



**Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho"  
Campus de Botucatu  
Instituto de Biociencias  
Departamento de Morfologia**

**Análisis Morfométrico, Merístico, Filogenético y  
Filogeográfico del Caballo de Mar *Hippocampus reidi*  
(Ginsburg 1933) (Teleostei: Syngnathidae) de la costa  
nororiental de Venezuela.**

**ERNESTO JOSE RON ESTEVES**

**Tesis presentada ante el  
curso de Post Grado del  
Instituto de Biociencias  
para la obtención del  
Título de Doctor en  
Ciencias Biológicas.**

**Orientador: Dr. Claudio de Oliveira**

**Agosto, 2010**



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E  
TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO  
CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Ron Esteves, Ernesto José

Análisis Morfométrico, Merístico y Filogeográfico del Caballo de Mar *Hippocampus reidi* (Ginsburg 1933) (Teleostei: Syngnathidae) de la costa nororiental de Venezuela. / Ernesto José Ron Esteves. – Botucatu : [s.n.], 2010.

Tese (Doutorado)–Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu 2010.

Orientador: Dr. Claudio de Oliveira

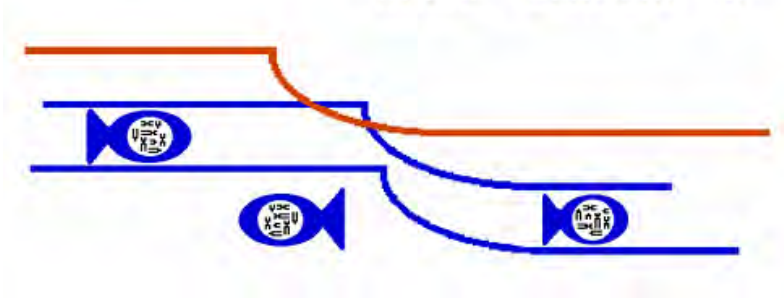
Assunto

1. Peixe Marinho – Filogeografia 2. Peixe - Genética 3. Ecologia molecular

CDD

Palavras-chave: Filogeografia; Morfometria, DNA mitocondrial; Ecologia molecular; Syngnathiformes, Syngnathidae.

Laboratório de Biologia e Genética de Peixes  
UNESP - Botucatu - SP



***“Sorprenderse, extrañarse, es comenzar a entender”***  
***(J. Ortega y Gasset)***

***Dedico este trabajo a***

***Camilo Andrés y Luis Martín...***

***Mis hijos***

***Andrés Alejandro y Juan Diego...***

***Mis sobrinos***

***Diana y Elena...***

***Mis sobrinas***

***Niños de hoy y adultos del mañana, herederos del linaje de origen monofilético que constituye mi familia, sin cuyas sonrisas, sueños y esperanzas, en esta sociedad marcadamente estructurada, este trabajo quizás no tendría sentido...***

## **AGRADECIMENTOS**

Al mar y su naturaleza, por acompañarme todos los días de mi vida.

A Lilia Esteves, mi mamá, por apoyarme en todas las aventuras e historias que he emprendido desde que salí de su vientre.

A mi súper familia, Jennifer, Luis Martin, Camilo y Reina, por brindarme su apoyo sin restricciones en todas las etapas de mi formación profesional.

A mi orientador y amigo el Profesor Claudio de Oliveira, por su confianza al brindarme la oportunidad de hacer este sueño realidad, sin sus profesionales orientaciones y sus enseñanzas este trabajo no habría sido posible.

A mi amigo, padre académico y hoy compañero de estudios, Profesor Mauro Nirchio, por su desinteresado apoyo y estímulo constante para seguir creciendo como profesional en el interesante mundo de las ciencias.

A mi estudiante, hoy colega y compañera de proyectos Mariana Padrón, por haberme invitado a transitar el camino de los caballitos de mar, gracias por tu confianza.

A los compañeros del II Taller sobre Genética de la Conservación, donde se iniciaron las primeras discusiones sobre la posibilidad de esta investigación.

Al Profesor y amigo Juan Ignacio Gaviria por su apoyo constante y continuas reflexiones sobre el quehacer universitario.

Al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente por su continuo apoyo financiero; y a todos sus miembros, que desde sus diferentes puestos de trabajo no dejaron de motivarme y alentarme para cumplir esta importante meta.

Al Fondo IEA (Iniciativa de Especies Amenazadas) y PROVITA, por el apoyo financiero que permitió realizar parte del trabajo de campo durante los proyectos de monitoreo de las poblaciones de *Hippocampus*, realizados en las Lagunas de la Restinga y las Marites.

A los Profesores Fausto Foresti, Cesar Martins, Adrienne Pinto Wasko, Eli Poulin, Roberto Cipriani, Luis Miguel Márquez por sus certeras orientaciones e incentivos.

A Guilherme “o vengador justiciero” por su confianza y apoyo en aquellos meses decisivos, en los que alejado mi familia pude trabajar en la obtención de estos resultados.

A los amigos y compañeros del “Laboratório de Biologia y Genética de Peixes”: Konrado, Andréia Poletto, Carlos, Daniela, Kelly, Juliana, Irani, Guilherme (Cabelos), Andréia Alves, Tatiane, Marcio, Alex, Kátia, Fernanda Alves, Juliano, Gleisy, Tatiana, Lessandra, Victor, Jefferson, Fábio, Prof. Celso, Welcy, Patrícia, Lígia, Waldo, Karina, Luciana, Marisa, Luis, Emanuel, Ricardo, Marlon, Ze, Heraldo y Markos (el griego), así como a aquellos que sin querer olvide incluir, por brindarme su cálida amistad y hacer de mis estadías en Brasil, mucho más que un curso de postgrado.

A los funcionarios de la “Pós-graduação”: Luciene, Maria Helena e Sergio, por su paciencia, amistad y rapidez en las solicitudes.

Al personal del Departamento de Morfología, de la UNESP, Botucatu.

A los compañeros y amigos de la cotidianidad en nuestra Escuela de Ciencias Aplicadas del Mar: Montserrat, Nayive, Gabriela, Fabiola, Lorelys, Sara, Yuraima, Rodolfo, Edlin, Jose Patti, Marilina Vásquez, Edoglis, Régulo López padre (tortuguita), José Marcano, Régulo hijo, Alexis Marcano, Juancito, Beto, Wicho, Alexander.....

A la comunidad pesquera de las Marites y la Restinga, por su receptividad en los muestreos y en especial a Pancho, Cabeza e Iguana y Chicho.

Al Lic. Bladimir Gómez y a la Dra. Carmen Alfonsi, por facilitarme la utilización de los ejemplares de sus investigaciones de campo para la adquisición de las muestras del Golfo de Cariaco.

A Henio y Gim por facilitar el acceso a las muestras de Maracaibo.

Al Instituto de Biociencias de la Universidade Estadual Paulista de Botucatu y a la Escuela de Ciencias Aplicadas del Mar de la Universidad de Oriente, por facilitar sus instalaciones para la realización de esta investigación.

A mis estudiantes, sin cuyo apoyo y estímulo constante este esfuerzo no tendría sentido...

A todos Uds...

Mil gracias por su apoyo!

## TABLA DE CONTENIDO

		Pág.
I.	<b>RESUMEN</b>	XI
II.	<b>ABSTRACT</b>	XIII
III.	<b>LISTA DE TABLAS</b>	XV
IV.	<b>LISTA DE FIGURAS</b>	XVII
1.	<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1.	El Género <i>Hippocampus</i> : Aspectos Taxonómicos y su Estatus de Conservación	1
1.2.	Marcadores Moleculares y ADN Mitocondrial	9
1.3.	Estructura Poblacional y Variabilidad Genética	16
2.	<b>OBJETIVOS</b>	27
3.	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	28
3.1.	Ubicación de las Localidades de Procedencia de las Muestras	28
3.2.	Colecta de las Muestras de Tejido	29
3.3.	Identificación Taxonómica de las Especies del Género <i>Hippocampus</i>	29
3.4.	Extracción de ADN	34
3.5.	Electroforesis en Gel de Agarosa	36
3.6.	Amplificación de los Fragmentos de los Genes Citocromo B y Citocromo Oxidasa I.	37
3.7.	Verificación de las Reacciones de PCR	39
3.8.	Purificación de los Productos de PCR para Secuenciación	39
3.9.	Secuenciamiento de los Productos de PCR	39



3.10	Análisis de los Datos	41
3.10.1	Análisis Merístico	41
3.10.2	Análisis Morfométrico	41
3.10.3	Análisis Morfológico	42
3.10.4	Análisis Filogenético	42
3.10.5	Análisis Poblacionales	44
4.	<b>RESULTADOS</b>	51
4.1.	Caracterización Taxonómica de las Especies	51
4.1.1.	Análisis Merístico	51
4.1.2.	Análisis Morfométrico	52
4.1.3.	Análisis Morfológico	58
4.2.	Diferenciación Molecular de las Especies	59
4.2.1.	Caracterización de los Marcadores Moleculares	59
4.2.1.1.	Citocromo Oxidasa I (COI)	59
4.2.1.2.	Citocromo B (CYT B)	61
4.2.1.3.	Partición COI+CYTB	63
4.2.2.	Análisis Filogenético	65
4.2.2.1.	Método de Neighbour – Joining	65
4.2.2.2.	Método de Máxima Parsimonia	66
4.2.2.3.	Método de Máxima Probabilidad	67
4.2.3.	Descripción de las Especies Estudiadas	70
4.3.	Diversidad y Estructura Genética Poblacional	74
4.3.1.	Diversidad Nucleotídica y Haplotípica	74
4.3.2.	Análisis de Varianza Molecular	78

4.3.3.	Comparaciones Inter - Poblacionales	79
4.3.4.	Inferencia demográfica	82
4.3.5.	Análisis de clados anidados	86
5.	<b>DISCUSIÓN</b>	89
5.1	Caracterización Taxonómica de las Especies	89
5.2	Diferenciación Molecular de las Especies	93
5.3	Diversidad y Estructura Genética Poblacional	98
5.3.1	Diversidad Nucleotídica y Diversidad Haplotípica	98
5.3.2	Estructura Genética Poblacional	99
5.3.3	Inferencia Demográfica y Análisis de Clados Anidados	103
5.3.4	Consideraciones Taxonómicas y para la Conservación.	106
6.	<b>CONCLUSIONES</b>	110
7.	<b>RECOMENDACIONES</b>	112
8.	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	113
9.	<b>ANEXOS</b>	129

## RESUMEN

Fue realizado el análisis morfométrico, merístico, morfológico y filogenético del caballo de mar *Hippocampus reidi* (Ginsburg 1933) (Teleostei: Syngnathidae) de la costa nororiental de Venezuela, mediante la aplicación de técnicas de taxonomía convencional y molecular utilizando fragmentos secuenciados de los genes Citocromo Oxidasa I y Citocromo B como marcadores genéticos. Los resultados indican que no es posible identificar las diferentes entidades taxonómicas de la región caribeña venezolana con base solamente en un solo tipo de caracteres, por lo que es necesario utilizar información merística, morfológica y morfométrica de forma conjunta para la identificación de las mismas, lográndose identificar las variables longitud del rostro (SnL), ancho del cuerpo en la región torácica (TW9), longitud de la cabeza (HL), altura de la coroneta (CH), número de espinas supra oculares (ES) y posición de los anillos prominentes en vista dorsal, como caracteres diagnósticos a nivel específico. La aplicación de las técnicas moleculares fue de suma utilidad en la correcta identificación y separación de los individuos de las dos especies, resaltando la importancia e utilidad de los genes Citocromo Oxidasa I y Citocromo B como marcadores moleculares para estas especies. Adicionalmente, fue realizado un análisis genético poblacional bajo el enfoque filogeográfico, con la especie *Hippocampus reidi* que resultó ser la más abundante en las regiones de muestreo, con la finalidad de comparar la diversidad genética, con base en la información obtenida de secuencias del gen Citocromo B del ADN mitocondrial, para determinar la estructura geográfica y proponer una hipótesis filogeográfica que establezca las relaciones entre y dentro de las poblaciones del Mar Caribe (Laguna de la Restinga, Laguna de las Marites, Golfo de Cariaco y Golfo de Venezuela) y la localidad de Natal, Brasil, ubicada en el Océano Atlántico Sur Occidental. Los resultados de la diversidad nucleotídica y diversidad haplotípica, conjuntamente con la presencia de varios haplotipos únicos en cada una de las localidades, señalaron diferencias importantes entre las localidades de estudio. Las pruebas de neutralidad e inferencia demográfica, basada en redes de haplotipos, parámetros demográficos, el índice de Raggedness y la

prueba de  $F_u$  fueron consistentes en evidenciar la existencia de indicios de crecimiento o declinación poblacional pasado. La realización del AMOVA para someter a prueba la hipótesis de estructuración poblacional a escala micro geográfica entre Poblaciones Insulares y Poblaciones Continentales del Mar Caribe venezolano, no arrojó diferencias significativas entre grupos, encontrándose una divergencia genética moderada entre las poblaciones y la mayor parte de la variación de los datos asociada a diferencias dentro de las localidades de estudio. Igualmente, fue realizada un AMOVA con la finalidad de someter a prueba la hipótesis de estructuración geográfica a escala macro geográfica entre Poblaciones del Mar Caribe y Poblaciones de Atlántico Sur, no siendo posible tampoco detectar diferencias significativas en la estructura propuesta a nivel de grupos, en función de los valores de  $\Phi_{st}$  la divergencia genética entre poblaciones fue muy alta. El cálculo de los índices  $F_{st}$  y la evaluación del número de migrantes entre localidades, así como la prueba exacta de diferenciación poblacional permitieron corroborar las diferencias entre las localidades del Mar Caribe y del Atlántico Sur Occidental. La asociación significativa entre las distancias genéticas y las distancias geográficas detectadas por la prueba de Mantel y el análisis filogenético de clados anidados, bajo el enfoque de parsimonia (NCPA) sugieren que la estructura poblacional pareciera estar determinada principalmente por el flujo genético restringido, con aislamiento por distancia, a nivel macro geográfico, mientras que al nivel micro geográfico se ajustan mejor al modelo paso a paso (Stepping Stone). La información suministrada en el presente estudio reviste de especial importancia como línea base para la elaboración de planes de monitoreo y protección de las especies del género *Hippocampus*, ya que conjuntamente con la legislación vigente propuesta para las áreas distribución habitual de estas especies, se podrán desarrollar acciones más eficientes dirigidas a la preservación de estas especies y ecosistemas, colaborando a la preservación de la biodiversidad del país y de la variabilidad genética de las especies marino costeras que en ellos habitan.

## ABSTRACT

Morphometric, meristic, morphological and phylogenetic analysis from the seahorse *Hippocampus reidi* (Ginsburg 1933) (Teleostei: Syngnathidae) from the northeastern coast of Venezuela was performed, through the application of techniques using conventional and molecular taxonomy from the sequenced fragments of genes Cytochrome Oxidase I and Cytochrome B as genetic markers. The results indicate that it is not possible to identify the different taxa of Venezuelan Caribbean region, based only on a single type of characters, so it is necessary to use information meristic, morphological and morphometric together to identify them, achieving identify the variables snout length (SnL), body width in the thoracic region (TW9), head length (HL), height of the coronet (CH), number of supra oculars spines (ES) and prominent position of the rings in dorsal view, as diagnostic features at specific level. The application of molecular techniques was very useful in the correct identification and separation of individuals of both species, highlighting the importance and usefulness of the genes Cytochrome Oxidase I and Cytochrome B as molecular markers. Additionally, we carried out a population genetic analysis under the phylogeographic approach, with the species *Hippocampus reidi*, that was the most abundant in the sampling regions, in order to compare the genetic diversity based on information obtained from the Cytochrome B gene mitochondrial DNA sequences to determine the geographical structure and propose a phylogeographic hypotheses in order to establish the relationship between and within populations of the Caribbean Sea (Laguna de la Restinga, Laguna de las Marites, Cariaco Gulf and Gulf of Venezuela) and the locality of Natal, Brazil, located in the Western Atlantic Ocean. The results of nucleotide diversity and haplotype diversity, together with the presence of several unique haplotypes in each of the localities, indicated significant differences between localities. Tests of neutrality and demographic inference, based on networks of haplotypes, demographic parameters, the Raggedness index and Fu test were consistent in showing the existence of evidence of past population growth or decline. The completion of the AMOVA in order to test the

hypothesis of micro-scale population structure among Island populations and Continental populations of the Venezuelan Caribbean Sea throw no significant differences either between groups, being a genetic moderate divergence among the populations, most of the variation of the data was associated to differences within localities. Similarly, an AMOVA was performed in order to test the hypothesis of macro-scale geographic structure among the Caribbean and South Atlantic populations, not being possible neither to detect significant differences in the structure proposed at group level, in function of the values of  $\Phi_{st}$  the genetic divergence among populations was very high. The calculation of  $F_{st}$  indices and the evaluation of the numbers of migrants among localities, and the exact test of population differentiation pointed the difference between the populations from the Caribbean Sea and the Western South Atlantic. Finally, the significant association between genetic distances and geographical distances detected by the Mantel test and nested clade phylogenetic analysis under parsimony approach (NCPA) suggests that the population structure seems to be conditioned by restricted gene flow, with isolation by distance, at macro geographical level, while at the micro geographical level they are adjusted well to the step-by-step pattern (Stepping Stone). The information provided in this study is of special importance as a baseline for monitoring plans and protection of species of the genus *Hippocampus*, since together with the proposed legislation for the usual distribution areas of these species, may be developed more efficient measures for the preservation of these species and ecosystems, contributing to the preservation of the country's biodiversity and genetic variability of coastal marine species that habit there.

## LISTA DE TABLAS

		Pág.
TABLA 1.	Sinonimias empleadas para la designación de las especies <i>Hippocampus</i> e <i>Hippocampus reidi</i> .	5
TABLA 2.	Secuencias de los <i>primers</i> utilizados para la amplificación de los segmentos de los diferentes genes de interés.	38
TABLA 3.	Valores modales, mínimo y máximo de las variables merísticas de <i>Hippocampus reidi</i> e <i>Hippocampus erectus</i> .	51
TABLA 4.	Eigenvalores y porcentajes de varianza de cada uno de los componentes principales resultantes del análisis multivariado de 11 variables morfométricas determinadas en <i>Hippocampus erectus</i> e <i>Hippocampus reidi</i> .	52
TABLA 5.	Valores promedio, mínimo, máximo, y desviación estándar de las variables morfométricas de <i>Hippocampus reidi</i> e <i>Hippocampus erectus</i> .	57
TABLA 6.	Características moleculares de las secuencias de Citocromo B de <i>Hippocampus reidi</i> e índices de diversidad nucleotídica y haplotípica por localidad de muestreo y en total.	74
TABLA 7.	Distribución porcentual de haplotipos del fragmento amplificado del gen Citocromo B de <i>Hippocampus reidi</i> por localidad.	76
TABLA 8.	Haplotipos y sitios variables del fragmento amplificado del gen Citocromo B de <i>Hippocampus reidi</i> .	77
TABLA 9.	Análisis de varianza molecular (AMOVA) para probar la hipótesis de estructuración geográfica de los haplotipos de <i>Hippocampus reidi</i> entre las localidades continentales e insulares de las costas de Venezuela.	78

TABLA 10.	Análisis de varianza molecular (AMOVA) para probar la hipótesis de estructuración geográfica de los haplotipos de <i>Hippocampus reidi</i> entre las localidades del Atlántico Sur y el Mar Caribe venezolano.	79
TABLA 11.	Valores de <i>Fst</i> entre pares de poblaciones.	80
TABLA 12.	Numero de Migrantes (Nm) por generación entre Poblaciones.	81
TABLA 13.	Prueba Exacta de Diferenciación entre Poblaciones.	81
TABLA 14.	Parámetros de expansión poblacional de <i>Hippocampus reidi</i> determinados para las localidades de estudio.	85
TABLA 15.	Prueba <i>Fs</i> de <i>Fu</i> para las secuencias de <i>Hippocampus reidi</i> de las localidades de estudio.	86
TABLA 16.	Valores de las variables merísticas de las especies reseñadas para océano Atlántico.	89



## LISTA DE FIGURAS

		Pág.
FIGURA 1.	Representación esquemática del orden Gasterosteiformes y las familias que lo conforman según Nelson, 2006.	2
FIGURA 2.	Distribución circumglobal de algunas especies del género <i>Hippocampus</i> .	3
FIGURA 3.	Fotografías de las especies del género <i>Hippocampus</i> encontradas en el Océano Atlántico Centro Occidental.	4
FIGURA 4.	Representación esquemática de la molécula de ADNmt, señalizando la ubicación de los genes Citocromo Oxidasa I (COI) y Citocromo B (CYT B).	12
FIGURA 5.	Modelos de Estructura Poblacional: a) Modelo de Islas, b) Modelo Paso a Paso (Stepping Stone), c) Modelo de Aislamiento por Distancia y d) Modelo de Meta poblaciones.	19
FIGURA 6.	Representación esquemática de las relaciones de la Filogeografía con otras disciplinas científicas.	22
FIGURA 7.	Ubicación geográfica de las localidades de procedencia de las muestras de <i>Hippocampus sp.</i>	28
FIGURA 8.	Morfología externa y variables merísticas y morfométricas utilizadas para la identificación de las especies del género <i>Hippocampus</i> .	31
FIGURA 9.	Fotografías de los ejemplares tipo de <i>Hippocampus reidi</i> Ginsburg, 1933, depositados en el Museo Nacional de Historia Natural de Washington, U.S.A. (USNM).	33
FIGURA 10.	Fotografías de ejemplares de <i>Hippocampus erectus</i> Perry 1810, depositados en el Museo Nacional de Historia Natural de Washington, U.S.A. (USNM).	33
FIGURA 11.	Gráfica de los individuos de <i>Hippocampus reidi</i> e <i>Hippocampus erectus</i> en el espacio morfométrico multivariado definido por los CP 1 y CP 2.	53

FIGURA 12.	Gráfica de los individuos de <i>Hippocampus reidi</i> e <i>Hippocampus erectus</i> en el espacio morfométrico multivariado definido por los CP 2 y CP 3.	54
FIGURA 13.	Gráfica de los individuos de <i>Hippocampus reidi</i> e <i>Hippocampus erectus</i> en el espacio morfométrico multivariado definido por los CP 1 y CP 3.	55
FIGURA 14.	Coefficientes de participación de las 11 variables morfométricas de <i>Hippocampus erectus</i> e <i>Hippocampus reidi</i> utilizadas en el CP 1.	56
FIGURA 15.	Coefficientes de participación de las 11 variables morfométricas de <i>Hippocampus erectus</i> e <i>Hippocampus reidi</i> utilizadas en el CP 2.	57
FIGURA 16.	Alineamiento de las 35 secuencias del gen Citocromo Oxidasa I provenientes de los ejemplares del género <i>Hippocampus</i> .	59
FIGURA 17.	Gráfica de las tasas de transiciones y transversiones del gen COI (606 pb) versus la divergencia genética utilizando el modelo de distancia <i>F84</i> .	60
FIGURA 18.	Alineamiento de las 35 secuencias del gen Citocromo B provenientes de los ejemplares del género <i>Hippocampus</i> .	61
FIGURA 19.	Gráfica de las tasas de transiciones y transversiones del gen CYT B (837 pb) versus la divergencia genética utilizando el modelo de distancia <i>F84</i> .	62
FIGURA 20.	Gráfica de las tasas de transiciones y transversiones de los segmentos concatenados de los genes COI y CYT B (1443 pb) amplificados versus la divergencia genética utilizando el modelo de distancia <i>F84</i> .	64
FIGURA 21.	Arboles filogenéticos de los fragmentos secuenciados de los genes Citocromo Oxidasa I, Citocromo B y la partición conjunta COI + CYT B, obtenidos mediante el método de Neighbour – Joining.	65
FIGURA 22.	Arboles filogenéticos de los fragmentos secuenciados de los genes COI, Citocromo B y la partición COI+CYT B, obtenidos mediante el método de Máxima Parsimonia.	66

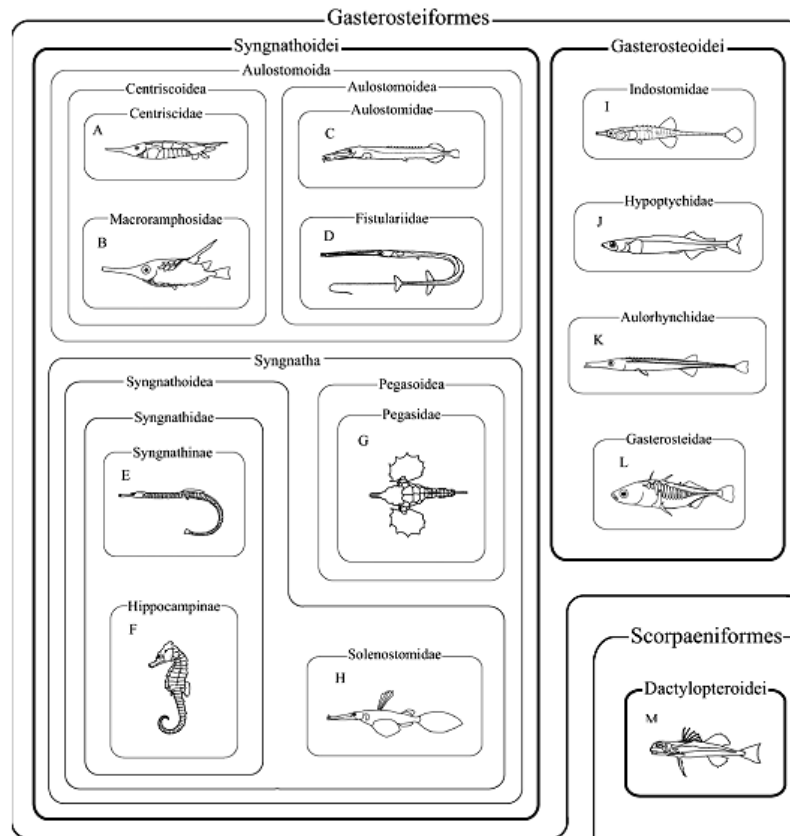
FIGURA 23.	Arboles filogenéticos de los fragmentos secuenciados de los genes Citocromo Oxidasa I, Citocromo B y la partición conjunta COI + CYT B, obtenidos mediante el método de Máxima Probabilidad.	67
FIGURA 24.	Árbol filogenético de los haplotipos de <i>Hippocampus reidi</i> obtenidos mediante el método de Máxima Parsimonia con base en las secuencias del gen Citocromo B.	69
FIGURA 25.	Ejemplares pertenecientes a la especie <i>Hippocampus reidi</i> identificados mediante los métodos convencionales y moleculares empleados en el presente estudio	70
FIGURA 26.	Ejemplares pertenecientes a la especie <i>Hippocampus erectus</i> identificados mediante los métodos convencionales y moleculares empleados en el presente estudio	72
FIGURA 27.	Redes de haplotipos de las 4 localidades de muestreo.	82
FIGURA 28.	Red de haplotipos de los 122 individuos de las 4 localidades de muestreo.	83
FIGURA 29.	Distribuciones mismatch bajo el modelo de población con tamaño constante: A) Laguna las Marites, B) Golfo de Cariaco, C) Laguna de la Restinga y D) Natal.	84
FIGURA 30.	Red de haplotipos y su diseño anidado asociado para <i>Hippocampus reidi</i> en el Mar Caribe y el Atlántico Sur Occidental.	87
FIGURA 31.	Relaciones filogenéticas entre 22 especies del género <i>Hippocampus</i> con base en un árbol Neighbour – Joining realizado a partir de secuencias del gen Citocromo B.	96
FIGURA 32.	Síntesis de las relaciones filogenéticas entre 29 especies del género <i>Hippocampus</i> con base árboles de Máxima Parsimonia e Inferencia Bayesiana construidos a partir de las particiones individuales y combinadas de Aldolasa, Intrón RP1, 16S RNA y Citocromo B.	97

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. El Género *Hippocampus*: Aspectos Taxonómicos y su Estatus de Conservación.

