences. Nucleic acids research, vol. 18, no 20, p. 6097-6100.

Schultz J. K., Feldheim K. A., Gruber S. H., Ashley M. V., McGovern T. M., Bowen B. W., (2008). Global phylogeography and seascape genetics of the lemon sharks (genus *Negaprion*). Mol. Ecol. 17, 5336–5348.

Schwartz F. J. (1990). Mass migratory congregations and movements of several species of cownose rays, Genus *Rhinoptera*: a world-wide review. *Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society* 106:10-13.

Shirai S. (1996). Phylogenetic interrelationships of neoselachians (Chondrichthyes, Euselachii),” in *Interrelationships of Fishes*, M. L. Stiassny J, L. R. Parenti, & G. D. Johnson, Eds., pp. 9–34, Academic Press, San Diego, Calif, USA.

Smith J. W. & J. V. Merriner. (1985). Food habits and feeding behavior of the Cownose Ray, *Rhinoptera bonasus*, in lower Chesapeake Bay. *Estuaries* 8:305–310.

Smith J. W. & Merriner J.V. (1986). Observations on the reproductive biology of the cownose ray, *Rhinopteras bonasus*, in Chesapeake Bay. *Fishery Bulletin* 84 (4):871-877.

Smith J.W. & J. V.Merriner. (1987). Age and growth, movements and distribution of the Cownose Ray, *Rhinoptera bonasus*, in Chesapeake Bay. *Estuaries* 10:153–164.

Smith W. D., Bizzarro J. J., Richards V.P., Nielsen J., Márquez-Flarías F., Shivji M. S. (2009). Morphometric convergence and molecular divergence: the taxonomic status and evolutionary history of *Gymnura crebripunctata* and *Gymnura marmorata* in the eastern Pacific Ocean. *J Fish Biol.* 75:761–783.

Spaet J. L.Y. & Berumen M. L. (2015). Fish market surveys indicate unsustainable elasmobranch fisheries in the Saudi Arabian Red Sea Original Research Article. *Fisheries Research*, Volume 161, January, Pages 356-364 .

Stamatakis A. (2014). RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies. *Bioinformatics* 10.1093/bioinformatics/btu033 <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/early/2014/01/21/bioinformatics.btu033>.

Steinke D., Zemplak T. S. & Hebert P. D. (2009). Barcoding Nemo: DNA-based identifications for the ornamental fish trade. *PLoS one*, 4(7), e6300.

Stelbrink B., Von Rintelen T., Cliff G., Kriwet J. (2010). Molecular systematics and global phylogeography of angel sharks (genus *Squatina*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 54, 395–404.

Stevens J., Bonfil R., Dulvy N. & Walker P. (2000). The Effects of Fishing on Sharks, Rays and Chimaeras (Chondrichthyans), and the Implications for Marine Ecosystems. *ICES J. of Mar. Sci.*;57:476-494.

Stevenson C., Katz L. S., Micheli F., Block B., Heiman K.W., Perle C., Weng K., Dunbar R., & Witting J. (2007). High apex predator biomass on remote Pacific islands. *Coral Reefs* 26: 47-51.

Stevenson D. E., Orr J. W., Hoff G. R., McEachran J. D. (2008). Emerging patterns of species richness, diversity, population density, and distribution in the skates (Rajidae) of Alaska. *Fish Bull* 106:24–36.

Summers A. P. (2000) Stiffening the stingray skeleton—an investigation of durophagy in myliobatid stingrays (Chondrichthyes, Batoidea, Myliobatidae). *J Morphol* 243:113–126.

Swofford D. L. (2003). PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Tajima F. (1983). Evolutionary relationship of ADN sequences in finite populations. *Genetics* 105:437-460.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipinski A., & Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.

Taylor E. B., Harvey S., Pollard S. & Volpe J. (1997). Postglacial genetic differentiation of reproductive ecotypes of kokanee (*Oncorhynchus nerka*) in Okanagan Lake, British Columbia. *Molecular Ecology*, 6: 503-517.

Teacher A. G. F. & Griffiths D. J. (2011). HapStar: automated haplotype network layout and visualization. *Molecular Ecology Resources* 11: 151-153.

Toffoli D., Hrbek T., Araújo M. L. G., Almeida M. P., Charvet-Almeida P. & Farias I. P. (2008). A test of the utility of DNA barcoding in the radiation of the freshwater stingray genus *Potamotrygon* (Potamotrygonidae, Myliobatiformes). *Genet. Mol. Biol. (Suppl. 1)*, 324–336.

UICN. (2001). *Categorías y Criterios de la Lista Roja de la UICN: Versión 3.1*. Comisión de Supervivencia de Especies de la UICN. UICN, Gland, Suiza y Cambridge, Reino Unido. pp. ii + 33.