La taxonomía formal de las especies del género *Hippocampus* se inicia con la obra *Systema Naturae* (1758) en donde se cataloga el primer ejemplar de caballito marino, originalmente denominado en esta obra como *Syngnathus hippocampus* Linnaeus 1758 y posteriormente declarado sinonimia de *Hippocampus hippocampus* (Linnaeus 1758). Desde entonces, más de una treintena de investigadores, ictiólogos y naturalistas han descrito nuevas especies (Lourie *et al.*, 1999) y han tratado, en mayor o menor grado, de establecer las bases para la clasificación de sus especies. No obstante, aun quedan muchas preguntas por responder en cuanto a su taxonomía y posición sistemática, así como sobre diversos aspectos biológicos.

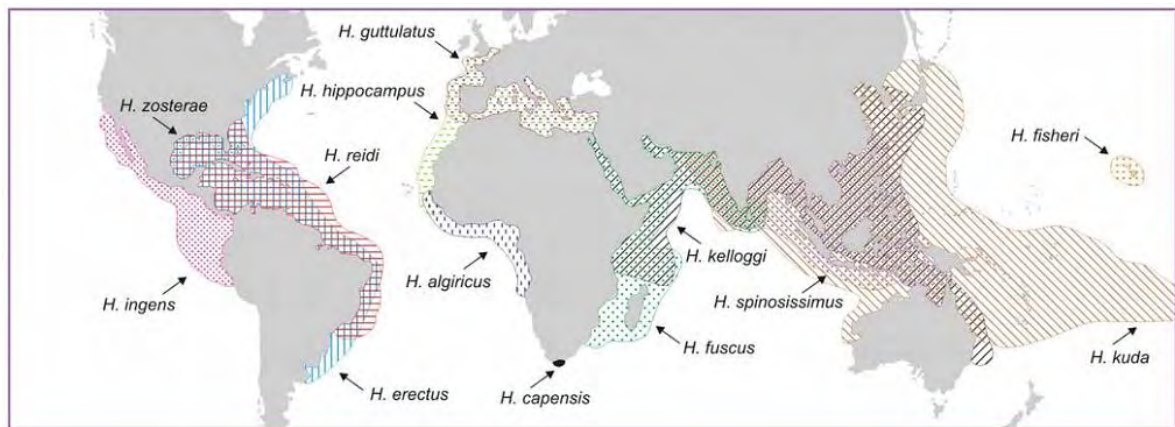
Los caballitos de mar son peces teleósteos pertenecientes a la Clase Actynopterygii y son comumente agrupados dentro del Orden Gasterosteiformes, en la familia Syngnathidae, conjuntamente con las familias Solenostomidae, Pegasidae, Macrorhamphosidae, Centriscidae, Aulostomidae, Fistularidae, Gasterosteidae, Hipoptychidae, Indostomidae y Aulorhynchidae (Nelson, 2006) (Figura 1). Sin embargo, estudios recientes realizados por Kawahara *et al.* (2008) utilizando información molecular proveniente de la secuenciación del ADN mitocondrial completo de 13 especies representativas de las once familias que conforman el orden Gasterosteiformes, han indicado explícitamente que especies que previamente se habían reconocido como miembros de este orden, han divergido basalmente entre los Percomorpha en tres clados diferentes, lo que rechazaría la monofilia de este orden y señalaría la necesidad de realizar algunos cambios a nivel de los taxos superiores y la reorganización de sus integrantes, cambiando la estructura sistemática reconocida hasta la fecha.



**Figura 1.- Representación esquemática del orden Gasterosteiformes y las familias que lo conforman según Nelson, 2006.**

Los caballitos marinos son ubicados taxonómicamente en un solo género (*Hippocampus* Rafinesque, 1810) y debido a la gran similaridad de sus morfologías se les considera monomórficos (Bijukumar, *et al.*, 2008), con un patrón corporal caracterizado por una cabeza similar a la de los caballos terrestres, en ángulo recto con el cuerpo erguido; ojos con movimiento independiente; una trompa tubular desprovista de dientes, la cual sirve para succión de los alimentos; un tracto digestivo sin un estomago diferenciado, piel sin escamas que la cubran y adherida a una serie de placas óseas visibles como anillos que rodean el tronco y la cola prehensil. No poseen aletas pélvicas, ni caudal, y tienen solamente una aleta dorsal propulsora, dos pequeñas pectorales estabilizadoras en ambos lados de la cabeza y una aleta anal reducida (Foster & Vincent, 2004). Muchas especies de *Hippocampus* presentan una distribución circumglobal (Figura 2), lo que

pudiese sugerir que el género se originó antes del cierre del Mar de Thetys, hace al menos 20 millones de años (Teske *et al.*, 2007), lo que explicaría el gran nivel de especialización ecológica de sus especies, que se evidencia en la variedad de ambientes y nichos ecológicos utilizados por las diferentes especies para su subsistencia en el tiempo.

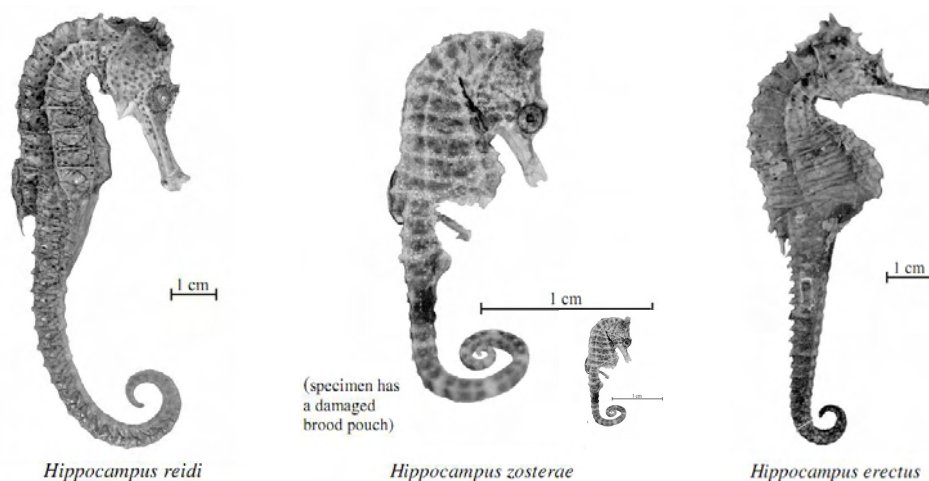


**Figura 2.- Distribución circumglobal de algunas especies del género *Hippocampus*.**

A nivel específico, las dificultades en la identificación y clasificación de las especies del género *Hippocampus* se evidencia en la gran cantidad de nombres empleados para la designación de las especies, señalándose más de 133 designaciones nominales (Froese & Pauly, 2010). Adicionalmente, existe un gran desconocimiento acerca de cuáles de ellas representan especies reales y cuales son simplemente sinonimias, identificaciones erróneas, incorrecto etiquetado en los museos o errores ortográficos de la nomenclatura (Lourie *et al.*, 1999). Encontrándose que no existe una posición homogénea entre los investigadores sobre el número válido de especies, ya que mientras, Lourie *et al.*, (1999, 2004) reconocen un total de 32 especies válidas para el género, Kuitert (2000, 2001) señala que este número debe ser alrededor de 50 especies. De lo que surge la urgente necesidad de invertir esfuerzos en la revisión comprensiva y clarificación de la taxonomía de las especies de este género (Vari, 1982).

Al respecto, Lourie *et al.*, (1999), ha señalado que la confusión en la taxonomía de las especies del género *Hippocampus* se fundamenta en cuatro razones principalmente: a) limitada variación morfológica entre las especies, b) inexistencia o fallas en las descripciones del material tipo, c) designación del mismo nombre para diferentes especies y d) la habilidad que tienen los caballitos de mar para camuflarse ellos mismos, mediante el cambio de coloración y el crecimiento de filamentos y prolongaciones de la piel para integrarse al ambiente que los rodea, lo que dificulta la determinación y delimitación de las características diagnósticas para cada una de las especies.

En total se han señalado seis especies para el Océano Atlántico, reconociéndose a *Hippocampus hippocampus* Linnaeus 1758, *Hippocampus guttulatus* Cuvier, 1829 e *Hippocampus algiricus* Kaup, 1856 como las especies válidas del Atlántico Centro Oriental. Mientras que para el Océano Atlántico Occidental han sido señaladas las especies *Hippocampus erectus* Perry, 1810; *Hippocampus zosterae* Jordan & Gibert, 1882 e *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933 (Figura 3). Las cuales se distribuyen en las zonas tropicales y templadas de este océano entre los 40° latitud Norte y los 35° latitud Sur (Vari, 1982).



**Figura 3.- Fotografías de las especies del genero *Hippocampus* que habitan en el Océano Atlántico Centro Occidental.**

En las costas de Venezuela, se reconocen dos de las tres especies citadas para el Atlántico Occidental, *Hippocampus erectus* e *Hippocampus reidi* (Cervigón, 1966; Mago, 1970; Román, 1980, Valdez & Aguilera, 1987; Cervigón, 1991). No obstante, su distinción taxonómica no es sencilla, dada la amplia variabilidad de sus caracteres, por lo que existe mucha superposición en los rangos de valores de los mismos. Adicionalmente, la plasticidad fenotípica de su morfología externa, en conjunto con los variados patrones de coloración, hacen complicada la identificación de las especies. De hecho, cuando se revisa la historia taxonómica de estas especies puede constatarse que, además de haberse utilizado diferentes y variados nombres para su designación (17 nominaciones diferentes para *H. erectus* y 6 para *H. reidi*), en varios casos se empleó la misma denominación para ambas entidades taxonómicas, incluso algunos taxónomos llegaron a proponer especies diferentes con base a ejemplares que hoy en día son reconocidos como pertenecientes a la misma (Tabla 1).

**Tabla 1.- Sinonimias empleadas para la designación de las especies *Hippocampus erectus* e *Hippocampus reidi***

<i>Hippocampus erectus</i> Perry 1810 Denominación de especie Válida	<i>Hippocampus reidi</i> Ginsburg 1933 Denominación de especie Válida
<i>Hippocampus hudsonius</i> De Kay, 1842	<i>Hippocampus longirostris</i> Kaup, 1856
<i>Hippocampus punctulatus</i> Guichenot, 1853	<i>Hippocampus guttulatus</i> Goode 1877
<i>Hippocampus marginalis</i> Kaup, 1856	<i>Hippocampus punctulatus</i> Starks 1913
<i>Hippocampus fascicularis</i> Kaup, 1856	<i>Hippocampus obtusus</i> Ginsburg 1933
<i>Hippocampus laevicaudatus</i> Kaup, 1856	<i>Hippocampus poeyi</i> Howell Riveró, 1934
<i>Hippocampus brevirostris</i> Knight, 1866	<i>Hippocampus hudsonius punctulatus</i> Ginsburg, 1937
<i>Hippocampus guttulatus</i> Günther, 1876	
<i>Hippocampus antiquorum</i> Goode, 1877	
<i>Hippocampus villosus</i> Günther, 1876	
<i>Hippocampus stylifer</i> Jordan & Gilbert, 1882	
<i>Hippocampus kincaidi</i> Townsend & Barbour, 1906	
<i>Hippocampus brunneus</i> Bean, 1907	
<i>Hippocampus hudsonius hudsonius</i> Ginsburg, 1937	
<i>Hippocampus hudsonius punctulatus</i> Ginsburg, 1937	
<i>Hippocampus hudsonius kincaidi</i> Ginsburg, 1937	
<i>Hippocampus erectus hudsonius</i> Briggs, 1958	
<i>Hippocampus erectus erectus</i> Briggs, 1958	



Como ha sido señalado para otras especies, la definición taxonómica debe ser establecida antes de que medidas de conservación efectivas puedan ser aplicadas para su protección (Ihsen *et al.*, 1981). Por lo tanto, la resolución de los problemas de identificación taxonómica facilitará la modificación legislativa de las prácticas de pesca y el desarrollo de acciones dirigidas a proteger las áreas de distribución de estas especies. De hecho, Lourie *et al.* (1999), han señalado que la dificultad para determinar la identidad taxonómica de las especies que conforman el género *Hippocampus*, conjuntamente con la determinación de aspectos ecológicos como distribución, abundancia, viabilidad, etc.; así como la detección de las rutas de comercialización y el efecto que las extracciones voluntarias o incidentales puedan tener sobre las especies del género, impiden que acciones de manejo y conservación puedan ser tomadas, haciendo necesaria la estandarización de la nomenclatura para evitar confusiones y hacer más efectiva la comunicación entre los entes involucrados en la preservación de la biodiversidad de nuestros ambientes marino costeros.

A nivel mundial, las poblaciones de caballitos de mar apuntan a un considerable problema de supervivencia (CITES, 2002; Dias *et al.*, 2002; IUCN, 2003), derivado de la combinación de la pérdida y fragmentación de sus hábitats naturales tales como praderas de fanerógamas, ecosistemas coralinos y ecosistemas de manglar (Curtis *et al.*, 2004; Goffredo *et al.*, 2004;), la captura intencional para su comercialización como recursos medicinales, peces ornamentales y la fabricación de curiosidades artesanales; así como las capturas accidentales por aparejos de pesca no selectivos (Baum *et al.*, 2003, 2005; Martin-Smith *et al.*, 2004; Foster & Vincent, 2005; Salin *et al.*, 2005).

En diversas regiones del mundo, las cifras de abundancia de las poblaciones de caballitos de mar muestran una marcada disminución (Martin-Smith & Vincent, 2005); habiéndose catalogado 9 de las 33 especies del género como “Vulnerable” en la Lista Roja de la IUCN. Además, todo el género ha sido incluido en el Apéndice II del CITES, lo que implica que los

165 países miembros de esta Convención, entre los que se encuentran Brasil y Venezuela, deben llevar a cabo un monitoreo sobre el comercio internacional de los caballitos de mar y generar el conocimiento necesario sobre las poblaciones silvestres (CITES, 2002), de manera que se pueda contar con la información suficiente para evaluar y determinar los impactos que sobre estas se ejercen (IUCN, 2003; Lourie *et al.*, 2004).

Aunque en Venezuela no se tiene indicios de que exista un comercio nacional o internacional que estimule el desarrollo de actividades de captura para el abastecimiento de las especies del género *Hippocampus*, como en otros países vecinos (Baum *et al.*, 2005), no se puede descartar el futuro desarrollo e incremento de actividades comerciales que involucren estas especies, dado su atractivo como peces ornamentales y el incremento de las actividades de acuariofilia marina (Wood, 2001; WCMC, 2002; Monteiro-Neto *et al.*, 2003), facilitadas enormemente con la introducción del agua de mar artificial en el mercado.

Los caballitos de mar son particularmente vulnerables a la declinación poblacional como producto de su distintiva historia de vida, comportamiento y ecología (Lourie *et al.*, 2004). Por lo tanto, el estudio y monitoreo de las poblaciones naturales de estas especies en nuestras costas se hace necesario, ya que en ellas se pueden encontrar un gran número de ambientes propicios para el desarrollo y asentamiento de poblaciones de *Hippocampus* como lagunas litorales, praderas de fanerógamas marinas y ecosistemas coralinos, en áreas someras del litoral costero, donde el creciente desarrollo de actividades antropogénicas actúa de manera intensa, ocasionando pérdida y fragmentación de estos hábitats y contaminación de los ambientes acuáticos (Kvarnemo *et al.*, 2000; Perante, *et al.*, 2002; Bell *et al.*, 2003; Lourie *et al.*, 2004; Portenaar *et al.*, 2004).

Al respecto, Kuitert (2001), ha señalado que los caballitos de mar podrían ser utilizados como indicadores de la salud de algunos ecosistemas marinos por ocupar hábitats muy específicos. Además, son importantes

como especies atractivas, alrededor de las cuales se pueden generar un amplio rango de actividades relativas a la conservación de la biodiversidad y los recursos marino costeros (Foster & Vincent, 2004).

Desde el punto de vista legislativo, el estado venezolano, como una de las partes firmantes del Convenio Internacional sobre Diversidad Biológica, debe promover y fomentar la investigación que contribuya a la conservación y a la utilización sostenible de la misma. Por otra parte, en el Plan de Acción de la Estrategia Nacional sobre Diversidad Biológica, en el numeral 1 se establece como lineamiento primordial la necesidad de “conocer, valorar y divulgar la Diversidad Biológica” y en su numeral 15 se define como línea estratégica para el desarrollo de programas de prioridad nacional: “promover el conocimiento, la conservación y el uso sustentable de la diversidad biológica marina, insular y costera (CDB, 1992; MARN, 2001).

No obstante, la literatura sobre diversidad biológica de la ictiofauna que albergan los ecosistemas marino costeros en Venezuela, es aún escasa y dispersa, sobre todo en lo concerniente al género *Hippocampus*, por lo que no se sabe con certeza los patrones de distribución y abundancia de sus especies en nuestro litoral continental e insular; y en el caso de la información existente, debe considerarse lo mencionado con respecto a las confusiones en la designación taxonómica de las mismas. De manera tal que, es imprescindible el levantamiento de información científica relevante basada en los caracteres convencionales y moleculares sobre la caracterización taxonómica de las especies, así como sobre diversos aspectos de su biología e historia poblacional, partición geográfica y la distribución de su diversidad genética, para determinar la situación actual de sus poblaciones, como una base para referencias futuras que permita el diseño y desarrollo de estrategias adecuadas para su preservación, así como para el manejo y utilización de los hábitats en los que se desarrollan.

## **1.2. Marcadores Moleculares y ADN Mitocondrial.**

El concepto de biodiversidad, proviene de la contracción de los términos “diversidad biológica” o “diversidad biótica” y es empleado comúnmente para caracterizar las variaciones de vida en las diferentes dimensiones o niveles de organización (genes, especies, poblaciones, comunidades, ecosistemas, paisajes o biomas) en que esta variación, diversidad o heterogeneidad puede ser observada (Harper & Hawksworth, 1994).

El estudio de la biodiversidad amerita la interacción con diferentes disciplinas del saber científico e incluye conceptos y técnicas de biogeografía, ecología, botánica, zoología, paleontología, taxonomía y sistemática, entre otros (Suñe, 2003). Debido a que la mayoría de las variaciones que se observan en los niveles superiores de organización biológica, tienen una relación directa con la información heredable, es posible la utilización de técnicas genéticas para investigar y cuantificar la biodiversidad.

El genoma de los seres vivos se distribuye en las células tanto en el núcleo, como en los organelos celulares (mitocondrias y cloroplastos) y dependiendo de cada tipo de ADN se reconocen diferentes tipos de herencia. La comprensión de estos diferentes modos de herencia es crucial para poder predecir como diferentes regiones del genoma pueden actuar en diversos escenarios ecológicos y evolutivos. Así, la descendencia de los organismos que se reproducen sexualmente hereda aproximadamente la mitad de su ADN nuclear de cada uno de sus progenitores, es decir su herencia es biparental. Mientras que en la mayoría de los casos, el material genético heredado de las mitocondrias y cloroplastos presenta un tipo de herencia uniparental. Esta predictibilidad sobre los modos de herencia del material genético es precisamente la razón por la cual los marcadores moleculares nos permiten inferir las relaciones y estimar las diferencias entre individuos, especies o poblaciones (Freeland, 2005).

Dependiendo de la pregunta biológica a la que se le pretenda dar respuesta, el nivel de precisión necesario y la disponibilidad financiera y operatividad práctica, puede utilizarse la información genética proveniente del genoma nuclear, los organelos celulares o ambas. Existiendo diferentes estrategias de análisis de la variación genética dependiendo del tipo de ADN seleccionado.

De esta manera, Suñe (2003), señala que las secuencias de ADN nuclear pueden ser evaluadas mediante técnicas de PCR, enzimas de restricción, secuenciamiento o una mezcla de algunas de ellas, encontrándose entre los marcadores más comúnmente empleados los micro satélites, los segmentos de ADN polimórfico amplificados al azar (RAPD), los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs), los polimorfismos de tamaño de fragmentos amplificados (AFLPs) y los polimorfismos de un único nucleótido (SNPs). Mientras que en el caso de las secuencias de ADN provenientes de los organelos celulares, se encuentran el ADN mitocondrial (ADNmt) para el estudio de animales y el de los cloroplastos (ADNcl) en el caso de las plantas. En ambos casos se pueden emplear tanto técnicas de RFLPs, como el secuenciamiento directo de regiones previamente amplificadas mediante la técnica de PCR.

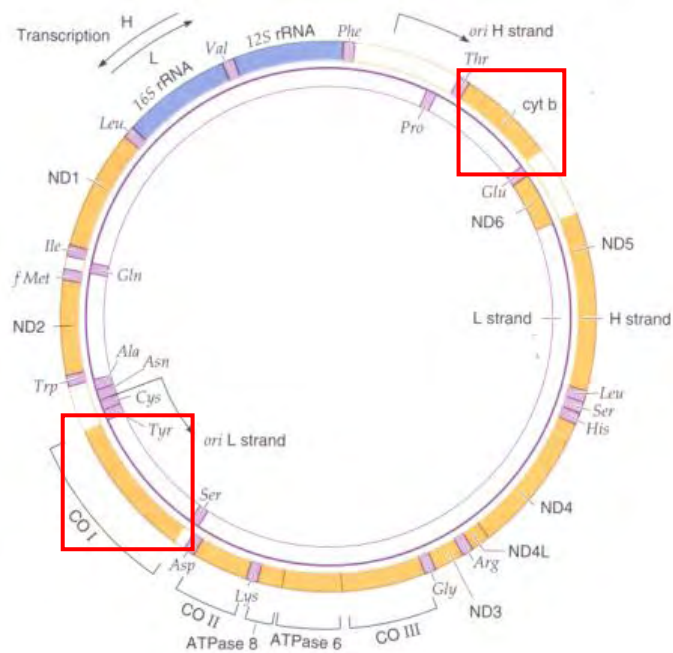
Aunque todos los marcadores moleculares cuantifican la variación en el ADN, la secuenciación es el único método que identifica exactamente las diferencias de pares de base entre individuos, característica de gran importancia, ya que la secuenciación del ADN, deja poco espacio para las ambigüedades, y mediante la comparación de dos o más secuencias podemos identificar exactamente dónde y cómo ellas son diferentes, permitiendo la inferencia de relaciones evolutivas (Freeland, 2005).

En el caso de los estudios realizados con animales, los marcadores moleculares del genoma del ADN mitocondrial han sido muy populares en los estudios taxonómicos, filogenéticos y de ecología poblacional, ya que estos presentan varios atributos útiles, que no se encuentran en el genoma

nuclear. Entre las características que favorecen al ADNmt como marcador molecular se han señalado: a) facilidad de extracción y aislamiento, toda vez que la molécula está presente en un alto número de copias por célula (500 a 1000 copias/célula); b) genoma compacto con estructura y organización simple; c) ausencia de intrones, pseudogenes y elementos transponibles; d) herencia predominantemente uniparental materna; e) ausencia de recombinación y f) rápida tasa de evolución (sustitución nucleotídica), la cual es 5 a 10 veces superior a la del ADN nuclear (Freeland, 2005), y por lo tanto en algunos casos, dependiendo del segmento utilizado, permiten observar altos niveles de polimorfismo que pueden revelar múltiples linajes dentro y entre poblaciones. Al respecto, Brown *et al.* (1979) y Harrison (1989) han señalado entre las razones que influyen en esta diferencia de las tasas de sustitución, la ineficiencia de los mecanismos de reparación para corregir las mutaciones que surgen durante la replicación, el relajamiento de la restricción de función y/o de la selección, así como la gran exposición del ADNmt a daños oxidativos.

Es importante señalar que aunque de manera general esas características favorecen la utilización del ADNmt en la mayoría de los estudios en los que se ha empleado, se han señalado algunas excepciones con respecto a algunos de estos aspectos (Kondo *et al.*, 1990; Gillensten *et al.*, 1991; Hoeh *et al.*, 1991; Zouros *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1996; Strauss, 1999).

El ADN mitocondrial está envuelto principalmente en la respiración celular, proceso mediante el cual la energía es extraída de los alimentos y consiste en una molécula circular pequeña, cerrada covalentemente, con tamaño variable, en general, de 14 a 26 kb (Billington & Hebert, 1991). Presenta un contenido génico muy conservado, representado por dos genes que codifican ARN ribosómico (ADNr 16S y 12S), 22 genes que codifican ARN transportadores (ARNt) y 13 genes que codifican las proteínas involucradas en el transporte de electrones y la síntesis de ATP (Figura 4).



**Figura 4.- Representación esquemática de la molécula de ADNmt, señalizando la ubicación de los genes Citocromo Oxidasa I (COI) y Citocromo B (CYT B).**

Además, la molécula de ADNmt posee una región de cerca de 1kb rica en secuencias AT, denominada región control, la cual a pesar de no ser una región codificante es importante, ya que contiene los promotores de transcripción de las cadenas liviana y pesada que conforman la molécula, así como el origen de replicación de la cadena pesada (Clayton, 1982). En vertebrados y equinodermos, la región control es también conocida como Asa D o D-loop (displacement loop), debido a la presencia de una tercera cadena simple de ADN (ADN 7S), que compite con la cadena pesada por el apareamiento con la cadena liviana de ADNmt, generando una estructura de triple hélice en ese segmento.

Aunque inicialmente la estructura y organización del genoma mitocondrial de los vertebrados parecía ser muy conservada, reorganizaciones envolviendo genes mitocondriales han sido posteriormente identificadas en varios linajes de vertebrados, incluyendo los peces (Miya &

Nishida, 1999), anfibios (Macey *et al.*, 1997), reptiles (Quinn & Mindell, 1996; Macey *et al.*, 1997), aves (Desjardins & Morais, 1990) y mamíferos marsupiales (Pääbo *et al.*, 1991; Janke *et al.*, 1994). Al respecto, Macey *et al.* (1998) y Miya & Nishida (1999) han propuesto que la mayoría de las reorganizaciones observados en el genoma mitocondrial de los vertebrados está asociado a errores en la replicación de la cadena liviana del ADNmt y a la duplicación secuencial de los ARN de transferencia, seguidos de delecciones, a veces incompletas, de genes redundantes.

En términos generales, la mayoría de los cambios genéticos observados en el ADNmt se deben a sustituciones de bases nucleotídicas, encontrándose que en los vertebrados las transiciones son más frecuentes que las transversiones; en algunos casos los cambios presentes incluyen pequeñas adiciones o delecciones de nucleótidos y en otros existen diferencias en el tamaño de la molécula de ADNmt (Awise *et al.*, 1987; Broughton & Dowling, 1994). Estas últimas, se encuentran generalmente restringidas a la región control, debido a la presencia en esa región de secuencias cortas de ADN repetidas en tándem (Clayton, 1982; Hoelzel, 1993).

No obstante, el pequeño tamaño del ADNmt, conjuntamente con la organización conservada de los genes en la mayoría de los casos, permite que muchos pares de *primers* universales puedan amplificar regiones del ADN mitocondrial en una amplia variedad de vertebrados e invertebrados, lo que significa que se puede obtener información genética de esta partición genómica, sin ningún conocimiento previo de la secuencia de ADNmt de una especie particular (Freeland, 2005). Lo cual ha producido un gran impacto en los estudios de problemas biológicos sobre evolución, especiación y genética poblacional mediante el empleo de datos moleculares, evidenciándose en el creciente número de publicaciones científicas de alto impacto en donde son utilizadas (Vázquez, 2007).

Entre las posibles aplicaciones en las que el ADNmt ha proporcionado



marcadores moleculares útiles para análisis de la variación genética, a nivel intra e interespecífico, se incluyen la estimación del grado de variabilidad genética (Avice, 1986; Avice *et al.*, 1987; Moritz *et al.*, 1987); estimaciones de flujo génico (Brown & Chapman, 1991; Ong *et al.*, 1996; Sanetra & Crozier, 2003); la detección y análisis de zonas de contacto (Ferris & Berg, 1987; Szymura *et al.*, 1986); caracterización de la estructura poblacional (Graves, 1998; Stepien & Faber, 1998; Pestano & Brown, 1999) y estudios de biogeografía histórica (Bermingham & Avice, 1986; Sivasundar *et al.*, 2001; Beheregaray *et al.*, 2002). Además, recientemente se ha evidenciado su empleo creciente en el campo de la taxonomía y sistemática molecular, para inferencias de relaciones filogenéticas (Ortí *et al.*, 1996; Saitoh *et al.*, 2003; Thacker, 2003) y en estudios de conservación de especies vulnerables o en peligro de extinción (Beheregaray *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005).

En la actualidad ha sido propuesta la utilización de segmentos amplificados de 600 pb del gen mitocondrial COI como una herramienta molecular para la identificación taxonómica rápida, eficiente y económica que facilite la caracterización de toda la biodiversidad del planeta (Hebert *et al.*, 2003a, 2003b; Stoeckle, 2003) , proyecto conocido como “Código de barras de la vida” (Barcode of life; <http://www.barcodinglife.com>), el cual ha recibido un apoyo financiero inicial de 3 millones de dólares aproximadamente (Rubinoff, 2005). Sin embargo, todavía existen muchas controversias con respecto a la utilidad práctica real que este proyecto pueda tener para la identificación de todas las especies del planeta y su aplicabilidad en la preservación y conservación de la biodiversidad.

En función de la amplia variedad de marcadores moleculares disponibles, es necesario tener presente ciertas consideraciones al momento de seleccionar el marcador más apropiado. Diferentes genes, o partes de genes, pueden evolucionar a tasas diferentes, haciendo que el mismo marcador genético sea útil en un nivel particular de análisis e ineficiente en otro nivel diferente (Reed & Sperling, 1999; Rubinoff, 2005).

De esta manera, debido a que el ADNmt es haploide y de herencia materna presenta un tamaño efectivo poblacional que es equivalente a la cuarta parte del genoma nuclear y refleja tasas de sustitución relativamente rápidas (Moore, 1995), lo cual lo convierte en un marcador idóneo para la resolución de problemas a nivel de especie, particularmente cuando relaciones filogenéticas cercanas entre los taxos analizados han sido estimadas previamente mediante datos provenientes de otras fuentes (Rubinoff, 2005). Sin embargo, para el análisis de divergencias más ancestrales entre los taxos, la misma rapidez con la que ocurren las sustituciones de nucleótidos puede saturar los cambios entre los pares de base, causando homoplasias (similitud no a través de descendencia de un ancestro común), debido a la pérdida de señal filogenética (Reed & Sperling, 1999; McCracken & Sorenson, 2005).

Paralelamente, esta característica diferencia del tamaño efectivo poblacional del ADNmt con respecto al nuclear, lo hace particularmente sensible a eventos demográficos, tales como cuellos de botellas, los cuales ocurren cuando el tamaño de las poblaciones es temporalmente reducido, debido a eventos catastróficos, enfermedades o sobreexplotación, por lo que su utilización para estudios poblacionales puede hacer una importante contribución a la comprensión de la estructura genética actual de las poblaciones naturales (Freeland, 2005).

Adicionalmente, debido a que diferentes genes pueden reflejar historias evolutivas distintas, la utilización de múltiples genes y diferentes fuentes de información (datos morfológicos, estudios ecológicos, etc.) es necesaria para muchos estudios intra e interespecíficos, con la finalidad de proveer una perspectiva más sólida sobre la historia evolutiva de un organismo, así como de las relaciones sistemáticas y taxonómicas que se deseen proponer (Funk & Omland, 2003).

### **1.3. Estructura Poblacional y Variabilidad Genética.**

Las investigaciones sobre la estructura genética de las poblaciones son un prerrequisito para la comprensión de la evolución de las especies, porque puede ayudar en la evaluación de la extensión en la cual distintas poblaciones se han embarcado en trayectorias evolutivas separadas o si permanecen conectadas mediante flujo genético (Duminil *et al.*, 2007).

Como consecuencia, la estructura genético poblacional y sus posibles causas ha sido investigada en miles de estudios, que involucran casi cualquier tipo de organismo, evidenciándose que, tanto la historia poblacional, como las características especie específicas han sido consideradas como moldeadoras de la estructura genética.

Por otra parte, está ahora muy bien documentado que las variaciones climáticas del pasado han afectado fuertemente los patrones de distribución geográfica de los linajes genéticos (Hewitt, 2000; Petit *et al.*, 2003) y que de igual manera, la estructura genética puede también estar influenciada por características particulares de la historia de vida, patrones de distribución y otras características ecológicas de las especies, que están más o menos directamente relacionadas a la dispersión de genes (Duminil *et al.*, 2007).

La conservación de la diversidad genética ha sido uno de los objetivos básicos para la elaboración de programas de control y conservación de especies sometidas a intensa explotación, amenazadas o en peligro de extinción (Lacy & Lindenmayer, 1995), de manera que la identificación y mantenimiento de poblaciones genéticamente diferenciadas es fundamental para la utilización sustentable de los recursos naturales (Carvalho & Hauser, 1994). Siendo esto particularmente importante en los ambientes marinos donde se ha señalado una tendencia a la homogenización genética, ya que las barreras físicas parecen ser menos efectivas (Ward *et al.*, 1995; Levy & Cassano, 1994; Bonhomme *et al.*, 2002)

Sobre este aspecto, Smith *et al.* (1990) y Kuusipalo, (1999), han señalado que este punto de vista sobre la homogeneidad genética de las poblaciones marinas, no generalizable para todos los organismos y especies, puede actuar negativamente sobre estas poblaciones, estimulando la explotación irracional de los recursos y reduciendo los niveles de variabilidad genética necesarios para el mantenimiento de las mismas.

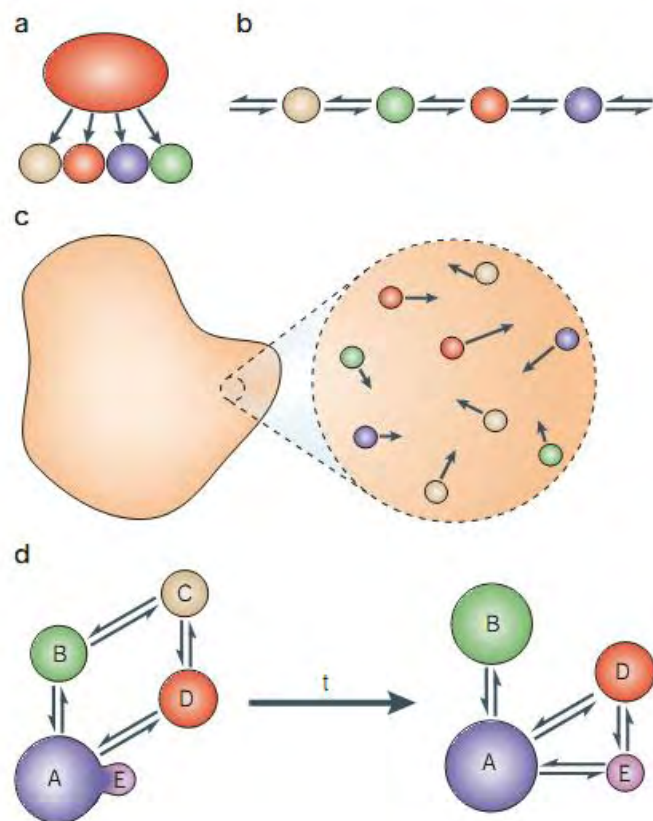
Entre los factores que intervienen en el mantenimiento de la variabilidad y diferenciación genética de las poblaciones se han señalado: a) la selección natural, que puede favorecer a genotipos o alelos diferentes en cada subpoblación; b) la deriva genética, que consiste en los procesos aleatorios que intervienen en la transmisión de alelos en cada generación, c) las diferencias al azar que pueden existir en las frecuencias alélicas de los fundadores de las subpoblaciones y d) el flujo génico entre las mismas.

En presencia de un flujo génico intenso, las poblaciones tienden a evolucionar conjuntamente, una vez que la migración actúa en la homogenización de las frecuencias alélicas. Por otra parte, cuando el flujo genético está restringido o ausente, cada población tiende a evolucionar de manera independiente. El grado y dirección del flujo génico entre poblaciones separadas puede actuar como una poderosa fuerza, en la manutención u homogenización de las diferencias genéticas (Slatkin, 1987), y puede ejercer una influencia importante en la caracterización de la estructura poblacional, pues determina hasta que punto cada población local puede ser considerada como una unidad evolutiva independiente (Slatkin, 1993). Sin embargo, aunque el flujo genético tienda a actuar generalmente como una fuerza homogeneizadora, este también puede intervenir llevando a la divergencia entre subpoblaciones, a través de la creación y dispersión de combinaciones únicas de alelos (Slatkin, 1987; Coltman, 2005), operando así como una fuerza creadora.

Según Avise (1994), el grado de flujo genético y la estructura genética de las poblaciones puede ser determinado, además de por la movilidad de los

organismos, por la presencia de barreras físicas o ecológicas, las características conductuales como la filopatría, la historia de vida de los organismos, los patrones de dispersión y flujo génico ligado al sexo, la influencia diferencial de la selección natural en locus nucleares y mitocondriales, y eventos demográficos que rompen el equilibrio entre el flujo génico, la deriva genética y la distancia geográfica entre las poblaciones.

Hasta la fecha han sido propuestos varios modelos para describir la estructura de poblaciones subdivididas, con base en los patrones de migración, entre los que se señalan principalmente: a) el modelo de islas, en el cual la diferenciación entre las poblaciones es independiente de la distancia que existe entre ellas, siendo los nuevos reclutas originarios de una única población de tamaño infinito o de otras islas, sin relación con su posición geográfica espacial (Slatkin, 1985), b) el modelo paso a paso (Stepping Stone), que señala que el intercambio de migrantes ocurre entre las poblaciones inmediatamente vecinas o adyacentes (Wright, 1978). Kimura & Weiss (1964), han señalado que este es el más adecuado para describir la estructura poblacional de especies que presentan dispersión geográfica limitada; c) el modelo de aislamiento por distancia, en el cual el factor principal para la diferenciación es la limitación de la dispersión en función de la distancia geográfica, dentro de una población sin subdivisiones aparentes. De manera que en las poblaciones de distribución continua, se puede detectar un patrón de aislamiento, en el que el flujo genético entre las subpoblaciones disminuye a medida que la distancia genética entre ellas aumenta (Wright, 1978); d) el modelo de meta poblaciones, que señala que en la naturaleza no solo los individuos se mueven entre las poblaciones, sino que las poblaciones individuales aparecen y desaparecen en el tiempo, siendo los eventos de fundación y extinción de poblaciones enteras un importante componente de la estructura poblacional de un área determinada (Figura 5). Finalmente, la ausencia total de flujo génico entre poblaciones evidenciaría un modelo de aislamiento completo, que puede llevar a la especiación.



**Figura 5.- Modelos de Estructura Poblacional: a) Modelo de Islas, b) Modelo Paso a Paso (Stepping Stone), c) Modelo de Aislamiento por Distancia y d) Modelo de Meta poblaciones.**

Por otra parte, Hartl & Clark (1997), han señalado que con frecuencia la estructura genética de las poblaciones se corresponde con una organización jerárquica, en la cual los organismos pueden ser agrupados en diferentes niveles que son progresivamente inclusivos (individuos, subpoblaciones, población total), por lo que la variabilidad genética total de una determinada especie puede distribuirse diferencialmente en cada uno de estos diferentes niveles jerárquicos.

Para estudiar la organización jerárquica de la variabilidad genética, Wright (1951), desarrollo el estadístico F (Índice de Fijación), el cual indica la proporción de variabilidad genética encontrada entre las subpoblaciones y cuantifica el efecto de la reducción de la heterocigosidad, causado por el

endocruzamiento o subdivisión poblacional, en cada nivel de jerarquía con relación a un nivel jerárquico más inclusivo. De esta manera, el estadístico  $F$ , es un estadístico descriptivo de la estructura poblacional y está compuesto por tres coeficientes ( $F_{IS}$ ,  $F_{IT}$  y  $F_{ST}$ ). Entre estos coeficientes, se considera al índice  $F_{ST}$  como el más informativo para examinar niveles de divergencia entre poblaciones. Este índice ( $F_{ST}$ ), mide la cantidad de variación genética de una población que es atribuida a diferenciación genética entre subpoblaciones, facilitando un estimado acerca del grado de divergencia genética entre dos subpoblaciones.

Además, el índice  $F_{ST}$  también puede ser utilizado para realizar estimaciones acerca del grado de flujo génico. Wright (1951), demostró que existe una relación no lineal entre la cantidad de flujo génico y el grado de diferenciación genética entre dos subpoblaciones. Asumiendo el modelo de estructura poblacional de islas y considerando la existencia de equilibrio entre el flujo génico y la deriva genética para alelos selectivamente neutros, este investigador demostró que la diferenciación genética entre subpoblaciones, está relacionada con el tamaño poblacional efectivo ( $N_e$ ) y la tasa de migración ( $m$ ), siendo  $F_{ST} = 1/(4N_e m + 1)$ , donde  $N_e m$  representa el número efectivo de migrantes por generación (para locus nucleares), mientras que para datos obtenidos mediante marcadores de ADN mitocondrial,  $F_{ST} = 1/(2N_e m + 1)$ , donde  $N_e m$  representa el número de hembras migrantes por generación. Por lo tanto, a medida que el número de migrantes disminuye los valores de  $F_{ST}$  aumentan y mayor es el grado de estructuración genética de las poblaciones.

Sin embargo, se debe tener en consideración, que la inferencia indirecta a partir de  $F_{ST}$  de los valores cuantitativos de flujo génico tiene ciertas limitaciones. Whitlock & McCauley (1999), realizan importantes observaciones al respecto, con base en los supuestos en los cuales se sustenta el modelo originalmente propuesto por Wright.

Aunque el estadístico  $F$  introducido por Wright, fue creado como un

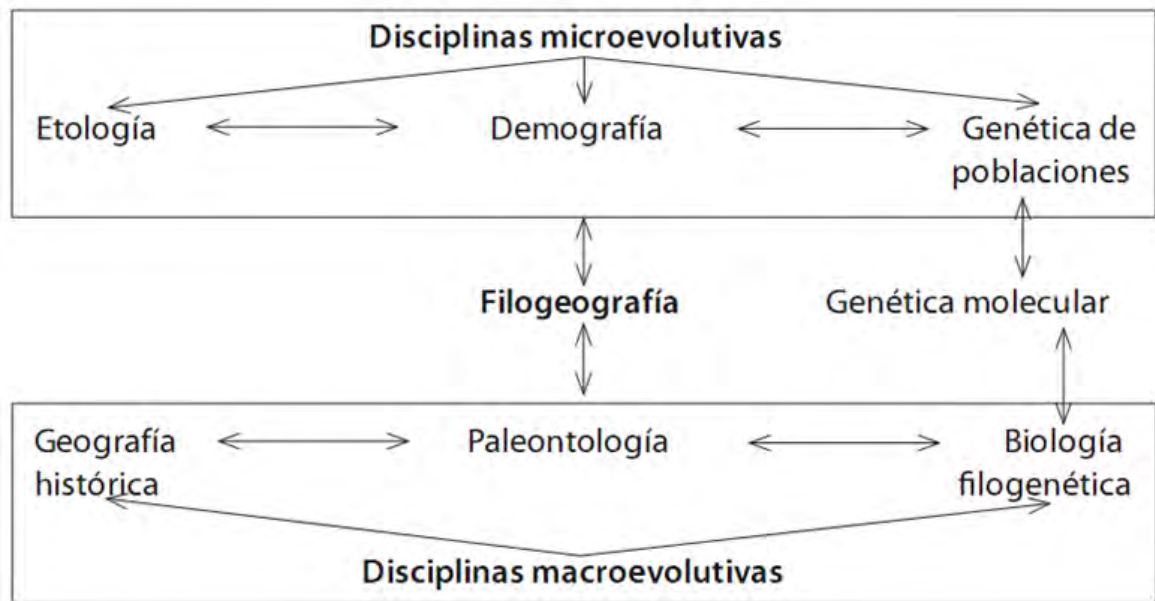
modo de utilizar las frecuencias alélicas reunidas en diferentes localidades geográficas, para cuantificar la subdivisión poblacional y cuantificar el flujo génico, la actual posibilidad de secuenciar las bases nucleotídicas de segmentos de ADN, hace posible estimar las relaciones evolutivas entre esos alelos en la forma de árboles de alelos o haplotipos, e introducir otra dimensión más, como lo es el tiempo evolutivo, ayudando en la interpretación de la distribución geográfica de la variación alélicas actual y permitiendo la separación de los eventos históricos de aquellos a nivel de la estructura poblacional (Hudson *et al.*, 1992; Templeton *et al.*, 1995; Templeton, 2004).

Los métodos moleculares actuales permiten no solo la estimación de las frecuencias alélicas, sino también las relaciones genealógicas entre alelos, con lo cual es posible considerar el flujo génico histórico y la fragmentación de poblaciones en un marco conceptual más evolutivo y geográfico, ya que se pueden comparar las relaciones evolutivas de los linajes genéticos con su ubicación geográfica (Freeland, 2005).

Las observaciones de que los haplotipos de ADN mitocondrial de poblaciones de muchas especies están localizados geográficamente, introdujo una dimensión filogenética en las discusiones sobre la estructura de las poblaciones, llevando al surgimiento de una nueva rama de la ciencia conocida como “Filogeografía”, esta disciplina estudia los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de los linajes genealógicos (Avice *et al.*, 1987) e interacciona con disciplinas científicas de enfoque micro y macro evolutivo (Figura 6).

De ese modo, con base en la distribución geográfica de los haplotipos de ADN mitocondrial y el grado de divergencia de secuencias entre ellos, Avice (2000), propone y discute categorías filogeográficas que pueden categorizar áreas de ocupación, distribución de poblaciones, existencia de barreras al flujo génico o extinción de genotipos intermediarios, ocurrencia de zonas híbridas, tasas de migración e inferencias cladísticas.





**Figura 6.- Representación esquemática de las relaciones de la Filogeografía con otras disciplinas científicas.**

Dado que la mayoría de las mutaciones ocurren en un único punto en el tiempo y el espacio, es posible hacer inferencia de eventos pasados, la propagación de cada nueva mutación (alelo u haplotipo) es afectada por patrones de dispersión, tamaño poblacional, selección natural y otros procesos que pueden deducirse a partir de la distribución actual de dichas mutaciones (Freeland, 2005). En poblaciones de tamaño constante, y bajo las premisas de evolución neutral, a través de las generaciones surgen de manera continua nuevos alelos por mutación y se pierden otros por deriva génica, de tal forma que todos los alelos de un gen en una generación derivan de o coalescen hacia un único alelo ancestral (Vázquez *et al.*, 2009). Esta característica, ha permitido el desarrollo de la teoría de la coalescencia, la cual se ha convertido en una importante y eficaz forma de evaluar los procesos de ramificación de árboles genealógicos (Hudson, 1990, 1998; Nordborg, 2000).

La determinación del tiempo transcurrido hasta el ancestro común más reciente dependerá de múltiples factores, pero principalmente del

tamaño efectivo de la población ( $N_e$ ), debido a que la relación entre el tiempo de coalescencia y el tamaño poblacional es directa, porque la probabilidad de que un par de secuencias coalescan en un punto –histórico– está en función del tamaño de la población y mientras más pequeño sea este, más rápidamente coalescerán (Vázquez *et al.*, 2009). De esta manera, el tiempo de coalescencia promedio de todos los haplotipos en una población es  $4N_e$  y  $N_e$ , para genes diploides y mitocondriales respectivamente. Por lo tanto, si consideramos que en las poblaciones naturales los factores demográficos, tales como la tasa de fecundidad, natalidad, mortalidad natural, etc., determinan los tamaños poblacionales, se entiende porque existe una intrincada relación entre demografía y filogenia de genes; de tal manera que las variables demográficas son factores decisivos que gobiernan la profundidad, la forma y los patrones demográficos de los árboles de genes (Vázquez *et al.*, 2009; Domínguez & Vázquez, 2009).

El análisis filogeográfico parte en su nivel más fino tal vez, de que tan estructuradas (diferenciadas) están las poblaciones; sin embargo, este enfoque tiene que analizar información tanto espacial, como temporal en las escalas históricas (evolutivas) y ecológicas. Por lo tanto, en Filogeografía es necesario primero establecer las relaciones genealógicas entre haplotipos y posteriormente identificar cuales factores históricos y geográficos pudieron haber influido o determinado la distribución actual de los haplotipos. Para ello, se emplean tanto métodos gráficos basados en árboles de genes o en coalescencia, así como métodos con base en parámetros demográficos y estadísticos de resumen (Emerson *et al.*, 2001; Posada & Crandall, 2001; Knowles & Maddison, 2002; Hey & Machado, 2003).

En particular, los modelos de genética de poblaciones basados en la teoría de coalescencia proveen un marco conceptual estadístico para el análisis de la información filogeográfica, lo que ha llevado a compilar dicha información metodológica bajo el concepto de estadística filogeográfica (Knowles & Madisson, 2002).

Bajo esta óptica, las unidades operativas taxonómicas del árbol filogenético, son los haplotipos, y se obtiene un árbol de genes que se define como un diagrama ramificado que describe el patrón de ancestría entre secuencias homólogas de ADN de diferentes individuos de una población o una especie (Hey & Machado, 2003).

Las variantes o haplotipos del ADNmt registran la historia matrilineal de eventos mutacionales y pueden conectarse filogenéticamente en un filograma, el cual puede a su vez sobreponerse a la distribución geográfica del grupo de estudio, a fin de tener una primera - y meramente gráfica - aproximación a los procesos evolutivos responsables de la distribución actual de la especie o grupo de especies (Avice, 2000).

A través de estos análisis es posible determinar filogrupos diferentes; si existe concordancia entre la distribución geográfica de los haplotipos y los haplogrupos reflejados en la filogenia, dicha información sirve de apoyo o como base de otros análisis que evalúen directamente concordancia, como el análisis de clados anidados. Estos métodos permiten describir las relaciones evolutivas en la forma de árboles multifurcantes, en los cuales un único haplotipo puede dar origen a muchos haplotipos, creando lo que se conoce como una red de haplotipos, particularmente redes mínimas de haplotipos (conexiones entre haplotipos dadas por el número mínimo posible de mutaciones entre ellos). Dado que se trabaja con filogenias de haplotipos a nivel intraespecífico, pueden tener muy poca variación e implican un tiempo evolutivo mucho menor, por lo que Templeton *et al.* (1992), propusieron un método que toma en cuenta estas características denominado parsimonia estadística y posteriormente, Clement *et al.* (2000) desarrollaron el programa TCS (Estimación filogenética de redes usando parsimonia estadística) que permite estimar redes de haplotipos a partir de secuencias de ADN o de matrices de distancias nucleotídicas utilizando el algoritmo propuesto por Templeton *et al.* (1992). Este algoritmo estima el número máximo de diferencias de pares de secuencias que pueden atribuirse a una serie de mutaciones únicas en cada sitio de la secuencia; número al que se conoce

como límite de parsimonia a un nivel de confianza del 95%. Una vez que se estima el límite de parsimonia, el algoritmo conecta los haplotipos que difieren por una sola mutación, dos mutaciones y así sucesivamente hasta que se alcance el límite de confianza o se conecten todos los haplotipos. El resultado final es una red que muestra las relaciones entre todos los haplotipos con base en el número mínimo de mutaciones.

Las conexiones entre los haplotipos representan eventos coalescentes por lo que pueden hacerse, a partir de la red de parsimonia y con base en los principios de coalescencia, las siguientes predicciones: a) los haplotipos con mayor frecuencia tienen alta probabilidad de ser alelos ancestrales, b) los haplotipos que tienen múltiples conexiones muy probablemente son ancestrales, c) dentro de la red, los haplotipos ancestrales son interiores y los haplotipos nuevos tienen mayor probabilidad de ser periféricos, d) se espera que los haplotipos ancestrales tengan una amplia distribución geográfica por que los individuos que tienen esos haplotipos han tenido mucho tiempo para dispersarse y e) los haplotipos con una única conexión se prevé estén unidos a haplotipos de la misma población (dado que han evolucionado recientemente y por lo tanto sin tiempo para dispersarse) (Vázquez *et al.*, 2009).