Underwood C. J. (2006). Diversification of the Neoselachii (Chondrichthyes) during the Jurassic and Cretaceous. *Paleobiology Memoirs* 32:215–235.

Vázquez-Domínguez E., Castañeda-Rico S., Garrido-Garduño T. & Gutiérrez-García T. A. (2009). Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. *Revista Chilena de Historia Natural* 82: 277-297.

Vélez-Zuazo X. & Agnarsson I. (2010). Shark tales: a molecular species-level phylogeny of sharks (Selachimorpha, Chondrichthyes). *Mol. Phylogenet. Evol.* 2010 November 30 (Epub ahead of prin).

Vermeij G. J. (2001). *Community assembly in the sea: geologic history of the living shore biota*. Marine community ecology. Sinauer, Sunderland, Mass, 39-60.

Villavicencio Garayzar C. (1995). Distribución temporal y condición reproductiva de las rayas (PICES: BATOIDEI), capturadas comercialmente en Bahía Almejas, B.C.S., México. *Rev Inv Cient.* 6:1–12.

Vooren C. M. (1997). Demersal elasmobranchs. Subtropical convergence environment: the coast and the sea in the Southwestern Atlantic, 141, 146.

Ward R. D., & Holmes B. H. (2007). An analysis of nucleotide and amino acid variability in the barcode region of cytochrome c oxidase I (cox1) in fishes. *Molecular Ecology Notes*, 7(6), 899-907.

Ward R. D., Zemlak T. S., Innes B. H., Last P. R. & Hebert P. D. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1847–1857. <http://doi.org/10.1098/rstb.2005.1716>.

Ward R. D., B. H. Holmes T., S. Zemlak & P. J. Smith. (2007). Part 12 — DNA barcoding discriminates spurdogs of the genus *Squalus*. In Last, P. R., W. T. White, and J. J. Pogonoski. (editors). *Descriptions of new dogfishes of the genus Squalus (Squaloidea: Squalidae)*. 117–130. Hobart CSIRO Marine and Atmospheric Research Paper 014.

Ward R. D., Holmes B. H., White W. T. & Last P. R. (2008). DNA barcoding Australasian chondrichthyans: results and potential uses in conservation. *Marine and Freshwater Research* 59:57–71.

Ward R. D., Hanner R., & Hebert P. D. (2009). The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of fish biology*, 74(2), 329-356.

Ward R. D. (2009). DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. *Molecular Ecology Resources* 9:1077–1085.

Weigmann S. (2016), Annotated checklist of the living sharks, batoids and chimaeras (Chondrichthyes) of the world, with a focus on biogeographical diversity. *J Fish Biol*, 88: 837–1037. doi:10.1111/jfb.12874

Weissing F. J., Edelaar P. & Van Doorn G. S. (2011). Adaptive speciation theory: a conceptual review. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 65, 461–480.

White W. T., Furumitsu K. & Yamaguchi A. (2013). A new species of eagle ray *Aetobatus narutobiei* from the Northwest Pacific: an example of the critical role taxonomy plays in fisheries and ecological sciences. *PLoS One*. 8:e83785.

Wiley E. O. & Lieberman B. S. (2011). *Phylogenetics: Theory and practice of phylogenetic systematics*, second edition. Wiley-Blackwell. E. U. A., New Jersey. p 427.

Wilke T., Schultheiß R. & Albrecht C. (2009). As time goes by: a simple fool's guide to molecular clock approaches in invertebrates. *American Malacological Bulletin*, 27(1/2), 25-45.

Winchell C. J., Martin A. P. & Mallatt J. (2004). Phylogeny of elasmobranchs based on LSU and SSU ribosomal RNA genes, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, vol. 31, no. 1, pp. 214–224.

Woodward A. S. (1889). *Catalogue of the Fossil Fishes in the British Museum (Natural History), Part 1: Containing the Elasmobranchii*. London, UK.

Wourms J. P. (1981). Viviparity: maternal- fetal relationships in fishes. *Amer. Zool.* 21: 473-515.

Yearsley G. K., Last P. R. & Gomon M. F. (2008). *Trygonoptera imitata* sp. nov., a new stingaree (Myliobatoidei: Urolophidae) from southeastern Australia. In: Last P.R., White W.T., Pogonoski J.J., editors. *Descriptions of New Australian Chondrichthyans*. CSIRO Marine and Atmospheric Research Paper No. 22. Hobart: CSIRO Marine and Atmospheric Research. p. 261–267.

Zachos J., Pagani M., Sloan L., Thomas E., Billups K. (2001). Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. *Science* 292, 686–693.

Zemlak T. S., Ward R. D., Connell A. D., Holmes B. H., Hebert P. D. N. (2009). DNA barcoding reveals overlooked marine fishes. *Molecular Ecology Resources* 9: (Suppl. 1)237–242.