Paralelamente al surgimiento de los análisis intraespecíficos basados en la utilización de redes de haplotipos, se ha hecho muy común la implementación del análisis de clados anidados (NCA), debido fundamentalmente a que permite hacer un análisis estadístico objetivo, con el que se puede evaluar la hipótesis nula de que los haplotipos de los clados se distribuyen geográficamente al azar, es decir no existe asociación entre la variación haplotípica y la geografía, permite detectar y probar estadísticamente los mecanismos evolutivos responsables de la distribución espacial de los patrones de variación genética observada y permite interpretar los patrones significativos utilizando criterios explícitos, con los que es posible evaluar si el muestreo es adecuado para detectar una asociación significativa entre los clados y la geografía y si es adecuado para

interpretar biológicamente dicha asociación (Templeton *et al*, 1995; Templeton, 2004).

Sin embargo, se debe tener en cuenta que el NCA tiene ciertas limitaciones entre las que se mencionan: a) su sensibilidad a la resolución genética para poder detectar los procesos históricos, b) la necesidad de tener una representación adecuada de individuos dentro de cada población, así como de las localidades de muestreo dentro del rango de distribución de la especie y c) el hecho de que la clave de inferencia solo provee respuestas de sí y no, sin considerar límites de confianza (Knowles & Madison, 2002; Templeton, 2004).

A pesar de su amplia utilización, existe una gran controversia en cuanto a esta metodología, respecto a la confiabilidad de sus resultados porque con datos simulados se ha señalado la ocurrencia de un alto porcentaje de falsos positivos y de falsos negativos. No obstante, Templeton (2008), ha demostrado que dichos porcentajes son mucho menores cuando se evalúan casos reales, habiendo validado el método con una enorme base de datos de controles positivos. Sin embargo, para lidiar con las limitaciones señaladas anteriormente se ha hecho cotidiano el uso de diferentes análisis en un mismo estudio y se han desarrollado otros métodos directamente enfocados a descifrar la historia demográfica de las poblaciones con base en las matemáticas y la teoría de coalescencia, como la “distribución mismatch” que es un procedimiento basado en las distancias genéticas (Rogers & Harpending, 1992) en el que se evalúa si la distribución del número de sitios polimórficos o el número de diferencias pareadas entre las secuencias de la población en estudio, son estadísticamente diferentes de las esperadas bajo la hipótesis de crecimiento poblacional y/o la utilización de los estadísticos de resumen, que permiten estimar si pudo haber cambios en el tamaño poblacional histórico, evaluando si los datos empíricos se ajustan a un modelo de tamaño poblacional constante. Entre los estadísticos más comúnmente utilizados se destacan las pruebas de neutralidad de la  $F^*$  y la  $D^*$  de Fu & Li (1993) y la  $D$  de Tajima (Tajima, 1983).

## 2. OBJETIVOS

El presente trabajo se inserta en una línea de investigación general sobre diversos aspectos biológicos, ecológicos y evolutivos de las especies del género *Hippocampus* desarrollada conjuntamente entre el Laboratorio de Biología y Genética de Peces del Instituto de Biociencias de la Universidad Estadual Paulista y el Laboratorio de Ictiología de la Escuela de Ciencias Aplicadas del Mar de la Universidad de Oriente, cuyo objetivo principal es ampliar los conocimientos existentes de las especies del género *Hippocampus* que habitan nuestras costas, con miras a proponer medidas de conservación que contribuyan a la preservación de sus especies y los ecosistemas en las cuales habitan, mediante los siguientes objetivos específicos:

- Realizar una caracterización taxonómica de las especies del género *Hippocampus* de la región de estudio, con base en el análisis de las características merísticas, morfométricas y morfológicas de ejemplares colectados y/o depositados en los museos y colecciones científicas regionales, nacionales e internacionales.
- Evaluar la utilidad de los genes mitocondriales Citocromo B y Citocromo Oxidasa I como marcadores moleculares para la identificación de las especies.
- Comparar la diversidad genética de las poblaciones de *Hippocampus reidi*, con base en la información obtenida de secuencias del gen Citocromo B del ADN mitocondrial, para determinar la estructura geográfica y proponer una hipótesis filogeográfica que establezca las relaciones entre las poblaciones en estudio.
- Proponer, con base en los resultados obtenidos y la legislación existente, medidas para una mejor conservación de las especies del género *Hippocampus* en Venezuela.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Ubicación de las Localidades de Procedencia de las Muestras.

Las localidades de muestreo estuvieron ubicadas principalmente en las lagunas litorales de la Restinga (LR; n=38) y las Marites (LM; n=36), en la Isla de Margarita, región insular; en el Golfo de Cariaco (GC; n=19), región continental del oriente de Venezuela y de la desembocadura del Rio Potenguí, ubicado específicamente en la localidad de Natal, Brasil (NA; n=31). Adicionalmente, se logró obtener muestras provenientes de la Isla de Coche (CO; n=2) y la Laguna de Chacopata (CH; n=1), también en la región nororiental y el Golfo de Venezuela (GVZ; n=2)), en la porción continental del occidente de Venezuela (Figura 7).



**Figura 7.- Ubicación geográfica de las localidades de procedencia de las muestras de *Hippocampus sp.***

### **3.2. Colecta de las Muestras de Tejido.**

Los ejemplares utilizados para la realización de los análisis morfométricos, merísticos, filogenéticos y filogeográficos de *Hippocampus reidi* e *Hippocampus erectus* fueron obtenidos principalmente a partir de ejemplares capturados accidentalmente por la pesquería artesanal de subsistencia, realizada en los ambientes marino costeros del nororiente del país y/o mediante la búsqueda activa de los mismos en el campo, a través de la implementación de censos visuales para el monitoreo poblacional de las especies del género *Hippocampus*, que se están desarrollando en el Laboratorio de Ictiología de la Escuela de Ciencias Aplicadas del Mar.

Las muestras de tejido fueron obtenidas de diversas fuentes: a) cuando se tuvo acceso a los ejemplares muertos provenientes las capturas accidentales de la pesquería artesanal con fines de subsistencia, se procedió a extraer un pedazo de musculo con piel del lado derecho de los ejemplares y b) durante la realización de los censos de monitoreo poblacional de las especies del género *Hippocampus* en las lagunas litorales del nororiente del país, mediante métodos no destructivos consistentes en la obtención de pequeños “clips” (1 mm<sup>2</sup>) del borde marginal inferior de la aleta dorsal. Este último método ha sido utilizado previamente para la obtención de tejido de caballitos de mar por Kvarnemo *et al.* (2000) y Teske *et al.* (2003), quienes señalan que no causa daños posteriores a los ejemplares cuando son liberados. El tejido colectado fue colocado en tubos eppendorff contenientes de etanol al 95 % y almacenado en el congelador hasta su utilización.

### **3.3. Identificación taxonómica de las especies del género *Hippocampus*.**

La identificación taxonómica de los ejemplares fue realizada bajo dos escenarios diferentes, en función de las situaciones en las que se realizó la colecta de los tejidos:

**3.3.1. En el laboratorio:** cuando se tuvo acceso a ejemplares

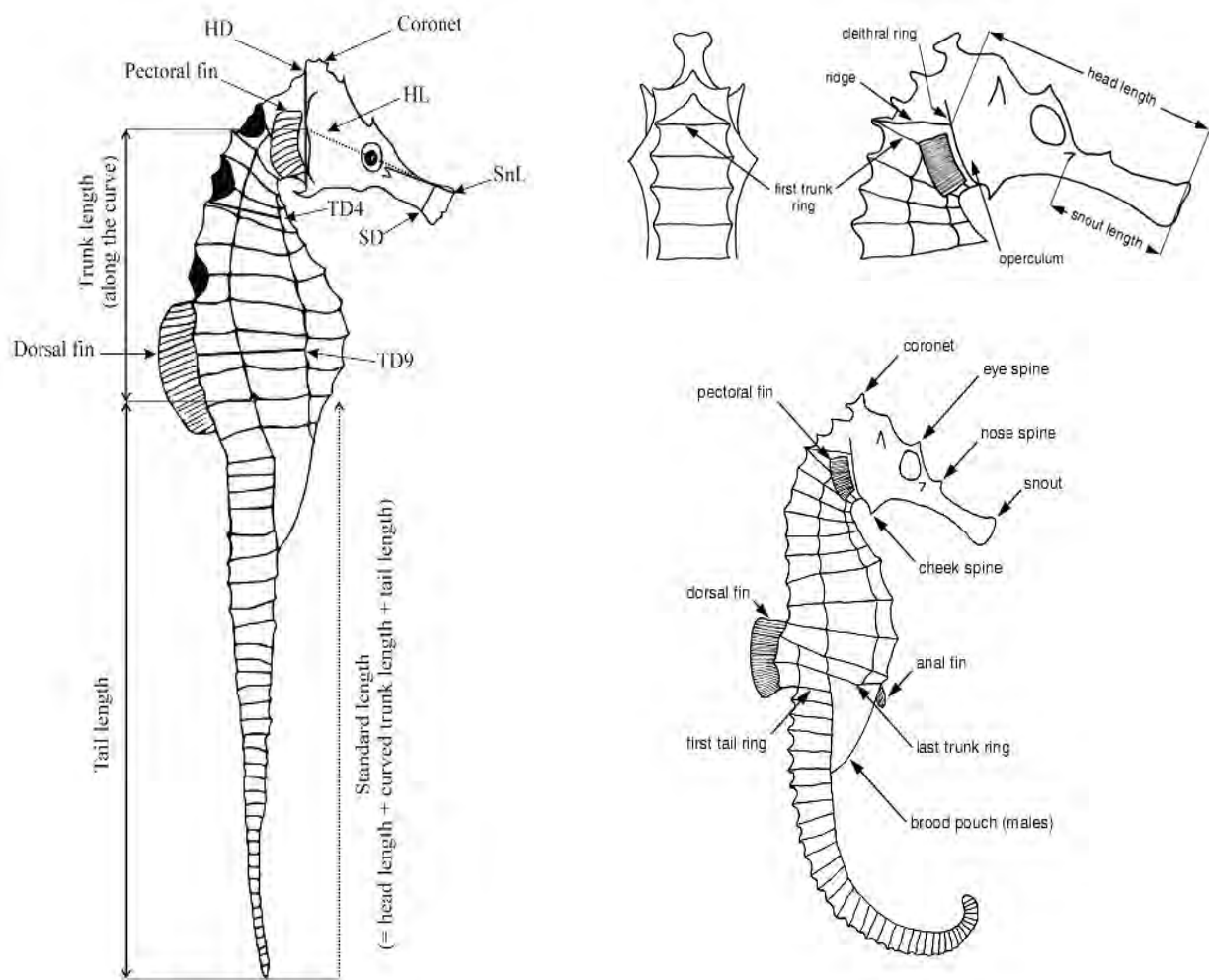


provenientes de las capturas accidentales de la pesquería artesanal con fines de subsistencia, éstos fueron trasladados al Laboratorio de Ictiología de la Escuela de Ciencias Aplicadas del Mar de la Universidad de Oriente, donde fueron identificados utilizando los criterios sugeridos por Vari, 1982, Cervigón, 1991, Lourie *et al.*, 1999, Fritzsche, 2002 y Lourie *et al.*, 2004, mediante la cuantificación y determinación de los siguientes caracteres:

**Características Merísticas:** éstas estuvieron conformadas por las variables morfológicas contables a simple vista o con la ayuda de un microscopio estereoscópico y que presentan relevancia en las claves dicotómicas empleadas para la identificación de las especies del género, tales como: a) el Número de anillos del tronco (TrR), b) Número de anillos de la cola (TaR), c) Número de anillos del tronco y/o cola sobre los que se encuentra ubicada la aleta dorsal (RUDF), d) Número de radios de la aleta dorsal (DFr), e) Número de radios de la aleta pectoral (PFr), f) Número de radios de la aleta anal (AFr), g) Número de espinas oculares (ES), y h) Número de espinas de la mejilla (CS) (Figura 8).

La información obtenida de estos caracteres fue organizada en tablas para cada especie con los estadísticos descriptivos generales (Mínimo, Máximo y Moda).

**Características Morfométricas:** consistieron en un conjunto de mediciones de distancias corporales que presentan relevancia en las claves dicotómicas empleadas para la identificación de las especies del género *Hippocampus* (Figura 8). Para su determinación se tomaron fotografías sobre el lado izquierdo de los ejemplares mediante la utilización de una cámara digital Nikkon, Modelo Coolpix L10 sobre una superficie rotulada que permitió su utilización como escala. Las imágenes fueron procesadas mediante la utilización de los programas TPSUtil (Rolhf, 2004a) y TPSDig2 v2.11 (Rolhf, 2004b), con los que se procedió a la ubicación de los hitos homólogos o landmarks y a la medición de las distancias entre los mismos, las cuales fueron expresadas en milímetros.



**Figura 8.- Morfología externa y variables merísticas y morfométricas utilizadas para la identificación de las especies del genero *Hippocampus*** (Tomado de Bijukumar *et al.*, 2008; Lourie *et al.*, 2004.)

Las variables morfométricas utilizadas para los análisis fueron las siguientes: a) Longitud Estándar (SL), considerada como la sumatoria de la Longitud de la Cabeza, la Longitud del Tronco y la Longitud de la Cola; b) Longitud del Tronco (TrL), distancia siguiendo la línea externa dorsal desde el primer anillo hasta el onceavo anillo; c) Longitud de la Cola (TaL), consiste en la distancia determinada a lo largo de la línea externa dorsal desde el

onceavo anillo hasta el extremo de la cola; d) Longitud de la Cabeza (HL), considerada desde el extremo del hocico hasta el punto medio del anillo cleitral, este punto es visible como el punto donde el anillo cleitral intercepta la cresta que surge lateralmente desde la primera espina dorsal; e) Longitud del Rostro (SnL), es la distancia entre la protuberancia inmediatamente delante de los ojos hasta el extremo de la boca; f) Altura de la Coroneta (CH), medida desde la base de la coroneta hasta el extremo de la espina más alta de la misma; g) Altura de la Cabeza (HD), distancia desde la base de la coroneta hasta la base de la espina de la quijada; h) Altura del hocico (SnD), determinada entre el extremo superior e inferior del hocico en la porción inmediatamente posterior a la articulación del maxilar; i) Ancho del Tronco entre el 4° y el 5° anillo (TD4), que es la distancia tomada en el punto medio entre los anillos 4° y 5° desde el extremo de la cresta lateral dorsal hasta la cresta lateral ventral; j) Ancho del Tronco entre el 9° y el 10° anillo (TW9), tomada en el punto medio entre los anillos 9° y 10° desde el extremo de la cresta lateral dorsal hasta la cresta lateral ventral; y k) Longitud de la base de la pectoral (PL), que es la distancia desde la inserción del primer radio de la pectoral hasta el punto de inserción del último.

Al igual que con la información de los datos merísticos, la información proveniente de estos datos fue organizada en tablas para cada especie con los estadísticos descriptivos generales (Mínimo, Máximo, Promedio y Desviación estándar).

Con la finalidad de tener un punto de comparación para el análisis de la diferenciación merística y morfométrica de las especies que habitan la región nororiental de Venezuela, se incorporó en los análisis información morfométrica de algunos ejemplares depositados en el Museo Nacional de Historia Natural del Instituto Smithsonian de Washington: *Hippocampus reidi* USNM 86590 **Holotipo**, USNM 223673 **Paratipo**, USNM 360235, USNM 223638, USNM 131966, USNM 170352; *Hippocampus erectus* USNM 45103, USNM 383949, USNM 045104, USNM 081727, USNM 13110, USNM 94091, USNM 92735 y USNM 223096 (Figuras 9 y 10).



USNM 86590



USNM 223673

**Figura 9.- Fotografías de los ejemplares tipo de *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933, depositados en el Museo Nacional de Historia Natural de Washington, U.S.A. (USNM).**



USNM 45103



USNM 92735



USNM 383949



USNM 45104



USNM 81727



USNM 13110



USNM 223096



USNM 94091

**Figura 10.- Fotografías de ejemplares de *Hippocampus erectus* Perry 1810, depositados en el Museo Nacional de Historia Natural de Washington, U.S.A. (USNM).**

**3.3.2. En el campo:** cuando la colecta de tejidos se realizó en el campo, debido a que la determinación de muchas características merísticas y morfométricas se solapan entre las especies reseñadas para la región y a la complejidad de su obtención, ya que se requiere de la manipulación excesiva de los ejemplares fuera del agua para su determinación, propiciando la posibilidad de ocasionar maltrato innecesario a los ejemplares, se empleó como criterio distintivo entre las especies: a) la posición y número de anillos prominentes dorsalmente, siendo señalado el 1°, 3° 5° y 7° para *H. erectus* y el 1°, 4°, 7° y 11° para *H. reidi* y las demás especies del Océano Atlántico (Lourie *et al.*, 1999; 2004); b) el ancho del cuerpo a nivel del tórax y d) los patrones de pigmentación del rostro y el cuerpo de los ejemplares.

### **3.4. Extracción de ADN.**

Para la extracción del ADN genómico se utilizó el kit de extracción de ADN proveniente de tejido, elaborado por AquaPure Genomic *BIO-RAD* (Número de catálogo 732-6343), mediante el siguiente protocolo:

#### **3.4.1. Lisis Celular:**

- Un pequeño pedazo de 5 a 10 mg (0,005 – 0,010 g) del tejido previamente fijado en etanol, fue colocado en un eppendorff de 1,5 ml donde fue cortado en varios pedazos de menores dimensiones para facilitar la extracción del ADN.
- Se añadieron 300ul de solución de lisis de ADN genómico (Genomic DNA Lysis Solution) y el tejido fue macerado y homogenizado. Las muestras fueron mantenidas en hielo hasta el siguiente paso.
- La solución de lisis fue incubada a 65°C por 45 minutos, durante los cuales los tubos fueron invertidos periódicamente.
- Se añadió 3ul de solución de Proteinasa K (Proteinase K Solution) a una concentración de 20 mg por ml, a la solución de lisis. Mezclando mediante inversión de los tubos eppendorff (25 veces).

- Posteriormente los tubos fueron incubados a 55°C por 4 horas, hasta que se disolvieron todas las partículas de tejido. Los tubos fueron invertidos periódicamente durante la incubación.

#### **3.4.2. Tratamiento con RNAsa:**

- Terminado el periodo de incubación para la lisis celular, fueron añadidos 1,5ul de solución de RNAsa a una concentración de 4 mg por ml (RNase A Solution) a la solución de lisis celular.
- Los tubos fueron invertidos durante 25 veces para garantizar el buen mezclado de las soluciones en los eppendorff y se procedió a incubarlos a 65°C por 45 minutos.

#### **3.4.3. Precipitación de Proteínas:**

- Una vez terminado el tratamiento con la RNAsa, las muestras fueron enfriadas hasta temperatura ambiente.
- Seguidamente, fueron añadidos 100ul de tampón de precipitación de proteínas (Protein Precipitation Buffer) a la solución de lisis celular.
- Los tubos eppendorff fueron agitados en vórtex vigorosamente por 20 segundos.
- Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 13.000 – 16.000 g por 3 minutos.

#### **3.4.4. Precipitación del DNA:**

- Una vez precipitadas las proteínas, el sobrenadante (300ul) conteniente del ADN fue trasvasado a otro tubo eppendorff limpio conteniente de 300ul de isopropanol (Propanol-2) al 100%.
- Los tubos se invirtieron cuidadosamente para favorecer la mezcla de las soluciones (50 veces).
- Seguidamente, se procedió a centrifugar a 13.000 – 16.000 x g

por 1 minuto.

- El sobrenadante fue retirado de los tubos y se añadieron 300  $\mu$ l de Etanol al 70%, invirtiendo los tubos algunas veces para lavar el pellet de ADN.
- Posteriormente se procedió a centrifugar a 13.000 – 16.000 x g por 1 minuto.
- El sobrenadante fue eliminado cuidadosamente para no perder el ADN que se encontraba adosado a las paredes del tubo, se procedió a secar los tubos eppendorff en estufa a 37°C por 30 minutos.

#### **3.4.5. Hidratación del DNA:**

- Una vez verificado que los tubos se encontraban bien secos, se procedió a añadir 50 – 100 $\mu$ l de la solución tampón hidratante (Hydration Buffer Solution) y se dejó la muestra incubando a temperatura ambiente durante toda la noche.
- Seguidamente, los eppendorff fueron agitados en vórtex por 5 segundos a velocidad media para coleccionar la muestra en el fondo del tubo y finalmente fueron almacenados a 4°C hasta su utilización.

#### **3.5. Electroforesis en gel de agarosa.**

La extracción del ADN mitocondrial fue verificada mediante la realización de una electroforesis horizontal en gel de agarosa, para la cual se procedió a preparar un gel de agarosa al 1% (0,1 g de agarosa/1 ml de tampón TAE 1x). La agarosa todavía líquida, fue colocada sobre una placa molde para el gel, en la cual fue colocado un peine para la formación de los orificios donde se colocaran las muestras y se esperó que solidificase. Una vez solidificado el gel, el peine fue retirado cuidadosamente y la placa con el gel fue colocada en la cubeta para electroforesis conteniendo de tampón TAE 1x, el cual debe cubrir completamente el gel. Fue aplicado el DNA Ladder 1

Kb Plus en los orificios extremos, y posteriormente el producto de la PCR mas el colorante, siendo la mezcla 2ul de la muestra + 3ul del colorante Blue Juice 10x. El gel fue visualizado en un transluminador y fotografiado con una cámara digital para analizar las bandas obtenidas, utilizando el programa Zoom Browser EX 5.6 Canon, teniendo como base el marcador utilizado.

### **3.6. Amplificación de los Fragmentos de los Genes Citocromo B y Citocromo Oxidasa I.**

Para la amplificación de los fragmentos de los genes mitocondriales de interés, para el presente trabajo se empleo la tecnología de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y *primers* específicos y universales dependiendo del gen:

#### **3.6.1. Citocromo Oxidasa I (COI):**

Para la amplificación de este gen en los ejemplares del género *Hippocampus*, se probó con 3 pares de *primers* (FISH1R, FISH2R, FISH1F, FISH2F, L6252 y H7271) (Tabla 2) y sus combinaciones, obteniéndose resultados positivos con el par conformado por el primer FISH2F, que se une desde la base 25 hasta la base 50 y el primer FISH2R, que se une desde la base 700 hasta la 725, con respecto a la secuencia completa del gen COI de *Hippocampus kuda* obtenido del GenBank.

#### **3.6.2. Citocromo B (CYT B):**

Para la amplificación del fragmento del gen Citocromo B, se probó con 2 pares de *primers* (SHf, SHf2, SHr2 y SH12Sr) (Tabla 2) y sus combinaciones, obteniéndose resultados positivos con el par conformado por el primer SHf, que se une desde la base 61 hasta la base 83 y el primer SHr2, que se une desde la base 934 hasta la 953, con respecto a la secuencia completa del gen CYT B de *Hippocampus kuda*.



**Tabla 2.- Secuencias de los *primers* utilizados para la amplificación de los segmentos de los diferentes genes de interés**

<b>Fragmento del Gen</b>	<b>Primer</b>	<b>Secuencia 5' - 3'</b>
<b>COI</b>	<i>FISH R 1</i>	TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA
	<i>FISH F 1</i>	TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC
	<i>FISH R 2</i>	ACT TCA GGG TGA CCG AAG AAT CAG AA
	<i>FISH F 2</i>	TCG ACT AAT CAT AAA GAT ATC GGC AC
	<i>L 6252</i>	TTC CGC CCC TTT CGG GGC CGT C
	<i>H 7271</i>	GTG GTG TCA TAC AAT AAA
<b>CYT B</b>	<i>SHf</i>	CTA CCT GCA CCA TCA AAT ATT TC
	<i>SHf 2</i>	TTG CAA CCG CAT TTT CTT CAG
	<i>SHr 2</i>	CGG AAG GTG AGT CCT CGT TG
	<i>SH12Sr</i>	GCG GTG GCT GGC ACG AGT TTT AC

La técnica de la PCR consiste básicamente en la desnaturalización del ADN, anillamiento de *primers* y extensión del fragmento a amplificar en una serie de ciclos en los que las condiciones varían en función de los *primers* y genes utilizados (Hartl, 2000). Las condiciones de amplificación del fragmento del gen COI consistieron en 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido de 1 ciclo de desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, un ciclo de anillamiento de los *primers* a 58 °C por 30 segundos y un ciclo de 72 °C por 2 minutos para la extensión de la cadena, los cuales se repitieron 35 veces de forma consecutiva, seguidos de un ciclo a 72 °C durante 7 minutos, para finalizar a 4 °C sin límite de tiempo. Mientras que para el caso del fragmento del gen Citocromo B, las condiciones fueron idénticas a las descritas para el gen COI, con diferencia en la temperatura de anillamiento de los *primers* que fue de 50° C.

Las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador MJ Research, INC, modelo PTC-200™ Programmable Thermal Controller, utilizando una reacción conteniente de 0,5 ul de ADN (muestra), 0,5 ul de primer forward, 0,5 ul de primer reverse, 1,5 ul de Cloruro de Magnesio

(MgCl<sub>2</sub>), 12,5 ul de GoTaq y 9,5 ul de Agua ultrapura (milliQ) para un volumen final de 25 ul.

### **3.7. Verificación de las reacciones de PCR.**

- Se procedió a realizar una electroforesis en gel de agarosa al 1% (0,1 g de agarosa/1 ml de tampón TAE 1x, de acuerdo a la metodología descrita anteriormente.
- El gel fue fotografiado en el transluminador con una cámara digital y filtros especializados para analizar las bandas obtenidas, utilizando el programa Zoom Browser EX 5.6 Canon, teniendo como base el marcador utilizado.
- Con base en la presencia e intensidad de la banda de cada muestra se determinó la cantidad de ADN de cada muestra que fue utilizada para la realización de la reacción de secuenciamiento.

### **3.8. Purificación de los Productos de PCR para Secuenciación.**

Para la purificación del producto de la PCR para su secuenciamiento, se procedió a realizar la limpieza con la enzima ExoSap, para lo cual fue necesario preparar una reacción de limpieza conteniente de 5 ul de la muestra amplificada, 0,13 ul de enzima ExoSap y 1,87 ul de Agua ultra pura, la cual fue sometida a un ciclo de dos pasos en el termociclador a 37°C durante 1 hora, seguido de 15 minutos a 80 °C. Una vez finalizado este proceso el producto ya purificado puede ser utilizado para la preparación de las reacciones de secuenciamiento.

### **3.9. Secuenciamiento de los Productos de PCR.**

Se realizaron 2 reacciones de secuenciamiento para cada muestra separadas para cada uno de los *primers* forward y reverse respectivamente, contenientes de 0,70 ul de BigDye, 1,05 ul de Tampón Seq 5X, 0,5 ul de

*primer* (5  $\mu$ M), 1,4 -2,5  $\mu$ l de producto purificado de la PCR y 3,15 – 1,75  $\mu$ l de agua ultra pura, para un volumen final de reacción de 7  $\mu$ l. El programa de secuenciamiento utilizado para estas reacciones consistió en un ciclo de desnaturalización inicial a 96°C durante 2 minutos, un ciclo de desnaturalización a 96°C durante 30 segundos, un ciclo anillamiento de *primers* a 50°C durante 15 segundos y un ciclo de extensión a 60°C durante 4 minutos, los cuales fueron repetidos de forma continua 30 veces, para finalizar a 12 ° C por tiempo indefinido.

El producto del PCR de secuenciamiento fue sometido a un procedimiento de limpieza antes de ser colocado en el secuenciador, que consistió en adicionar a cada 7  $\mu$ l de reacción de secuenciamiento, 0,7  $\mu$ l de EDTA (125 mM) y 0,7  $\mu$ l de Acetato de Sodio (3M) y homogenizar brevemente. Posteriormente, se añadió 17,5  $\mu$ l de Etanol al 100% y fue homogeneizado en vórtex levemente. Las reacciones fueron incubadas en la oscuridad durante 15 minutos a temperatura ambiente y centrifugadas por 15 minutos a 13.000 rpm a temperatura ambiente. Una vez centrifugadas, se procedió a descartar el Etanol en papel secante, a añadir 24,4  $\mu$ l de etanol al 70% y a centrifugar a 13.000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante fue descartado y se repitió el lavado con etanol al 70%. Finalmente, las reacciones limpias, fueron secadas en el termociclador durante 2 minutos a 96°C y guardadas en la nevera cubiertos con papel aluminio hasta el secuenciamiento.

El secuenciamiento fue realizado por el método de electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI 3130 DNA sequencer (Perkin-Elmer) utilizando el kit ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin-Elmer).

Una vez obtenidos los electroferogramas, todas las secuencias fueron revisadas y editadas visual y manualmente utilizando el programa Geneious v.4.5.4 (Biomatters Ltd.©), con la finalidad de corregir posibles errores de secuenciamiento y crear secuencias consenso para cada muestra a partir de

las secuencias forward y reverse obtenidas a partir de cada muestra. Las secuencias nucleotídicas consenso obtenidas fueron sometidas a búsquedas en las bases de datos genómicos internacionales (DNA Data Bank of Japan (DDBJ); European Molecular Biology Laboratory (EMBL) y GenBank Data Base (GB)), mediante el procedimiento de BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”) (Altschul *et al.*, 1990) a través del portal web del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) para la identificación de posibles homologías que permitiesen verificar su similaridad con las secuencias mitocondriales de otros peces teleósteos.

### **3.10. Análisis de los Datos**

**3.10.1. Análisis Merístico:** para visualizar la variación de cada variable entre las diferentes especies, fue elaborada una tabla comparativa de los valores modales, mínimos y máximos obtenidos con respecto a aquellos señalados en la literatura para las mismas especies por otros autores, así como con respecto a otras especies que habitan en el Océano Atlántico.

**3.10.2. Análisis Morfométrico:** para la realización del análisis estadístico de los datos de las variables morfométricas se utilizó el programa PAST v1.93 (Hammer *et al.*, 2001), el cual es accesible de forma gratuita en internet. Los valores de las variables morfométricas fueron transformados a sus correspondientes logaritmos naturales previamente a todos los análisis (Bookstein, 1991).

Los datos transformados fueron examinados utilizando un Análisis de Componentes Principales (ACP), con la finalidad de detectar la existencia de grupos estadísticamente robustos que representen a las especies estudiadas. Asimismo, este análisis permitió conocer la contribución de cada variable a la varianza total de los datos, revelando así su importancia como caracteres diagnósticos.

**3.10.3. Análisis Morfológico:** las características generales de la forma del cuerpo, número y posición de los anillos prominentes del dorso y los patrones de coloración de los ejemplares analizados fueron comparadas con las claves y observaciones proporcionadas por Vari, 1982, Cervigón, 1991, Lourie *et al.*, 1999, Fritzsche, 2002, y Lourie *et al.*, 2004, así como con la información contenida en las descripciones originales elaboradas por Perry, 1810 y Ginsburg, 1933, con la finalidad de corroborar la identidad taxonómica de los individuos.

Con la información obtenida a partir de los análisis merísticos, morfométricos y morfológicos se procedió a realizar la caracterización de las especies analizadas con base en los resultados obtenidos y a la elaboración de una clave dicotómica para su identificación.

#### **3.10.4. Análisis Filogenético:**

Para verificar la posibilidad de utilizar fragmentos de los genes COI y CYT B como marcadores moleculares para la identificación de las especies del género *Hippocampus* presentes en Venezuela, fueron amplificadas y secuenciadas un total de 35 muestras para los genes CYT B y COI respectivamente, de ejemplares provenientes de diversas localidades de las costas de Venezuela y Brasil, las cuales fueron seleccionados aleatoriamente entre los ejemplares de cada una de las localidades: Golfo de Cariaco (n=5), Laguna de la Restinga (n=7), Laguna las Marites (n=11), Isla de Coche (n=2), Laguna Chacopata (n=1), Golfo de Venezuela (n=2) y la localidad de Natal en Brasil (n=6) con las cuales se construyeron dos bases de datos. La primera con las secuencias genéticas de CYT B, la segunda con las secuencias genéticas de COI.

Adicionalmente, como ha sido señalado que la señal filogenética emerge mejor de la interacción de un mayor número de datos y generalmente las topologías recuperadas a partir de matrices de datos combinados son mejor resueltas que aquellas que provienen de un solo gen (Teske *et al.*,

2004), se procedió a la combinación de las secuencias obtenidas de los genes COI y CYT B en una sola matriz, concatenándolas mediante el procedimiento de adición de los fragmentos secuenciados en una secuencia única por individuo, para evaluar si es posible maximizar el poder descriptor y explicativo del análisis filogenético.

Como grupo externo de comparación se utilizaron las secuencias correspondientes a los genes CYT B y COI obtenidas de un ejemplar de *Hippocampus kuda* cuyo genoma mitocondrial completo ha sido secuenciado (Kawahara *et al.*, 2008) y las secuencias de los genes de interés se encuentran disponibles en el Genbank, ya que esta es la única especie dentro del género, de la que se disponen las secuencias completas de estos genes procedentes de un mismo ejemplar.

Las secuencias fueron alineadas usando el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) implementado en el programa MEGA 4.1 (Tamura *et al.*, 2007). Con este programa se procedió a examinar la variación nucleotídica, el patrón de sustitución de nucleótidos y las distancias genéticas ( $p$ ). Esta distancia ( $p$ ) consiste en la proporción del número de sitios nucleotídicos en los cuales dos secuencias que han sido comparadas son diferentes y se obtiene mediante la división del número de diferencias nucleotídicas entre el total de nucleótidos comparados. Al respecto, es importante señalar que para el cálculo de ésta, no se realiza ninguna corrección para sustituciones múltiples en un mismo sitio, desvíos en las tasas de sustituciones (transiciones y/o transversiones), ni se consideran diferencias en las tasas evolutivas entre sitios (Nei & Kumar, 2000).

La saturación de nucleótidos fue analizada graficando el número absoluto de transiciones y transversiones contra los valores de distancia genética mediante el uso del programa DAMBE v.5.1.5 (Xia & Xie, 2001) y para la obtención del valor del coeficiente “R<sup>2</sup>” que indica el grado de asociación entre las variables y el ajuste de los datos a la ecuación de la recta fue utilizado el programa Excel v. 2007, este análisis sirve de manera

indirecta para cuantificar el nivel de saturación de las transiciones o transversiones, respectivamente.

Para evaluar la extensión de la variación intra e interespecífica, así como para examinar el grado de soporte de los taxos, que fueron designados como especies a través de la revisión morfológica, merística y morfométrica, las relaciones filogenéticas entre los individuos fueron investigadas utilizando diferentes métodos de inferencia filogenética, Neighbour Joining (NJ), Máxima parsimonia (MP) y Máxima probabilidad (ML), implementados en diversos módulos del programa Geneious v.4.5.4 (Biomatters©).

Las relaciones filogenéticas estimadas mediante el análisis de Máxima Parsimonia fueron obtenidas mediante el programa PAUP\* versión beta 4.0b10 (Swofford, 2002), utilizando búsqueda heurística. Las estimaciones mediante análisis de Neigborg - Joining (Saitou & Nei, 1987) fueron implementados utilizando el modelo de distancia genética HKY (Hasegawa *et al.*, 1985). Los análisis basados en el método de Máxima Probabilidad fueron realizados con el programa PHYML (Guindon & Gascuel, 2003). Para la selección del modelo de sustitución nucleotídica que mejor se ajustó a los datos obtenidos se siguió la prueba de relación jerárquica de probabilidades (Hierarchical Likelihood Ratio Tests, hLRT) implementada en el programa Modeltest v.3.7 (Posada & Crandall, 1998). Las filogenias obtenidas fueron evaluadas utilizando el método de *Bootstrap* con 1000 replicas (Felsenstein, 1985). Los análisis filogenéticos de los datos moleculares fueron realizados siguiendo las recomendaciones de Swofford *et al.* (1996), Nei & Kumar (2000) y Felsenstein (2004).

### **3.10.5. Análisis Poblacionales:**

Los análisis poblacionales fueron realizados con base en 122 secuencias del gen Citocromo B, obtenidas a partir de individuos identificados como pertenecientes a la especie *Hippocampus reidi* mediante los métodos taxonómicos convencionales, utilizando la información

morfológica, merística y morfométrica, así como la información derivada de la aplicación de los métodos moleculares con base en las secuencias de Citocromo B de los ejemplares de las localidades objeto de estudio: Golfo de Venezuela (n=2), Golfo de Cariaco (n=19), Laguna de las Marites (n=32), Laguna de la Restinga (n=38) y Natal, Brasil (n=31).

Los valores de divergencia de secuencia de nucleótidos entre pares de haplotipos fueron obtenidos con el programa Mega v. 4.1 (Tamura *et al.*, 2007), utilizando la distancia  $p$  (no corregida). Un árbol de haplotipos basado en el método de máxima parsimonia fue generado por el programa Paup\* versión beta 4.0b10 (Swofford, 2002), utilizándose el algoritmo de búsqueda heurística. El soporte de las ramas fue validado por el método de *Bootstrap* (Felsenstein, 1985) con 1000 réplicas.

La diversidad genética fue estimada a través del cálculo de los valores de diversidad haplotípica ( $h$ ; Nei, 1987), diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), número de sitios polimórficos (S) y Número de haplotipos (k) con la ayuda de los programas Arlequín v. 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005) y DNAsp v. 5.0 (Librado & Rozas, 2009). Los valores de diversidad nucleotídica fueron estimados por el número de sustituciones entre las secuencias, utilizando la distancia genética de Tamura (1992) con corrección gama. El valor del parámetro  $\alpha$  de distribución gama fue previamente obtenido con el programa Modeltest v. 3.7 (Posada & Crandall, 1998), a partir de las secuencias de Citocromo B. Este enfoque es el indicado para los análisis de datos con diferentes tasas de transición y transversión.

A fin de probar la hipótesis de que las mutaciones observadas en el fragmento secuenciado del gen Citocromo B son selectivamente neutras, fueron empleadas las pruebas estadísticas  $D^*$  y  $F^*$ , propuestos por Fu & Li (1993), y la prueba estadística  $D$ , propuesta por Tajima (1989), con la ayuda del programa DNAsp v. 5.0 (Librado & Rozas, 2009). La prueba estadística  $D^*$  está basada en las diferencias entre el número de *singletons* (mutaciones que ocurren una única vez en el conjunto de datos) y el número total de



mutaciones; mientras que la prueba  $F^*$  está basada en las diferencias el número de *singletons* y el número medio de diferencias de nucleótidos entre pares de secuencias. Por otra parte, la prueba  $D$  está basada en las diferencias entre el número de sitios segregantes y el número medio de diferencias nucleotídicas. La significancia estadística de esas pruebas fue determinada comparando los valores de  $D^*$ ,  $F^*$  y  $D$  obtenidos con los valores críticos descritos para cada una de las pruebas (Fu & Li, 1993; Tajima, 1989). Estas pruebas de neutralidad pueden ser empleadas para detectar, en las secuencias de ADNmt, indicios de crecimiento poblacional pasado, declinación o estabilidad.

El análisis de la estructura poblacional fue realizado a través de un análisis jerárquico de la varianza molecular (AMOVA; Excoffier *et al.*, 2005), implementado en el programa Arlequín v. 3.0, utilizándose la distancia de Tamura (1992) con el parámetro  $\alpha$  de corrección gamma determinado previamente con el programa Modeltest v. 3.7 (Posada & Crandall, 1998). Los componentes de varianza genética fueron computados en tres niveles jerárquicos, para someter a prueba dos hipótesis de estructuración genética, la primera en la escala micro geográfica comparando Poblaciones Continentales vs Poblaciones Insulares, en las costas de Venezuela y la segunda a escala macro geográfica comparando las Poblaciones del Mar Caribe vs. Poblaciones del Atlántico Sur Occidental, para el primer nivel jerárquico ( $\Phi_{CT}$ ), entre subpoblaciones dentro de una misma área ( $\Phi_{SC}$ ) y dentro de las subpoblaciones ( $\Phi_{ST}$ ), o sea, la varianza residual entre los individuos. La significancia de esos valores fue probada a través de 20000 permutaciones.

El grado de divergencia genética entre las poblaciones fue estimado por el índice  $\Phi_{ST}$  (índice utilizado para datos de ADNmt, análogo al  $F_{ST}$ ; Excoffier *et al.*, 1992), con la ayuda del programa Arlequín v. 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005). El índice  $\Phi_{ST}$  incluye informaciones sobre las frecuencias haplotípicas y distancia genética entre los haplotipos (Tamura, 1992). La significancia estadística de los valores de  $\Phi_{ST}$  fue probada por 20000

permutaciones. Los valores estimados de  $F_{ST}$  entre pares de poblaciones serán utilizados en el análisis de aislamiento por distancia y la prueba de Mantel, realizada por el programa Arlequín empleándose 20000 permutaciones. Paralelamente, fue realizada una prueba exacta de diferenciación entre poblaciones, la cual prueba la hipótesis de distribución aleatoria de  $k$  diferentes haplotipos entre  $r$  poblaciones, de acuerdo a lo descrito por Raymond & Rousset (1995). Esta prueba es análoga a la prueba exacta de Fisher para una tabla de contingencia  $2 \times 2$ , pero extendida a una tabla  $r \times k$ . Para datos de haplotípicos la tabla es construida utilizando la frecuencia de los mismos y se evalúa la probabilidad de observar una tabla menor o igual que la observada en la configuración inicial de la muestra, bajo la hipótesis de panmixia. La correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica entre los diferentes haplotipos fue sometida a prueba mediante la implementación de una prueba de Mantel, con la finalidad de evaluar la posibilidad de ocurrencia del modelo de aislamiento por distancia.

Las relaciones entre los haplotipos del Citocromo B dentro de cada una de las localidades de muestreo fueron inferidas a partir de la red de haplotipos construida por el método de parsimonia estadística de Templeton *et al.* (1992), implementado en el programa TCS v. 1.21 (Clement *et al.*, 2000). Ese método utiliza un criterio de 95% de probabilidades para conectar primeramente haplotipos que poseen el menor número de diferencias, permitiendo un mayor poder de resolución en relación a los métodos filogenéticos tradicionales para inferir relaciones entre poblaciones que divergieron recientemente (Posada & Crandall, 2001). El programa también utiliza el criterio de Crandall & Templeton (1993) y Castelleo & Templeton (1994) para identificar el haplotipo mas “viejo” o ancestral (haplotipo raíz) bajo los supuestos de neutralidad y muestreo homogéneo. Esto es logrado mediante el cálculo del peso como grupo externo que tiene cada haplotipo, mediante la incorporación de su frecuencia, su distancia desde el punto medio del cladograma y el número de conexiones con los haplotipos vecinos, seleccionando como haplotipo ancestral aquel que ha obtenido el mayor

valor como grupo externo (Teske *et al.*, 2005).

Los programas DNAsp v5.0 y el programa Arlequín v.3.0 (Excoffier *et al.*, 2005) fueron empleado para investigar la historia demográfica de las poblaciones a través del análisis de distribución de diferencias par a par (análisis de *mismatch*; Rogers & Harpending, 1992; Harpending *et al.*, 1993) de las secuencias mitocondriales en cada una de las localidades de muestreo. La distribución de *mismatch* estima el número de diferencias de nucleótidos entre los pares de secuencias y muestra a través de un gráfico, las frecuencias relativas de los resultados de esas comparaciones par a par. Esas distribuciones fueron entonces comparadas con la distribución esperada para el modelo de expansión poblacional. En poblaciones que sufren un cuello de botella reciente seguido de una rápida expansión es esperada una distribución de Poisson (Harpending *et al.*, 1993). Por otro lado, curvas multimodales están asociadas a poblaciones que se encuentran en equilibrio demográfico. Los intervalos de confianza fueron obtenidos a través de un *bootstrap* paramétrico y de la comparación de la suma de cuadrados de los desvíos entre las distribuciones observada y esperada. Los gráficos referentes a las distribuciones de *mismatch* fueron generados por el programa DNAsp v. 5.0 (Librado & Rozas, 2009) y Network v.4.5.4 (Fluxus Technology©)

Con la finalidad de evaluar si los datos de secuencia obtenidos se desvían significativamente de lo que sería esperado para un modelo de expansión poblacional fue estimado el Índice *Raggedness* de Harpending (*HRI*) mediante el programa Arlequín v 3.0. El modelo de expansión poblacional está basado en tres parámetros (Rogers & Harpending, 1992):  $\theta_0$ ,  $\theta_1$  ( $\theta$  antes y después del crecimiento poblacional) y  $\tau$  (tau es la edad relativa de expansión poblacional, medida en unidades de tiempo mutacional). Los valores estimados de  $\theta$  ( $\theta_0$  y  $\theta_1$ ) corresponden al producto de  $2\mu N_{f0}$  y  $2\mu N_{f1}$ , respectivamente (donde  $\mu$  es la tasa de mutación y  $N_f$  es el tamaño poblacional efectivo de las hembras en los tiempos 0 y 1).

Adicionalmente, se realizará la prueba  $F_S$  (Fu, 1997), también implementada en el programa Arlequín v.3.0, la cual evalúa si las mutaciones son neutras o están bajo la influencia de la selección, siendo que valores negativos y significantes pudieran ser indicativos de expansión poblacional (Fu, 1997). La prueba  $F_S$  distingue un exceso de alelos de baja frecuencia en una población en expansión, comparando con el número esperado para una población estable. La prueba  $F_S$  es más poderosa que las pruebas  $F^*$  y  $D^*$  de Fu & Li (1993) y que el índice de *raggedness* de Harpending para evaluar crecimiento poblacional.

Finalmente, la hipótesis de asociación entre la localización geográfica de los haplotipos y su posición en el árbol genealógico, será probada a través del análisis filogeográfico de clados agrupados (NCPA, del inglés *nested clade parsimony analysis*; Templeton *et al.*, 1995), mediante el programa ANeCA (Panchal, 2007) que facilita la implementación automática de estos análisis con los programas TCS v.1.21 (Clement *et al.*, 2000) y GeoDis 2.5 (Posada *et al.*, 2000). En el caso de asociación significativa entre haplotipos y localidad geográfica, el análisis de clados agrupados es capaz de diferenciar si esa asociación es resultante de eventos históricos, como fragmentación o expansión poblacional, o de procesos recurrentes, como flujo génico. Para esto, los haplotipos fueron agrupados en clados progresivamente inclusivos, diferenciándose por un único paso mutacional, de acuerdo con las reglas definidas por Templeton *et al.* (1987) y Templeton & Sting (1993).

El análisis de clados agrupados se basa en la estimación de dos distancias, la distancia del clado ( $D_c$ ), que cuantifica la distribución geográfica de un determinado haplotipo o clado, y la distancia del clado agrupado ( $D_n$ ), que mide cuan distante un haplotipo o clado se encuentra en relación a otros haplotipos o clados agrupados en el mismo nivel jerárquico. Esas distancias son computadas también entre los clados de las extremidades (T) y los clados internos (I),  $(D_{I-T})_c$  y  $D_{(I-T)_n}$ . La distancia geográfica entre las localidades será estimada como la distancia entre los puntos de colecta con base en las coordenadas geográficas, expresadas en

grados decimales. La asociación entre la posición filogenética y geográfica de los clados será probada a través de permutaciones aleatorias de los valores de  $D_c$ ,  $D_n$ ,  $(D_{I-T})_c$  e  $(D_{I-T})_n$  (1000 permutaciones). La interpretación de los resultados será realizada con la ayuda de la clave de inferencia elaborada por Templeton *et al.* (2005), disponible en internet (<http://darwin.uvigo.es/software/geodis.html>).

## 4. RESULTADOS

### 4.1.- Caracterización Taxonómica de las Especies

Se analizaron un total de 131 individuos, de los cuales 117 fueron identificados preliminarmente como *Hippocampus reidi* y 14 como *Hippocampus erectus*. Los ejemplares utilizados fueron catalogados y depositados en las Colecciones Ictiológicas del Laboratorio de Biología y Genética de Peces (LBP) del Instituto de Biociências de la Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, Brasil y del Laboratorio de Ictiología de la Escuela de Ciencias Aplicadas del Mar de la Universidad de Oriente, Núcleo Nueva Esparta, Venezuela.

#### 4.1.1.- Análisis Merístico:

El análisis de la variación de las características merísticas entre las especies demostró un alto grado de solapamiento en la totalidad de las variables utilizadas (Tabla 3), siendo imposible tomar una decisión taxonómica sólida para diferenciar estas especies, con base únicamente en este tipo de caracteres.

**Tabla 3.- Valores modales, mínimo y máximo de las variables merísticas de *Hippocampus reidi* e *Hippocampus erectus*.**

<i>Hippocampus reidi</i> (N=117)				<i>Hippocampus erectus</i> (N=14)			
Variabes	Moda	Min	Max	Variabes	Moda	Min	Max
TrR	11	11	11	TrR	11	11	11
TaR	35	32	37	TaR	36	35	38
RUDF	3	3	3	RUDF	3	3	3
DFr	17	16	18	DFr	18	16	18
PFr	16	16	18	PFr	16	16	16
Afr	4	4	4	Afr	4	4	4
ES	2	1	2	ES	1	1	1
CS	1	1	2	CS	1	1	1

#### 4.1.2.- Análisis Morfométrico:

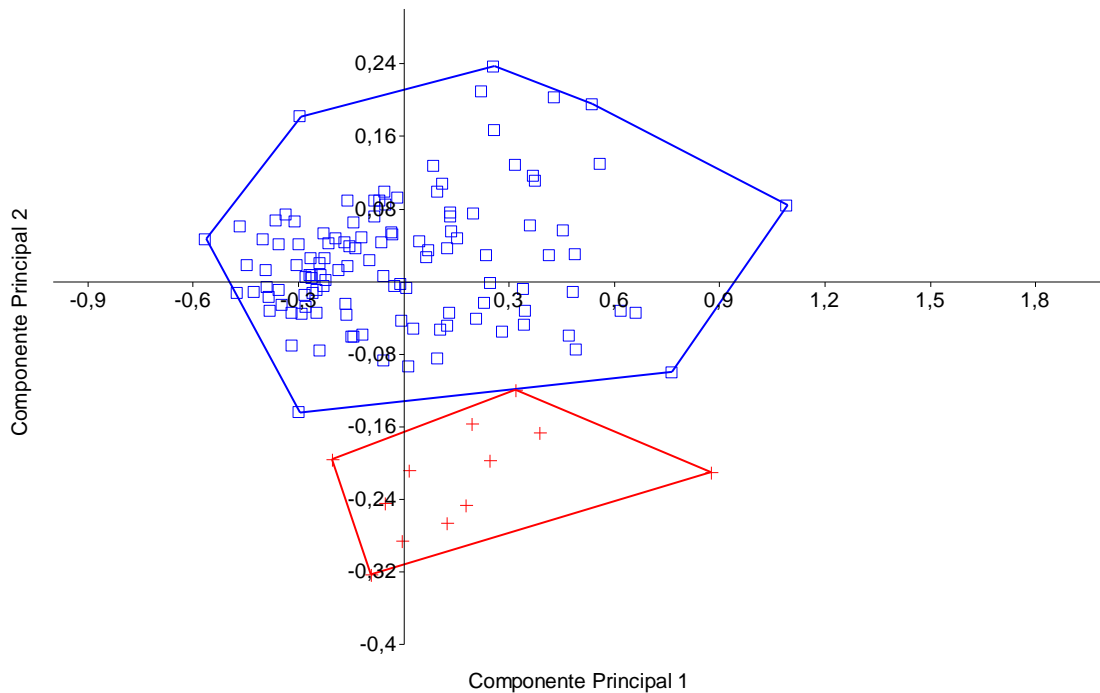
Los cálculos correspondientes al análisis de componentes principales (ACP), fueron realizados con la matriz varianza/covarianza de 11 variables morfométricas (SL, TrL, TaL, HL, SnL, CH, HD, SnD, TD4, TW9 y PL), ya que todas las variables fueron determinadas en las mismas unidades de medición (Hammer *et al.*, 2006). Este análisis permitió determinar 11 componentes principales contruidos como combinaciones lineales de las variables originales. El 89,87 % de la varianza total de los datos es explicada por los tres primeros componentes principales (CP), con el 77,71% en el primer componente principal (CP1); 7,71 % en el segundo componente (CP2) y 4,44 % en el tercero (CP3). En la Tabla 4 se muestran los eigenvalores y los porcentajes de varianza explicados por cada uno de los componentes principales, así como los intervalos de confianza para los porcentajes de varianza explicada, obtenidos mediante un procedimiento de *bootstrap* con 1000 réplicas.

**Tabla 4.- Eigenvalores y porcentajes de varianza de cada uno de los componentes principales resultantes del análisis multivariado de 11 variables morfométricas determinadas en *Hippocampus erectus* e *Hippocampus reidi*.**

CP	Eigenvalor	% de Varianza	Var. Acumul.	Eig 2,5%	Eig 97,5%
1	0,096	77,71	77,71	71,66	82,86
2	0,009	7,71	85,42	5,47	11,18
3	0,005	4,45	89,87	2,62	6,99
4	0,005	3,73	93,60	2,54	5,19
5	0,002	1,87	95,47	1,12	2,70
6	0,002	1,62	97,10	1,06	2,15
7	0,001	0,99	98,08	0,60	1,37
8	0,001	0,92	99,01	0,55	1,23
9	0,001	0,74	99,74	0,29	1,35
10	0,000	0,19	99,94	0,10	0,28
11	0,000	0,06	100,00	0,03	0,09

En la Figura 11 se muestra la distribución de los vectores propios

obtenidos para cada individuo en el plano cartesiano conformado por el CP1 vs. CP2 en el espacio multivariado, donde se puede observar la clara separación de los individuos de la especie *Hippocampus reidi* (cuadros azules) con respecto a la especie *Hippocampus erectus* (cruces rojas) en áreas diferentes del espacio multivariado.



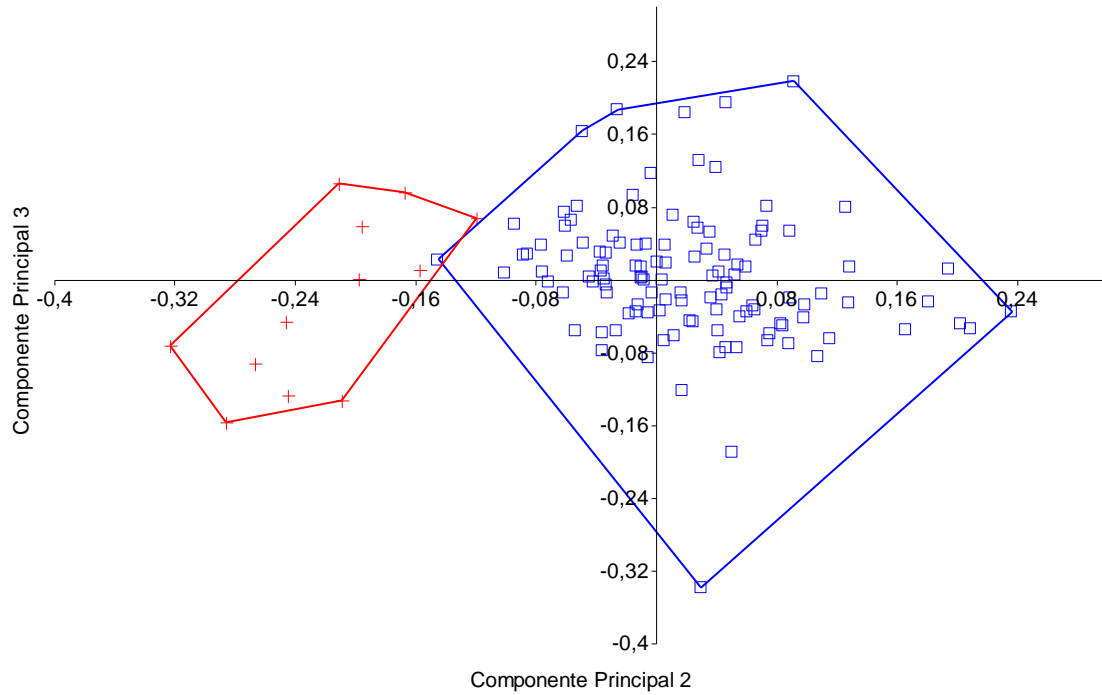
***Hippocampus erectus***

***Hippocampus reidi***

**Figura 11.- Gráfica de los individuos de *Hippocampus reidi* e *Hippocampus erectus* en el espacio morfométrico multivariado definido por los CP 1 y CP 2.**

Igualmente fue posible detectar una clara separación de las especies en el espacio multivariado delimitado en el plano cartesiano del CP2 vs. CP3 (Figura 12). Mientras que esto no fue posible cuando se graficaron los valores de los vectores propios obtenidos para cada individuo en el espacio delimitado por el componente principal CP1 vs. CP3 (Figura 13), revelándose la importancia del CP2 para la separación de las especies.

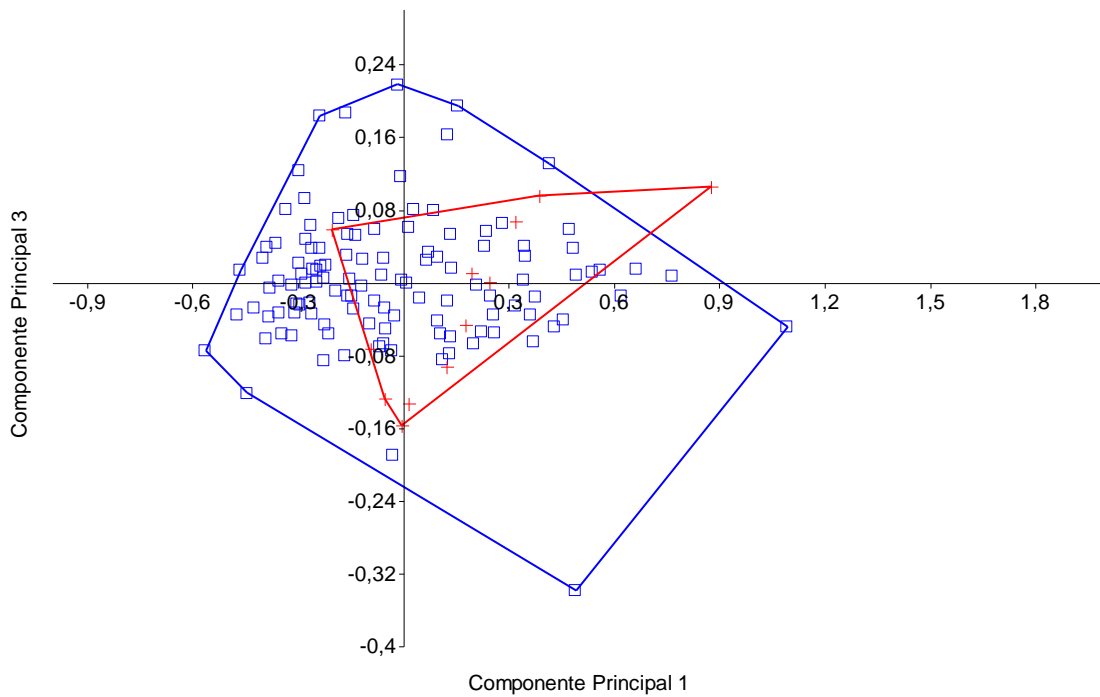




***Hippocampus erectus***

***Hippocampus reidi***

**Figura 12.- Gráfica de los individuos de *Hippocampus reidi* e *Hippocampus erectus* en el espacio morfométrico multivariado definido por los CP 2 y CP 3.**



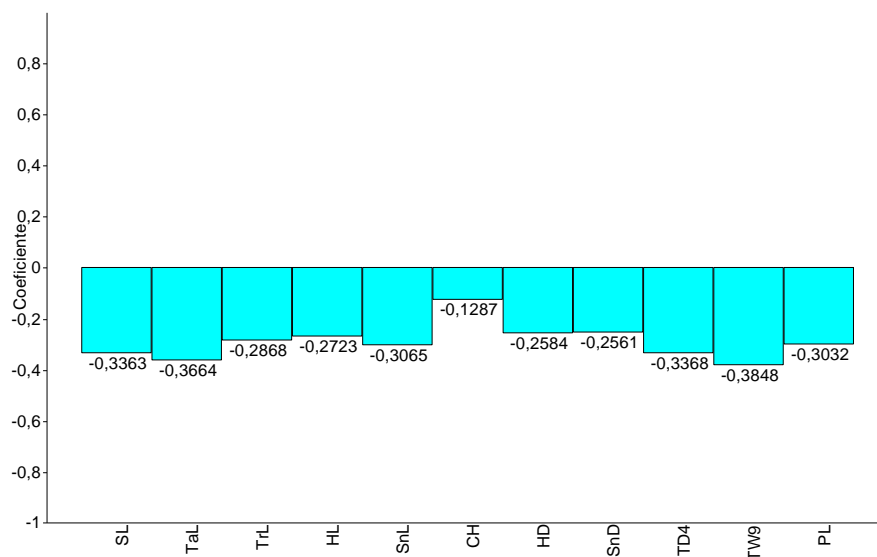
***Hippocampus erectus***

***Hippocampus reidi***

**Figura 13.- Gráfica de los individuos de *Hippocampus reidi* e *Hippocampus erectus* en el espacio morfométrico multivariado definido por los CP 1 y CP 3.**

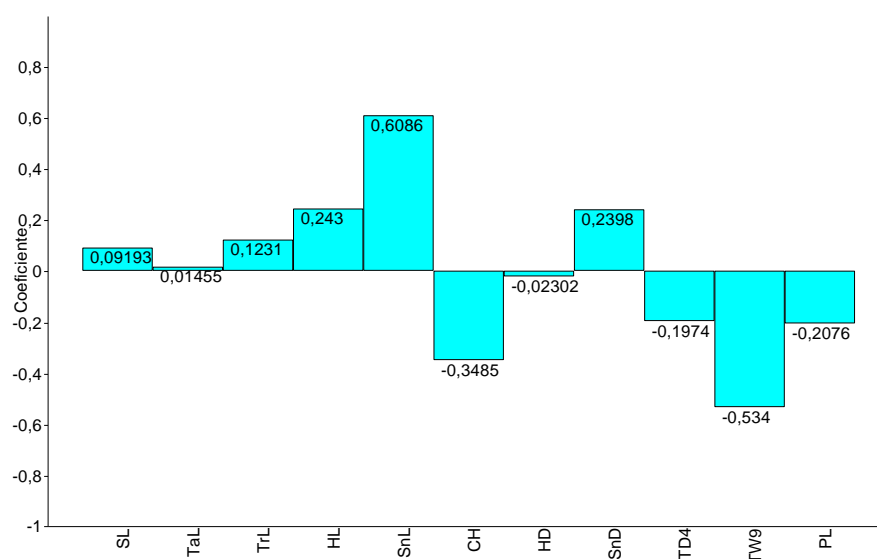
Los valores de los coeficientes de cada variable para el primer

componente principal (CP1) son presentados en la Figura 14, encontrándose que en su totalidad todas presentaron igual signo y la mayoría de ellas valores de magnitud relativamente semejantes que oscilaron entre  $-0,2561$  y  $-0,3848$ , con excepción de la variable altura de la coroneta (CH) cuyo coeficiente de contribución a este componente fue mucho menor a las demás variables, mostrando un valor de  $-0,1287$ . En función de lo anterior, este componente (CP1), podría entonces representar el “tamaño global” de los individuos.



**Figura 14.- Coeficientes de participación de las 11 variables morfométricas de *Hippocampus erectus* e *Hippocampus reidi* utilizadas en el CP 1.**

En la Figura 15, se puede evidenciar una contribución diferencial de las variables, tanto en signo como en magnitud, para el segundo componente principal (CP2), por lo que representaría entonces factores o componentes “de forma” que se caracterizan típicamente por presentar coeficientes positivos y negativos, lo que implica que contraponen unos grupos de variables frente a otros.



**Figura 15.- Coeficientes de participación de las 11 variables morfométricas de *Hippocampus erectus* e *Hippocampus reidi* utilizadas en el CP 2.**

En la Tabla 5 se presentan los valores promedio, mínimo, máximo y desviación estándar de las variables morfométricas de los ejemplares de *Hippocampus reidi* e *Hippocampus erectus* analizados.

**Tabla 5.- Valores promedio, mínimo, máximo, y desviación estándar de las variables morfométricas de *Hippocampus reidi* e *Hippocampus erectus*.**

Variables	<i>Hippocampus reidi</i> (N=117)				Variables	<i>Hippocampus erectus</i> (N=12)			
	Media	Min	Max	D.E		Media	Min	Max	D.E
SL	184,17	93,90	296,70	41,49	SL	153,89	84,00	195,80	34,99
TrL	48,74	27,00	75,10	9,93	TrL	43,23	23,70	60,50	9,54
TaL	102,60	46,80	174,50	26,77	TaL	89,53	50,40	127,10	21,25
HL	33,97	20,10	47,40	6,13	HL	26,68	15,80	34,40	4,58
SnL	15,51	7,80	23,20	3,19	SnL	9,45	5,10	12,90	1,95
CH	5,52	2,70	7,70	0,91	CH	6,86	3,80	9,90	1,85
HD	17,63	10,40	24,00	3,21	HD	15,08	9,90	19,40	2,89
SnD	4,28	2,20	6,00	0,81	SnD	3,43	2,40	4,50	0,51
TD4	12,87	4,10	19,50	3,00	TD4	12,12	8,30	16,90	2,58
TW9	18,68	9,30	29,00	5,16	TW9	20,23	10,10	26,30	4,97
PL	5,61	3,00	8,00	1,26	PL	5,38	3,60	7,50	0,97

#### 4.1.3.- Análisis Morfológico:

La morfología general de las especies del género *Hippocampus* es muy conservada, caracterizándose por la presencia de una cabeza bien diferenciada, ubicada en ángulo recto con respecto al cuerpo; la presencia de dos aletas pectorales a los lados de la cabeza, una aleta dorsal sobre los dos últimos anillos del tronco y el primero de la cola, así como una pequeña aleta anal en la región ventral del abdomen. El dimorfismo sexual está claramente evidenciado por la presencia de una bolsa incubadora en los ejemplares machos de ambas especies. En general, no existen características, a simple vista, que puedan ser utilizadas de manera única e independiente para la separación de ambas entidades taxonómicas. Sin embargo, fue posible corroborar algunas características diagnósticas que, aunque no son reflejadas en las claves de identificación, han sido mencionadas en la literatura como caracteres útiles para la identificación de las especies en estudio.

Cuando se poseen ejemplares de ambas especies, es posible notar que el cuerpo de los ejemplares de *Hippocampus erectus* es más robusto que el de *Hippocampus reidi*, presentando una región torácica más ancha. Igualmente se observa que el largo del rostro de la especie *Hippocampus erectus* tiende a ser más corto que el de *Hippocampus reidi*.

En todos los ejemplares de la especie *Hippocampus erectus* analizados los anillos prominentes fueron el 1°, 3°, 5° y 7°, mientras que en aquellos pertenecientes a la especie *Hippocampus reidi* estos se correspondieron con los anillos 1°, 4° y 7°. Sin embargo, es importante señalar que, en los ejemplares de mayor tamaño de esta última especie, no siempre fue posible detectar la presencia de anillos prominentes, presentándose una superficie dorsal prácticamente lisa o sin protuberancias. Los patrones de coloración de ambas especies son muy variados, así como la magnitud de la espinación corporal y la presencia de prolongaciones epiteliales utilizadas para el camuflaje.

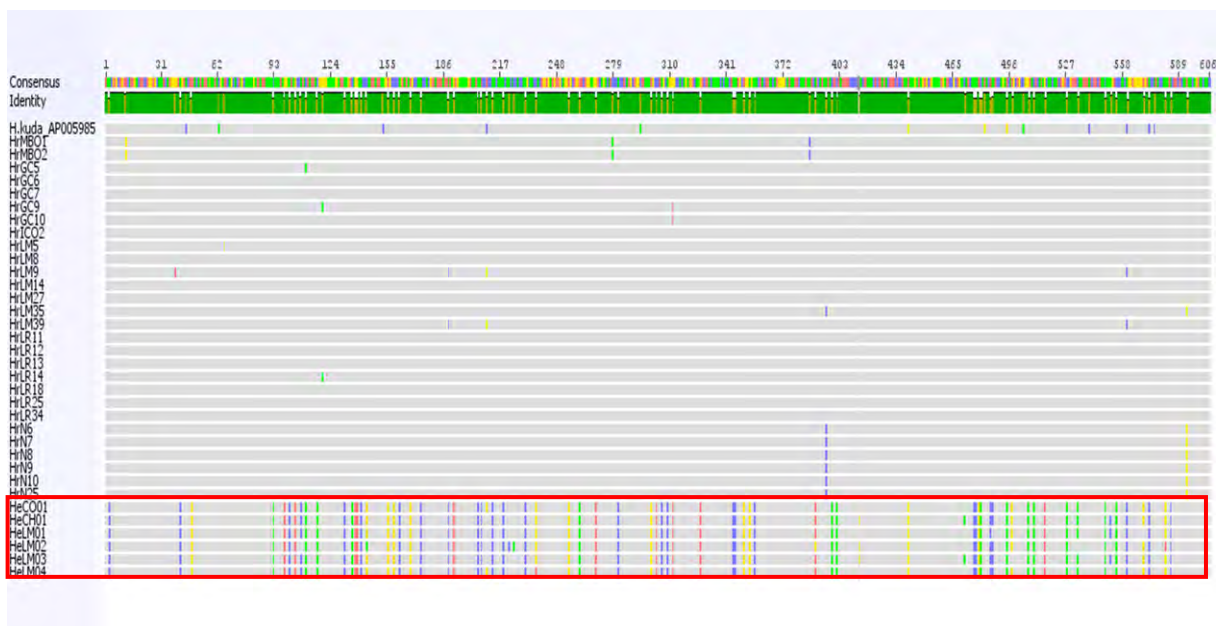
## 4.2.- Diferenciación Molecular de las Especies

### 4.2.1.- Caracterización de los Marcadores Moleculares:

Fueron creadas tres bases de datos a partir de 35 secuencias de los genes mitocondriales Citocromo Oxidasa I, Citocromo B y la partición COI+CYTB obtenidas a partir de 28 ejemplares de la especie *Hippocampus reidi*, seleccionados al azar de cada una de las localidades objeto de estudio, identificados previamente en función de las características merísticas, morfométricas y morfológicas; 6 ejemplares identificados preliminarmente como *H. erectus* y la secuencia de un individuo de *Hippocampus kuda* empleada como referencia.

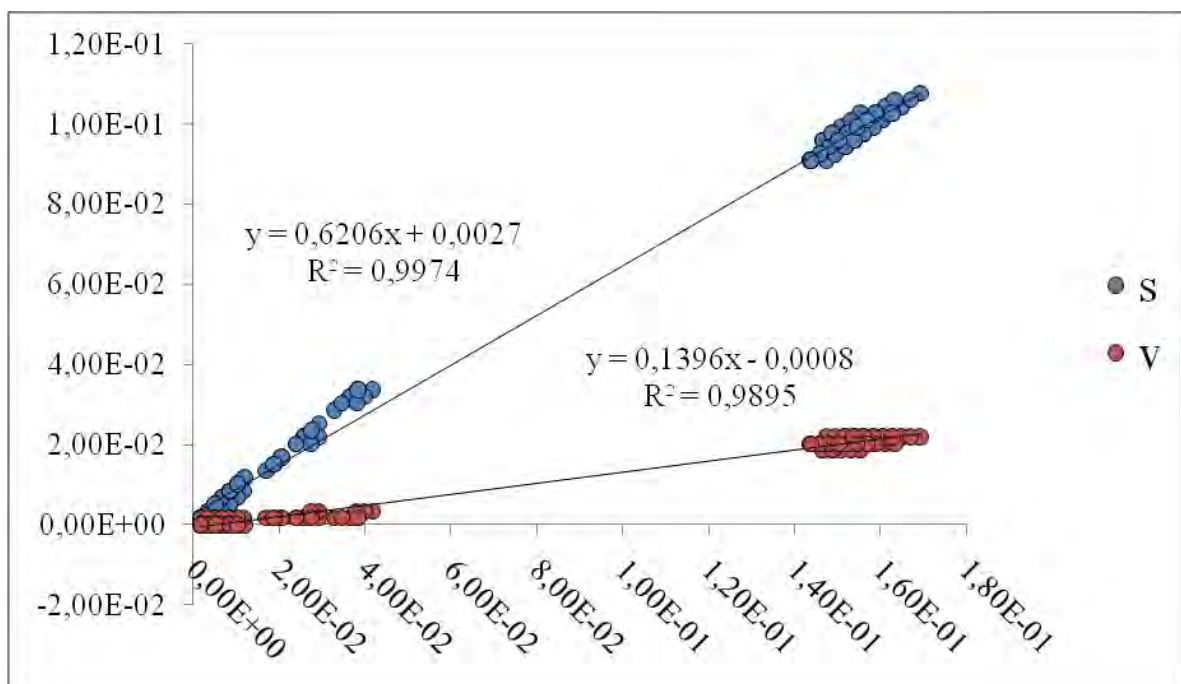
#### 4.2.1.1.- Citocromo Oxidasa I (COI):

La revisión y edición manual de los fragmentos secuenciados permitió realizar el alineamiento de un fragmento homólogo de 606 pb para este gen (Figura 16), localizadas desde la base 109 hasta la base 714, con respecto a la secuencia completa del gen Citocromo Oxidasa I de la especie *Hippocampus kuda*.



**Figura 16.- Alineamiento de las 35 secuencias del gen Citocromo Oxidasa I provenientes de los ejemplares del género *Hippocampus* .**

De las 606 pb analizadas se encontró que 516 correspondieron a sitios conservados, 90 a sitios polimórficos, 78 fueron sitios parsimoniosamente informativos y 12 portadores de mutaciones únicas (*Singleton*). El modelo de sustitución nucleotídica al que mejor se ajustaron los datos fue el HKY+G con un valor del parámetro de distribución Gamma de 0,1172. Encontrándose una proporción transición/transversión R de 11,01. La composición media de bases para este gen fue de 26,17 % Adenina (A), 23,20 % Citosina (C), 17,37 % Guanina (G) y 33,26 % Timina (T). La diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) estimada fue de  $0,0373 \pm 0,0095$ . El análisis gráfico realizado de las tasas de transiciones y transversiones *vs.* la distancia genética *F84* se presenta en la Figura 17, del valor de  $R^2$  se concluye un buen ajuste al modelo lineal en ambas, lo que permite deducir la inexistencia de saturaciones, por lo que serán utilizadas en conjunto para la realización de las inferencias filogenéticas.

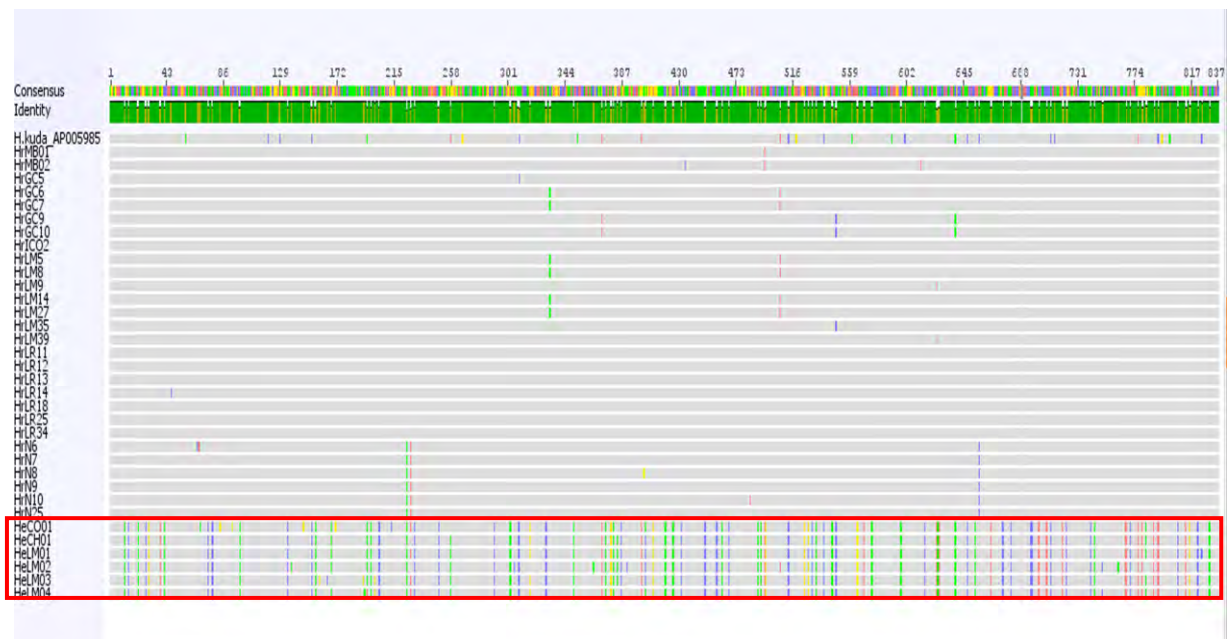


**Figura 17.- Gráfica de las tasas de transiciones y transversiones del gen COI (606 pb) versus la divergencia genética utilizando el modelo de distancia *F84*.**

La realización de las pruebas D de Tajima,  $D^*$  y  $F^*$  de Fu & Li no detectó desvíos significativos del modelo de evolución nucleotídica neutral obteniéndose en todos los casos valores de probabilidad superiores a 0,10. Las distancias genéticas ( $p$ ) entre pares de secuencias obtenidas a partir del gen Citocromo Oxidasa I son presentadas en el Anexo 1. Del análisis de la matriz de distancias genéticas y utilizando como secuencia de referencia aquella perteneciente a *Hippocampus kuda*, se observa que para el gen Citocromo Oxidasa I se obtuvo una distancia  $d = 0,023 \pm 0,006$  para *Hippocampus reidi* y  $d = 0,123 \pm 0,013$  para *Hippocampus erectus*; mientras que entre estas dos últimas especies se observó una distancia  $d = 0,115 \pm 0,012$ . Las distancias intraespecíficas encontradas oscilaron entre  $0,003 \pm 0,001$  y  $0,010 \pm 0,002$  para *H. reidi* y *H. erectus*, respectivamente.

#### 4.2.1.2.- Citocromo B (CYT B):

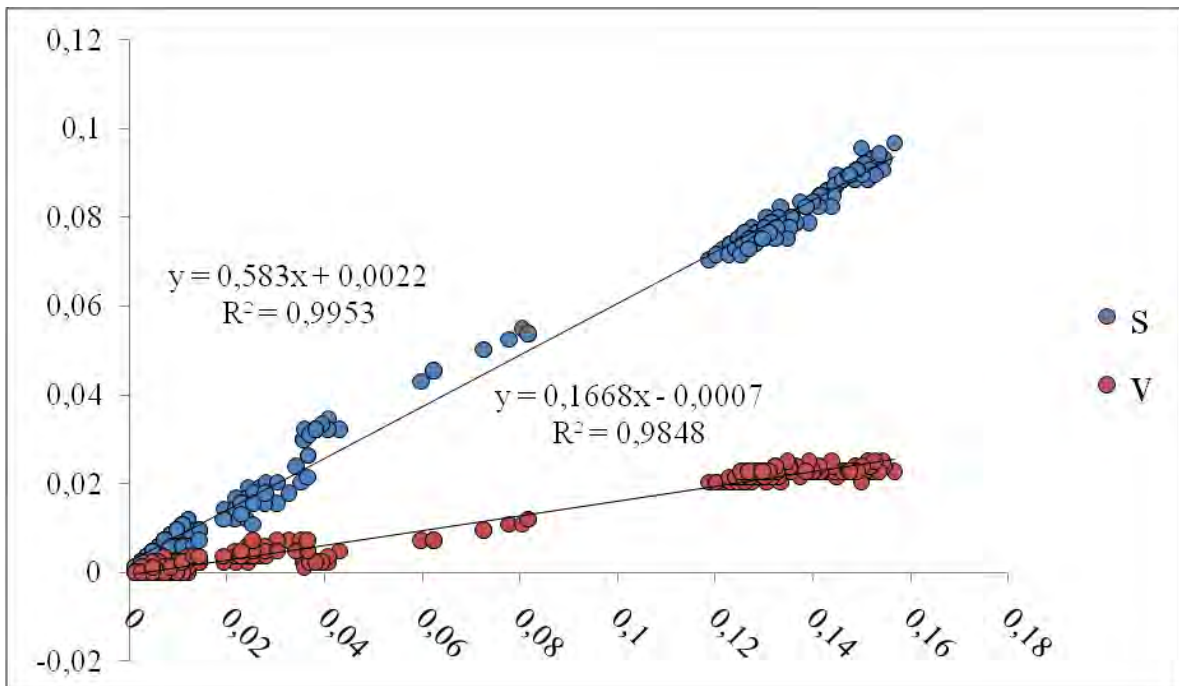
Para este gen, la revisión y edición manual de los fragmentos secuenciados permitió obtener el alineamiento de un fragmento homólogo de 837 pb (Figura 18), localizadas desde la base 87 hasta la 921, con respecto a la secuencia completa del gen Citocromo B de la especie *Hippocampus kuda*.



**Figura 18.- Alineamiento de las 35 secuencias del gen Citocromo B provenientes de los ejemplares del género *Hippocampus*.**



De las 837 pb analizadas se encontró que 705 correspondieron a sitios conservados, 132 a sitios polimórficos, 98 fueron sitios informativos para análisis basados en parsimonia y 34 portadores de mutaciones únicas (*Singleton*). El modelo de sustitución nucleotídica al que mejor se ajustaron los datos fue el HKY+G y el valor del parámetro de distribución Gamma fue de 0,2198. Encontrándose una proporción transición/transversión R de 4,58. La composición media de bases para este gen fue de 28,30 % Adenina (A), 25,87 % Citosina (C), 14,52 % de Guanina (G) y 31,30 % de Timina (T) La diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) estimada fue de  $0,0336 \pm 0,0093$ . El análisis gráfico realizado de las tasas de transiciones y transversiones *vs.* la distancia genética *F84* (Figura 19), permite deducir la inexistencia de saturaciones, de manera que ambos tipos de mutaciones se emplearon en los análisis.



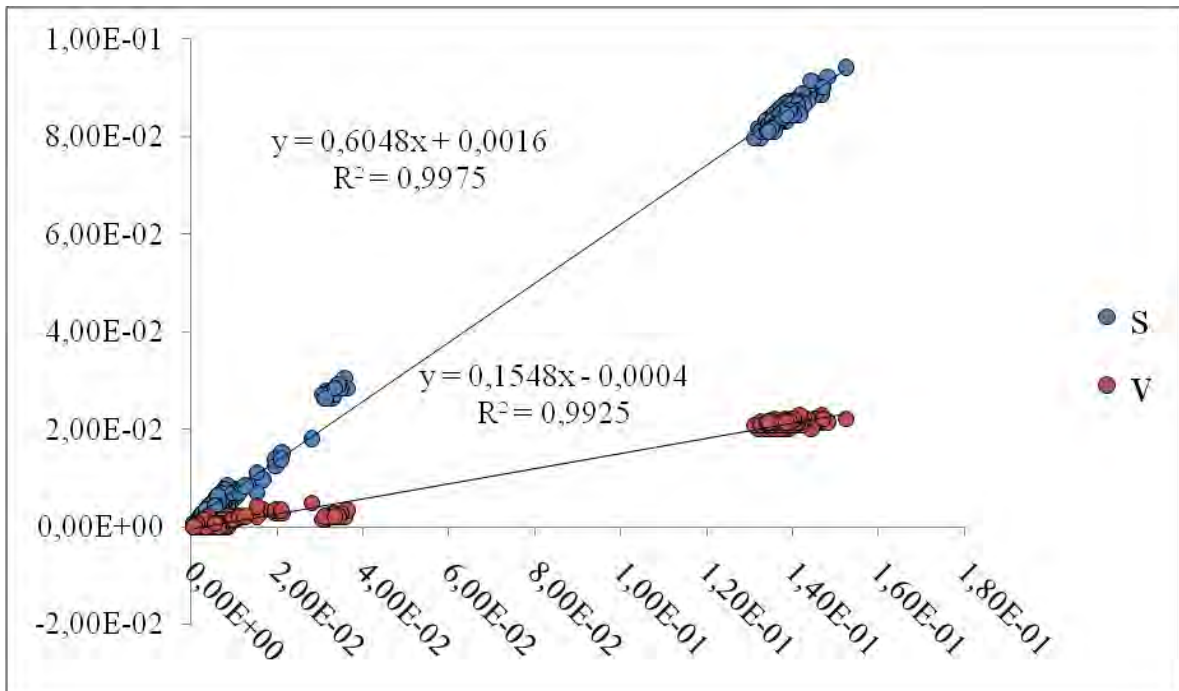
**Figura 19.- Gráfica de las tasas de transiciones y transversiones del gen CYT B (837 pb) versus la divergencia genética utilizando el modelo de distancia *F84***

La realización de las pruebas D de Tajima y  $D^*$  y  $F^*$  de Fu & Li no permitió detectar desvíos significativos del modelo de evolución nucleotídica neutral obteniéndose en todos los casos valores de probabilidad  $p > 0,10$ . Las distancias genéticas ( $p$ ) entre pares de secuencias obtenidas a partir del gen Citocromo B son presentadas en el Anexo 2. Del análisis de la matriz de distancias genéticas para el gen Citocromo B, se observa que se obtuvo una distancia  $d = 0,034 \pm 0,006$  para *Hippocampus reidi* y  $d = 0,117 \pm 0,011$  para *Hippocampus erectus* con respecto a la secuencia de *Hippocampus kuda*, mientras que entre *H. erectus* y *H. reidi* se observó una distancia  $d = 0,112 \pm 0,011$ . Para este gen las distancias intraespecíficas encontradas oscilaron entre  $0,004 \pm 0,001$  y  $0,013 \pm 0,002$  para *H. reidi* y *H. erectus*, respectivamente.

#### **4.2.1.3.- Partición COI+CYTB:**

La organización conjunta y secuencial de la información proveniente de los genes Citocromo Oxidasa I y Citocromo B secuenciados a partir de los mismos 35 ejemplares, permitió la construcción de una matriz o partición conteniente de 1443 pb, de las cuales se encontró que 1221 correspondieron a sitios conservados, 222 a sitios polimórficos, 176 fueron sitios parsimoniosamente informativos y 46 portadores de mutaciones únicas (*Singleton*). El modelo de sustitución nucleotídica al que mejor se ajustaron los datos de esta partición fue el HKY+G, con un valor obtenido para el parámetro de distribución Gamma de 0,1713. La proporción transición/transversión R fue de 6,00.

La composición media de bases para esta partición fue de 27,22 % Adenina (A), 24,92 % Citosina (C), 15,74 % Guanina (G) y 32,13 % Timina (T), siendo la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) estimada de  $0,0352 \pm 0,0094$ . El análisis gráfico realizado de las tasas de transiciones y transversiones *vs.* la distancia genética  $F84$  (Figura 20), permite deducir la inexistencia de saturaciones, de manera que ambos tipos de mutaciones fueron empleados en los análisis.



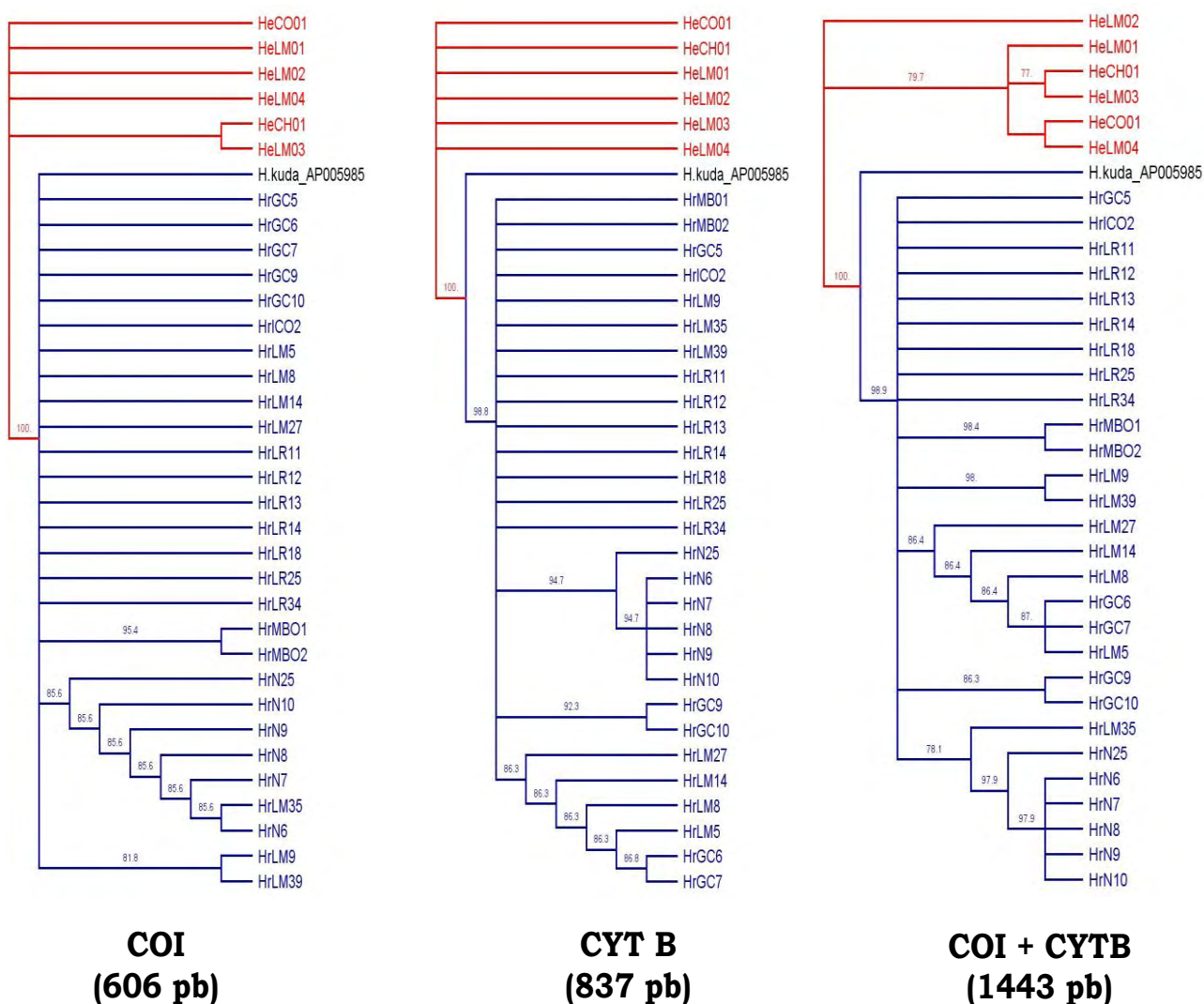
**Figura 20.- Gráfica de las tasas de transiciones y transversiones de los segmentos concatenados de los genes COI + CYT B (1443 pb) amplificados versus la divergencia genética utilizando el modelo de distancia F84.**

La realización de las pruebas D de Tajima y  $D^*$  y  $F^*$  de Fu & Li no mostraron desvíos significativos del modelo de evolución nucleotídica neutral obteniéndose en todos los casos valores de probabilidad  $p > 0,10$ . Las distancias genéticas ( $p$ ) entre pares de secuencias obtenidas a partir de la partición COI+CYTB son presentadas en el Anexo 3. El análisis de la matriz de distancias genéticas de la partición “COI+CYTB” permitió detectar distancias  $d = 0,029 \pm 0,004$  para *Hippocampus reidi* y  $d = 0,120 \pm 0,008$  para *Hippocampus erectus* con respecto a *H. kuda*; entre *H. erectus* y *H. reidi* se observó una distancia  $d = 0,106 \pm 0,008$ . Mientras que las distancias intraespecíficas oscilaron entre  $0,004 \pm 0,001$  y  $0,012 \pm 0,002$  para *H. reidi* y *H. erectus*, respectivamente.

#### 4.2.2.- Análisis Filogenético:

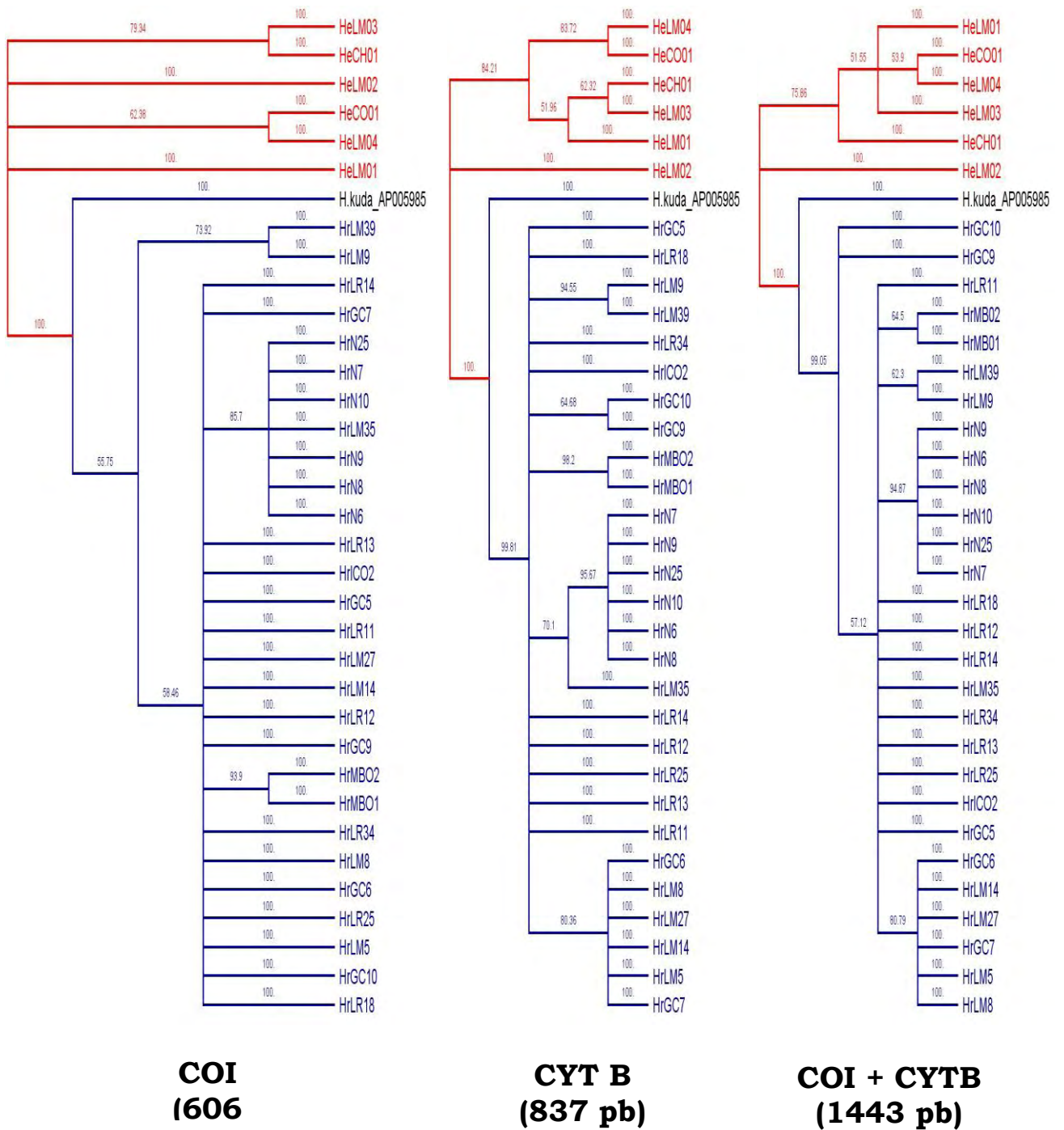
En las Figuras 21, 22 y 23 se presentan los árboles filogenéticos contruidos mediante los tres diferentes métodos de inferencia filogenética empleados.

##### 4.2.2.1.- Método de Neighbour - Joining:



**Figura 21.- Árboles filogenéticos de los fragmentos secuenciados de los genes Citocromo Oxidasa I, Citocromo B y la partición conjunta COI+CYTB, obtenidos mediante el método de Neighbour – Joining.**

#### 4.2.2.2.- Método de Máxima Parsimonia:

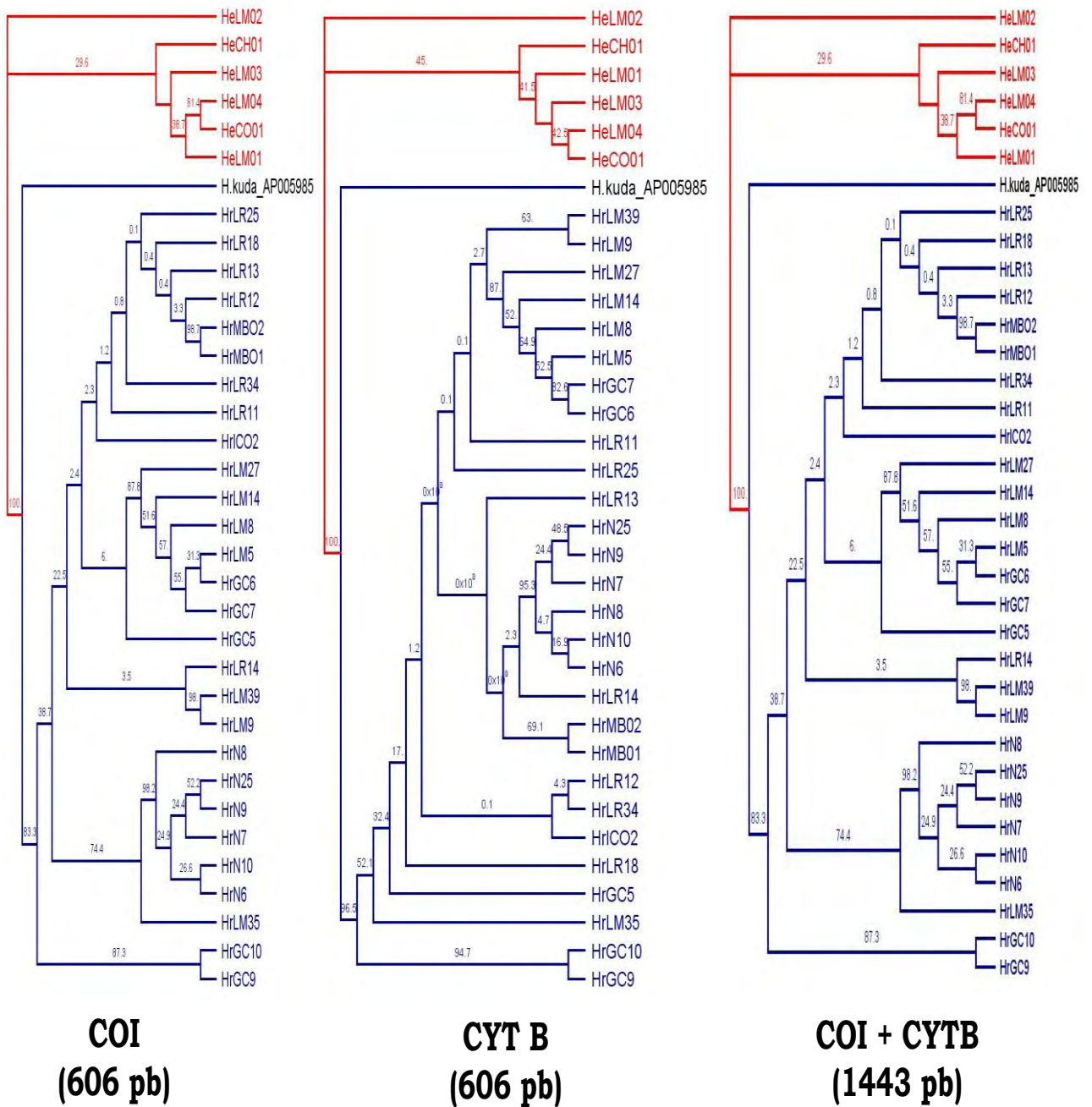


*Hippocampus erectus*

*Hippocampus reidi*

Figura 22.- Árboles filogenéticos de los fragmentos secuenciados de los genes COI, Citocromo B y la partición COI+CYT B, obtenidos mediante el método de Máxima Parsimonia.

#### 4.2.2.3.- Método de Máxima Probabilidad:



*Hippocampus erectus*

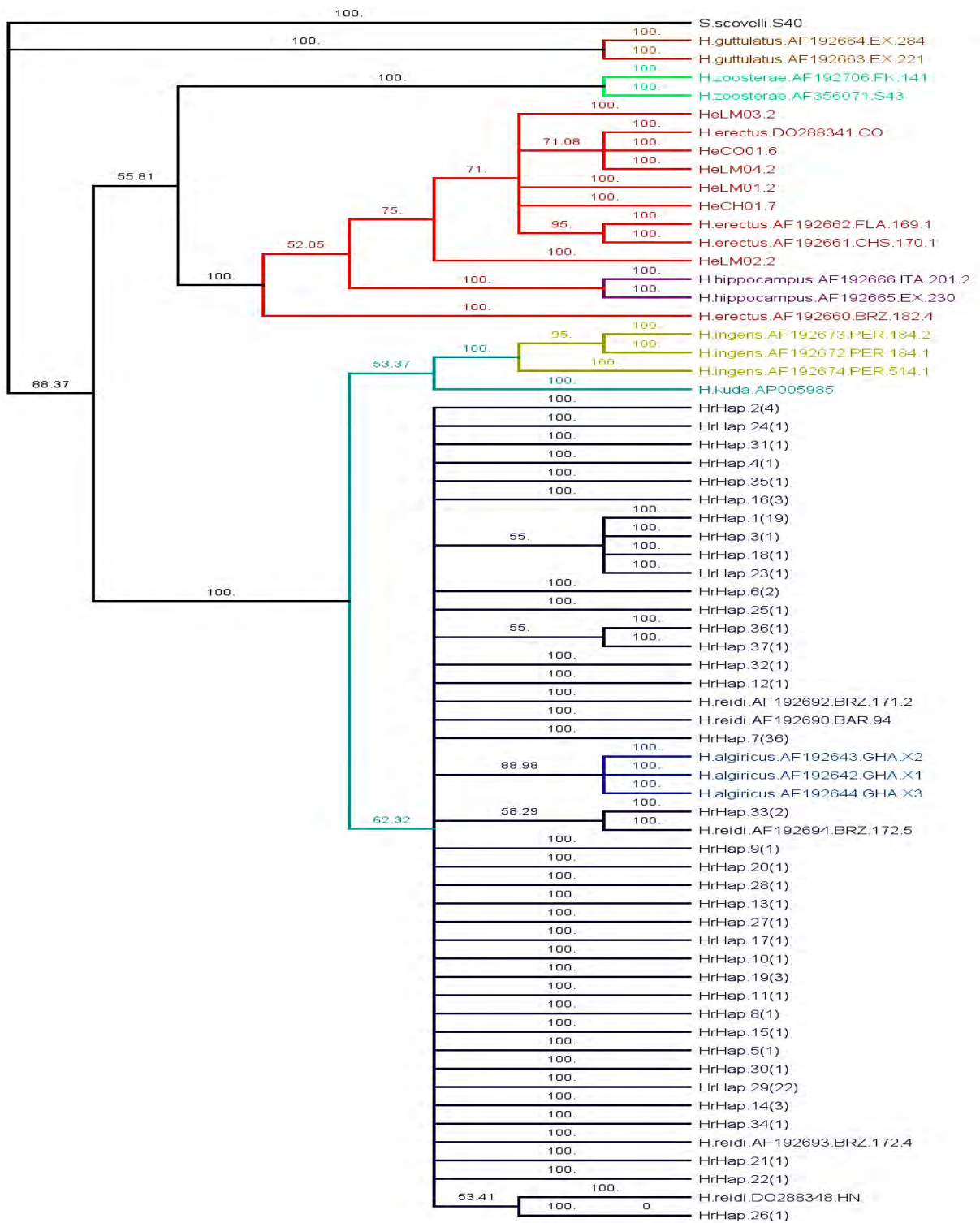
*Hippocampus reidi*

**Figura 23.- Árboles filogenéticos de los fragmentos secuenciados de los genes Citocromo Oxidasa I, Citocromo B y la partición conjunta COI + CYT B, obtenidos mediante el método de Máxima Probabilidad.**

Con base en las Figuras 21, 22 y 23, se puede señalar que fue encontrada una marcada similitud entre todas las topologías evaluadas, con los métodos de inferencia utilizados, lográndose diferenciar claramente las entidades taxonómicas identificadas *a priori* mediante la utilización de las características merísticas, morfométricas y morfológicas seleccionadas, revelándose la utilidad de los genes Citocromo Oxidasa I y Citocromo B, como marcadores moleculares útiles para la identificación de las especies del género *Hippocampus* que se encuentran en las costas de Venezuela.

Así mismo, fue posible evidenciar en todos los casos que las muestras provenientes de la localidad de Natal, se encontraron siempre relacionadas, bajo un mismo nodo con elevados valores de bootstrap, lo que podría sugerir cierta evidencia de diferenciación entre las poblaciones del Caribe y las del Atlántico Sur Occidental.

Dado que ambos marcadores moleculares permitieron la clara separación de las entidades taxonómicas analizadas y con la finalidad de verificar la identidad de los ejemplares a utilizarse en los análisis poblacionales, así como para poder realizar una mejor descripción de las especies y proceder a la elaboración de una clave taxonómica que facilite la identificación de las mismas, se procedió a construir un árbol filogenético mediante el método de Máxima Parsimonia con base en las secuencias del gen Citocromo B de los 128 ejemplares de los que se poseía tejido (43 haplotipos), conjuntamente con secuencias obtenidas del Genbank del mismo segmento secuenciado de ejemplares pertenecientes a las demás especies que se distribuyen en el océano Atlántico y/o áreas cercanas: *Hippocampus reidi* (n=5), *H. erectus* (n=4), *H. hippocampus* (n=2), *H. zosterae* (n=2), *H. guttulatus* (n=2), *H. algiricus* (n=3), *H. ingens* (n=3) y *H. kuda* (n=1), utilizando como outgroup una secuencia de *Syngnathus scovelli* (n=1) (Figura 24), lo cual permitió confirmar que efectivamente los ejemplares analizados pertenecían a las especies *Hippocampus reidi* e *Hippocampus erectus*.



**Figura 24.- Árbol filogenético de los haplotipos de *Hippocampus reidi* obtenidos mediante el método de Máxima Parsimonia con base en las secuencias del gen Citocromo B.**



#### 4.2.3.- Descripción de las Especies Estudiadas:

***Hippocampus reidi*** Ginsburg, 1933 (Figura 25)

**Nombres comunes:** Caballito de Mar (Español), Cavalho Marinho (Portugués), Slender Seahorse (Inglés), Longsnout Seahorse (Inglés).

**Sinonimias:** *Hippocampus longirostris* Kaup, 1856, *Hippocampus guttulatus* Goode 1877, *Hippocampus punctulatus* Starks 1913, *Hippocampus obtusus* Ginsburg 1933, *Hippocampus poeyi* Howell Rivero, 1934, *Hippocampus hudsonius punctulatus* Ginsburg, 1937.

**Material examinado:** se evaluaron un total de 138 ejemplares provenientes de las lagunas litorales de la Restinga (n=37) y las Marites (n=48) en la Isla de Margarita, el Golfo de Cariaco (n=19), el Golfo de Venezuela (n=2), la Isla de Coche (n=2), y la localidad de Natal, Brasil (n=30). Adicionalmente, se revisaron 6 ejemplares identificados como pertenecientes a esta especie, depositados en la colección ictiológica del Museo Nacional de Historia Natural del Instituto Smithsonian de Washington, catalogados como *Hippocampus reidi* USNM 86590 **Holotipo**, USNM 223673 **Paratipo**, USNM 360235, USNM 223638, USNM 131966 y USNM 170352.



**Figura 25.- Ejemplares pertenecientes a la especie *Hippocampus reidi* identificados mediante los métodos convencionales y moleculares empleados en el presente estudio**

**Características:** 11 anillos en el tronco, de los cuales el 1°, 4° y 7° son prominentes en vista dorsal habitualmente. 32 a 37 anillos en la cola, generalmente 35. Aleta dorsal ubicada sobre 3 anillos, 2 del tronco y 1 de la cola. 16 a 18 radios en la aleta dorsal, frecuentemente 17. Aleta pectoral con 16 a 18 radios blandos, generalmente 17. Aleta anal con 4 radios blandos. Espina supraocular comúnmente bicúspide, cuando es unicúspide se presenta como una protuberancia no puntiaguda. Con 1 o 2 espinas en la mejilla, generalmente 1. Rostro largo, entre 1,9 y 2,7 la longitud de la cabeza. Coroneta baja y poco prominente, su altura está comprendida entre 2,2 y 6,4 veces la altura de la cabeza. Perfil ventral de la región torácica ligeramente convexa, tronco proporcionalmente delgado en los ejemplares adultos. El ancho del tronco entre el 9° y 10° anillos está comprendido entre 2,1 y 4,1 veces la longitud del tronco. Coloración marcadamente variable, encontrándose individuos blancos, negros, rojos, amarillos y naranja, sin líneas a los lados de la cabeza y el cuerpo. Generalmente presentan muchos puntos negros distribuidos a lo largo del cuerpo, los cuales pueden ocultarse entre las diversas tonalidades y patrones de coloración.

***Hippocampus erectus*** Perry 1810 (Figura 26)

**Nombres comunes:** Caballito de Mar (Español), Cavalho Marinho (Portugués), Northern Seahorse (Inglés), Lined Seahorse (Inglés).

**Sinonimias:** *Hippocampus hudsonius* De Kay, 1842, *Hippocampus punctulatus* Guichenot, 1853, *Hippocampus marginalis* Kaup, 1856, *Hippocampus fascicularis* Kaup, 1856, *Hippocampus laevicaudatus* Kaup, 1856, *Hippocampus brevirostris* Knight, 1866, *Hippocampus guttulatus* Günther, 1876, *Hippocampus villosus* Günther, 1876, *Hippocampus antiquorum* Goode, 1877, *Hippocampus stylifer* Jordan & Gilbert, 1882, *Hippocampus kincaidi* Townsend & Barbour, 1906, *Hippocampus brunneus* Bean, 1907, *Hippocampus hudsonius hudsonius* Ginsburg, 1937, *Hippocampus hudsonius punctulatus* Ginsburg, 1937, *Hippocampus hudsonius kincaidi* Ginsburg, 1937, *Hippocampus erectus hudsonius* Briggs,

1958, *Hippocampus erectus erectus* Briggs, 1958.

**Material examinado:** se evaluaron un total de 8 ejemplares, seis provenientes de la laguna litoral de las Marites en la Isla de Margarita, uno de la Isla de Coche y uno de Chacopata. Adicionalmente, se revisaron 8 ejemplares identificados como pertenecientes a esta especie, depositados en la colección ictiológica del Museo Nacional de Historia Natural del Instituto Smithsonian de Washington, catalogados como *Hippocampus erectus* USNM 45103, USNM 383949, USNM 045104, USNM 081727, USNM 13110, USNM 94091, USNM 92735 y USNM 223096.



**Figura 26.- Ejemplares pertenecientes a la especie *Hippocampus erectus* identificados mediante los métodos convencionales y moleculares empleados en el presente estudio**

**Características:** 11 anillos en el tronco, de los cuales el 1°, 3° y 5° son prominentes en vista dorsal. 35 a 38 anillos en la cola, generalmente 36. Aleta dorsal ubicada sobre 3 anillos, 2 del tronco y 1 de la cola. 16 a 18 radios en la aleta dorsal, generalmente 18. Aleta pectoral con 16 radios blandos. Aleta anal con 4 radios blandos. Espina supraocular bien diferenciada, generalmente unicúspide y puntiaguda. Con una espina en la mejilla. Rostro corto, entre 2,7 y 3,2 veces la longitud de la cabeza. Coroneta alta y prominente, su altura está comprendida entre 1,7 y 2,9 veces la altura de la cabeza. Perfil ventral de la región torácica marcadamente convexa, tronco ancho y robusto en los ejemplares adultos. El ancho del tronco entre

el 9° y 10° anillos está comprendido entre 1,6 y 2,8 veces la longitud del tronco. Coloración marcadamente variable, encontrándose individuos marrones, negros, beige, amarillos y rojizos, generalmente con líneas blancas o marrones a los lados de la cabeza y el cuerpo, dependiendo de la coloración general del cuerpo.

**Clave de Identificación para las Especies del Género *Hippocampus*  
del Océano Atlántico Occidental**

1a.- Entre 10 a 13 radios en la aleta dorsal y entre 10 y 13 radios en la aleta pectoral..... ***Hippocampus zosterae***

1b.- Entre 16 y 20 radios en la aleta dorsal y entre 14 y 18 radios en la aleta pectoral..... **2**

2a.- Relación longitud de la cabeza/longitud del rostro (HL/SnL) entre 1,9 y 2,7, con un valor promedio de 2,2. Anillos 1°, 4° y 7° del tronco prominentes en vista dorsal. Perfil frontal de la región torácica ligeramente convexo. Coroneta baja, poco prominente. Espina supraocular generalmente bicúspide, no puntiaguda..... ***Hippocampus reidi***

2b.- Relación longitud de la cabeza/longitud del rostro (HL/SnL) entre 2,7 y 3,2 con un valor promedio de 2,9. Anillos 1°, 3° y 5° del tronco prominentes en vista dorsal. Perfil frontal de la región torácica marcadamente convexo. Coroneta alta y prominente. Con 1 espina supraocular claramente diferenciada y puntiaguda..... ***Hippocampus erectus***

### 4.3.- Diversidad y Estructura Genética Poblacional:

#### 4.3.1.- Diversidad Nucleotídica y Haplotípica:

Fueron detectados un total de 37 haplotipos (Anexo 4) en las 122 muestras de *Hippocampus reidi*, portadores de 48 sitios polimórficos y 30 sitios con mutaciones únicas (*Singleton*). La diversidad nucleotídica para la totalidad de la muestra fue de  $0,004 \pm 0,001$ , mientras que la diversidad haplotípica general fue de  $0,858 \pm 0,021$ . En la Tabla 6 se presentan las características moleculares de los fragmentos secuenciados del gen Citocromo B y los correspondientes índices de diversidad nucleotídica y haplotípica por localidad de muestreo.

**Tabla 6.- Características moleculares de las secuencias de Citocromo B de *Hippocampus reidi* e índices de diversidad nucleotídica y haplotípica por localidad de muestreo y en total**

CARACTERÍSTICA	POBLACION					
	GVZ	GC	LR	LM	NATAL	Total
Número de Secuencias	2	19	38	32	31	122
Número total de sitios	837	837	837	837	837	837
Número de Sitios Polimorficos (S)	2	20	9	19	11	48
Número Total de Mutaciones (Eta)	2	21	9	19	11	49
Número Total de Mutaciones (Singleton )	2	14	7	12	10	30
Número promedio de diferencias nucleotídicas ( $p$ )	2,000	3,515	0,573	2,833	0,770	2,966
Diversidad Nucleotídica ( $\pi \pm S.D$ )	$0,0023 \pm 0,0012$	$0,0042 \pm 0,0004$	$0,0006 \pm 0,0003$	$0,0034 \pm 0,0004$	$0,0009 \pm 0,0003$	$0,0035 \pm 0,0002$
Número de Haplotipos (k)	2	13	6	13	9	37
Diversidad Haplotípica ( $h \pm S.D$ )	$1,000 \pm 0,500$	$0,942 \pm 0,037$	$0,293 \pm 0,096$	$0,823 \pm 0,062$	$0,501 \pm 0,110$	$0,858 \pm 0,021$
Tajima's D	?	-1,603 <sup>NS</sup>	-2,162 *	-1,367 <sup>NS</sup>	-2,302 *	-2,096 *
Fu & Li's D* test statistic	?	-1,919 <sup>NS</sup>	-2,969 *	-2,373 <sup>NS</sup>	-3,620 *	-5,016 *
Fu & Li's F* test statistic	?	-2,118 <sup>NS</sup>	-3,185 *	-2,412 <sup>NS</sup>	-3,760 *	-4,564 *

? = Datos no determinados por el pequeño tamaño de la muestra.

\* = Valores significativos a un nivel de confianza  $P < 0,05$ .

<sup>NS</sup> = Valores No Significativos  $P > 0,05$

Los valores de diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) oscilaron entre  $0,0006 \pm 0,0003$  para la localidad de la Restinga y  $0,0042 \pm 0,0004$  para el Golfo de Cariaco. La mayor diversidad de haplotipos se registró en el Golfo de Cariaco, con un valor de  $0,942 \pm 0,003$ , sin considerar la diversidad haplotípica de la localidad del Golfo de Venezuela, que presentó el máximo valor posible debido a la poca representatividad de la muestra; mientras que el menor valor  $0,293 \pm 0,096$  fue encontrado en la localidad de la Laguna de la Restinga, evidenciándose amplias diferencias inter poblacionales.

Las localidades donde se detectaron el mayor número de haplotipos fueron la Laguna de las Marites y el Golfo de Cariaco, con 13 haplotipos cada una, seguidas de la localidad de Natal, donde se detectaron 9 haplotipos y la Laguna de la Restinga donde fueron registrados 6 haplotipos. Las únicas dos muestras que se pudo obtener de la localidad del Golfo de Venezuela presentaron 2 haplotipos diferentes.

La distribución porcentual de los haplotipos encontrados por localidad es presentada en Tabla 7, donde se puede evidenciar que de la totalidad de los haplotipos encontrados solo 3 (8,10 %) fueron comunes entre las localidades de muestreo (HAP 01, HAP 02 y HAP 07). El haplotipo 1 fue dominante en la localidad de la Laguna de las Marites encontrándose representado por 13 individuos que corresponden al 68,4% de la totalidad de los individuos portadores del mismo, este haplotipo también estuvo representado en las localidades del Golfo de Cariaco ( $n=4$ ) con un 21,1% y la Laguna de la Restinga ( $n=2$ ) con un 10,5%. El haplotipo 2 se encontró representado por 4 individuos en la totalidad de la muestra, estando principalmente representado en el Golfo de Cariaco con un 75 % y en la Laguna de las Marites con un 25 %. Mientras que el haplotipo 07 se encontró representado en todas las localidades de muestreo ( $n=36$ ), con la excepción de la localidad del Golfo de Venezuela, presentando una representación porcentual por localidad del 88,9 % para la Laguna de la Restinga ( $n=32$ ), 5,6 % en la Laguna de las Marites ( $n=2$ ) y 2,8 % en las localidades del Golfo de Cariaco y en Natal, con un solo individuo para cada

una de estas localidades.

Los haplotipos encontrados en las muestras del Golfo de Venezuela fueron únicos para esta localidad. De igual manera, se evidenció la existencia de varios haplotipos únicos en cada una de las localidades de muestreo, encontrándose 10 haplotipos únicos para la localidad del Golfo de Cariaco, 10 para la Laguna de las Marites, 8 para la localidad de Natal y 4 para la localidad de la Laguna de la Restinga.

**Tabla 7.-Distribución porcentual de los haplotipos del gen Citocromo B de *Hippocampus reidi* por localidad.**

HAPLOTIPOS	N°	% GC	% LM	% LR	% NA	% MBO
HAP 01	19	21,1	68,4	10,5	0,0	0,0
HAP 02	4	75,0	25,0	0,0	0,0	0,0
HAP 03	1	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
HAP 04	1	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
HAP 05	1	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
HAP 06	2	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
HAP 07	36	2,8	5,6	88,9	2,8	0,0
HAP 08	1	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
HAP 09	1	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
HAP 10	1	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
HAP 11	1	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
HAP 12	1	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
HAP 13	1	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
HAP 14	3	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
HAP 15	1	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
HAP 16	3	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
HAP 17	1	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
HAP 18	1	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
HAP 19	3	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
HAP 20	1	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
HAP 21	1	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
HAP 22	1	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
HAP 23	1	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
HAP 24	1	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0
HAP 25	1	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0
HAP 26	1	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0
HAP 27	1	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0
HAP 28	1	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0
HAP 29	22	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0
HAP 30	1	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0
HAP 31	1	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0
HAP 32	1	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0
HAP 33	2	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0
HAP 34	1	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0
HAP 35	1	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0
HAP 36	1	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
HAP 37	1	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0

Los diferentes haplotipos encontrados en el presente estudio y sus correspondientes sitios polimórficos son presentados en la Tabla 8.





#### 4.3.2.- Análisis de Varianza Molecular:

La realización del análisis de varianza molecular (AMOVA) para someter a prueba la hipótesis a escala micro geográfica de estructuración genética de la población de *Hippocampus reidi* de las costas de Venezuela, en poblaciones continentales y poblaciones insulares permitió encontrar evidencias significativas de que el 90,89 % de la variación genética es explicada por diferencias dentro de las poblaciones y el 21,21 % por diferencias entre las poblaciones dentro de los grupos, sin embargo no se encontraron evidencias significativas para sustentar la hipótesis de estructuración genética geográfica entre grupos de Poblaciones continentales *vs.* Poblaciones insulares, hallándose que el porcentaje de variación de los datos que se explica a este nivel arroja valores negativos (Tabla 9).

**Tabla 9.- Análisis de varianza molecular (AMOVA) para probar la hipótesis de estructuración geográfica de los haplotipos de *Hippocampus reidi* entre las localidades continentales e insulares de las costas de Venezuela.**

Fuente de Variación	D.F	Suma de Cuadrados	Componentes de la Varianza	Porcentaje de Variación
Entre Grupos	1	1,721	-0,133 Va	-12,10
Entre Poblaciones dentro de Grupos	2	10,971	0,234Vb	21,21
Dentro de Poblaciones	87	87,143	1,002Vc	90,89
<b>Total</b>	<b>90</b>	<b>99,835</b>	<b>1,1020</b>	

Indices de Fijación	Test de Significancia (20000 permutaciones)
FSC: 0,189	Va & FSC P = 0.000 ± 0.000
FST: 0,091	Vc & FST P = 0.000 ± 0.000
FCT: -0,121	Vb & FCT P = 1,000 ± 0,000

A escala macro geográfica, la hipótesis de estructuración genética de la población de *Hippocampus reidi*, en poblaciones del Atlántico Sur y

poblaciones del Mar Caribe Venezolano permitió detectar que el 57,03 % de la variación de los datos es explicado por diferencias entre grupos, mientras que el 35,79 % de la variación genética es explicada por diferencias dentro de las poblaciones y el 7,18 % por diferencias entre las poblaciones dentro de los grupos. Sin embargo, no fue posible demostrar estadísticamente la significancia de las diferencias entre los grupos del Atlántico Sur *vs.* Poblaciones del Mar Caribe venezolano (Tabla 10).

**Tabla 10.- Análisis de varianza molecular (AMOVA) para probar la hipótesis de estructuración geográfica de los haplotipos de *Hippocampus reidi* entre las localidades del Atlántico Sur y el Mar Caribe venezolano.**

Fuente de Variación	D.F	Suma de Cuadrados	Componentes de la Varianza	Porcentaje de Variación
Entre Grupos	1	68,493	1,349 Va	57,03
Entre Poblaciones dentro de Grupos	3	12,699	0,170 Vb	7,18
Dentro de Poblaciones	117	99,035	0,846 Vc	35,79
<b>Total</b>	121	180,226	2,365	

Indíces de Fijación	Test de Significancia (20000 permutaciones)
FSC: 0,167	Va & FSC P = 0.000 ± 0.000
FST: 0,642	Vc & FST P = 0.000 ± 0.000
FCT: 0,570	Vb & FCT P = 0.200 ± 0.003

#### 4.3.3.- Comparaciones Inter - Poblacionales:

El cálculo de los índices *Fst* entre pares de localidades arrojó valores significativos para casi todos los pares de localidades sometidas a prueba (Tabla 11), con la excepción de la comparación entre la Laguna de las Marites y el Golfo de Cariaco, siendo de particular importancia las divergencias genéticas significativas detectadas entre la localidad de Natal, ubicada en el Océano Atlántico Sur y todas las demás localidades del Mar

Caribe venezolano (Laguna de las Marites , Laguna de la Restinga, Golfo de Cariaco y Golfo de Venezuela).

**Tabla 11.- Valores de *Fst* entre pares de poblaciones.**

	NA	LR	LM	GC	GVZ
NA	0,000				
LR	0,810 *	0,000			
LM	0,641 *	0,199 *	0,000		
GC	0,628 *	0,105 *	0,024 NS	0,000	
GVZ	0,836 *	0,689 *	0,315 *	0,196 *	0,000

\* = Nivel de Significancia  $p < 0,05$  NS = No Significativo

Igualmente, resultó significativa la divergencia entre las localidades ubicadas en la Isla de Margarita (Laguna de las Marites y Laguna de la Restinga), evidenciando poco intercambio genético entre esas localidades, mientras que la divergencia genética no significativa entre la localidad de la Laguna de las Marites y el Golfo de Cariaco, pudiera indicar cierto nivel de intercambio genético entre estas. La localidad del Golfo de Venezuela también presentó valores significativos de divergencia genética con respecto a todas las demás localidades. La correlación entre los valores de *Fst* entre pares de poblaciones y la distancia geográfica fue significativa (Mantel  $r=0,922$ ;  $p < 0,05$ ; 20.000 permutaciones), sugiriendo que la estructura genética de la población pudiera ser explicada por el Modelo de aislamiento por distancia. Sin embargo, la realización de esta prueba solamente con las localidades del nororiente de Venezuela, no permitió detectar correlación significativa (Mantel  $r = -0,98$ ;  $p > 0,05$ ; 20.000 permutaciones), sugiriendo que la estructura genética de esta región sería mejor explicada con base en el Modelo paso a paso (Stepping Stone).

En función de lo anterior, para estimar el nivel de intercambio genético entre las diferentes localidades en estudio, y asumiendo que dos poblaciones de tamaño  $N$  provienen de un gran pool de poblaciones que intercambian una fracción “ $M$ ” de migrantes cada generación y que la tasa de mutación “ $\mu$ ”

es negligible en comparación a la tasa de migración (Escoffier, 2006), se procedió a estimar el número de migrantes por generación entre pares de localidades, encontrándose que no existe intercambio de migrantes entre la localidad de Natal y las localidades del Mar Caribe venezolano, ni tampoco entre las localidades de la Laguna de la Restinga y el Golfo de Venezuela. Mientras que pudo constatar una situación diferente entre las localidades del Golfo de Cariaco y la Laguna de las Marites donde se encontró un valor de 20 migrantes por generación, que indicaría la existencia de cierto nivel de intercambio genético entre esas localidades y explicaría la poca diferenciación genética encontrada entre esas poblaciones (Tabla 12).

**Tabla 12.- Numero de Migrantes (Nm) por generación entre Poblaciones.**

	NA	LR	LM	GC
LR	0			
LM	0	2		
GC	0	4	20	
GVZ	0	0	1	2

En concordancia con los resultados anteriores, los resultados de la prueba exacta de diferenciación poblacional permitieron rechazar la hipótesis nula de panmixia entre casi todos los pares de localidades, con la excepción de algunas comparaciones realizadas con respecto a la localidad del Golfo de Venezuela (Tabla 13). Sin embargo, como se ha mencionado con anterioridad el bajo número de muestras procedentes de esta localidad no permite llegar a conclusiones sólidas al respecto.

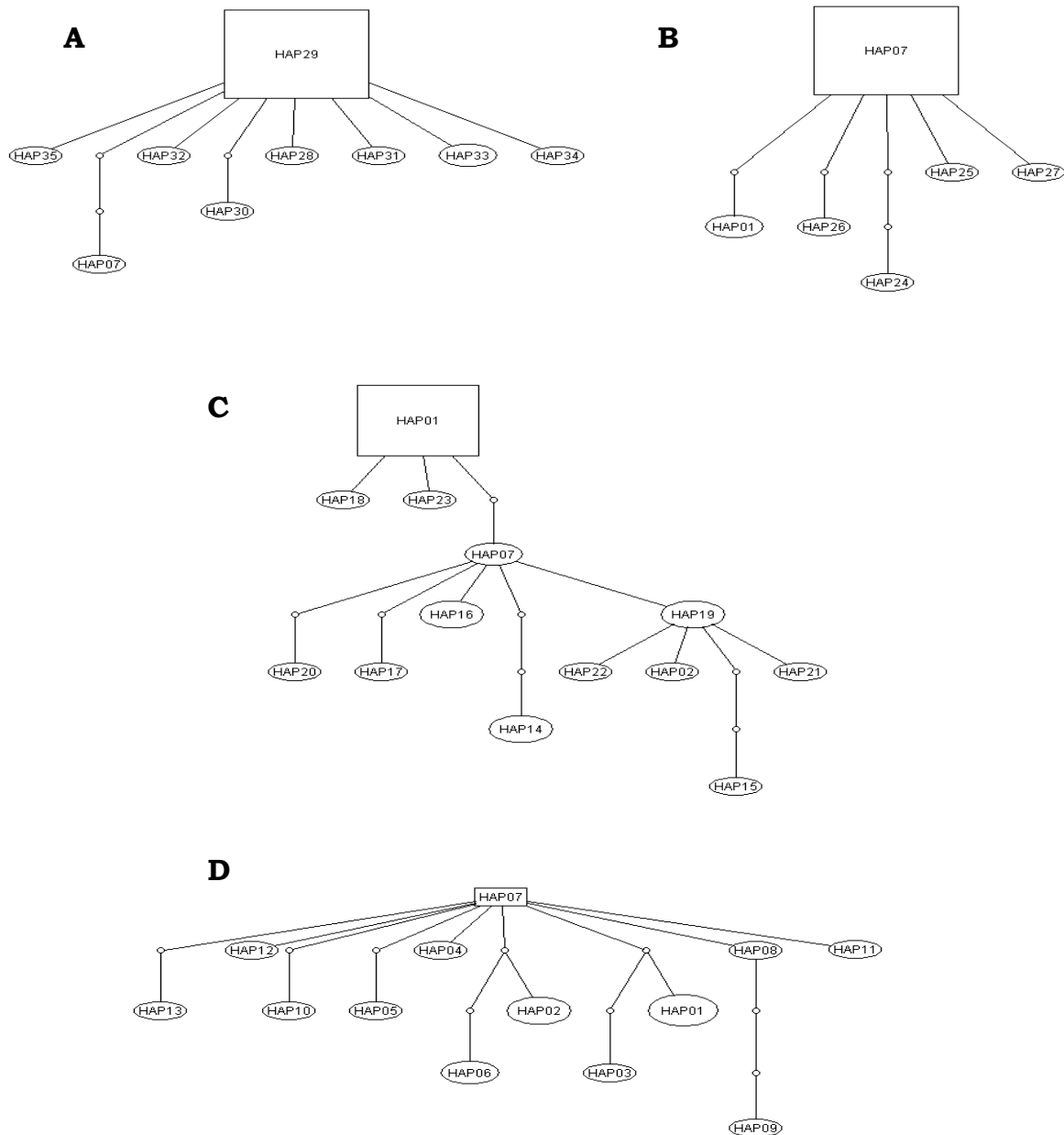
**Tabla 13.- Prueba Exacta de Diferenciación entre Poblaciones**

	NA	LR	LM	GC
NA				
LR	0,000 ± 0,000 *			
LM	0,000 ± 0,000 *	0,000 ± 0,000 *		
GC	0,000 ± 0,000 *	0,000 ± 0,000 *	0,010 ± 0,003 *	
GVZ	0,067 ± 0,007 <sup>NS</sup>	0,018 ± 0,002 *	0,081 ± 0,008 <sup>NS</sup>	0,310 ± 0,010 <sup>NS</sup>

**Nota:** Longitud de la cadena de Markov 10.000 pasos

#### 4.3.4.- Inferencia Demográfica:

En la Figura 27 se presentan las redes de haplotipos para cada una de las localidades. Los cuadros representan los haplotipos ancestrales y los óvalos los haplotipos derivados, mientras que los círculos de menor tamaño representan haplotipos no presentes en la muestra.



A) Natal, Brasil

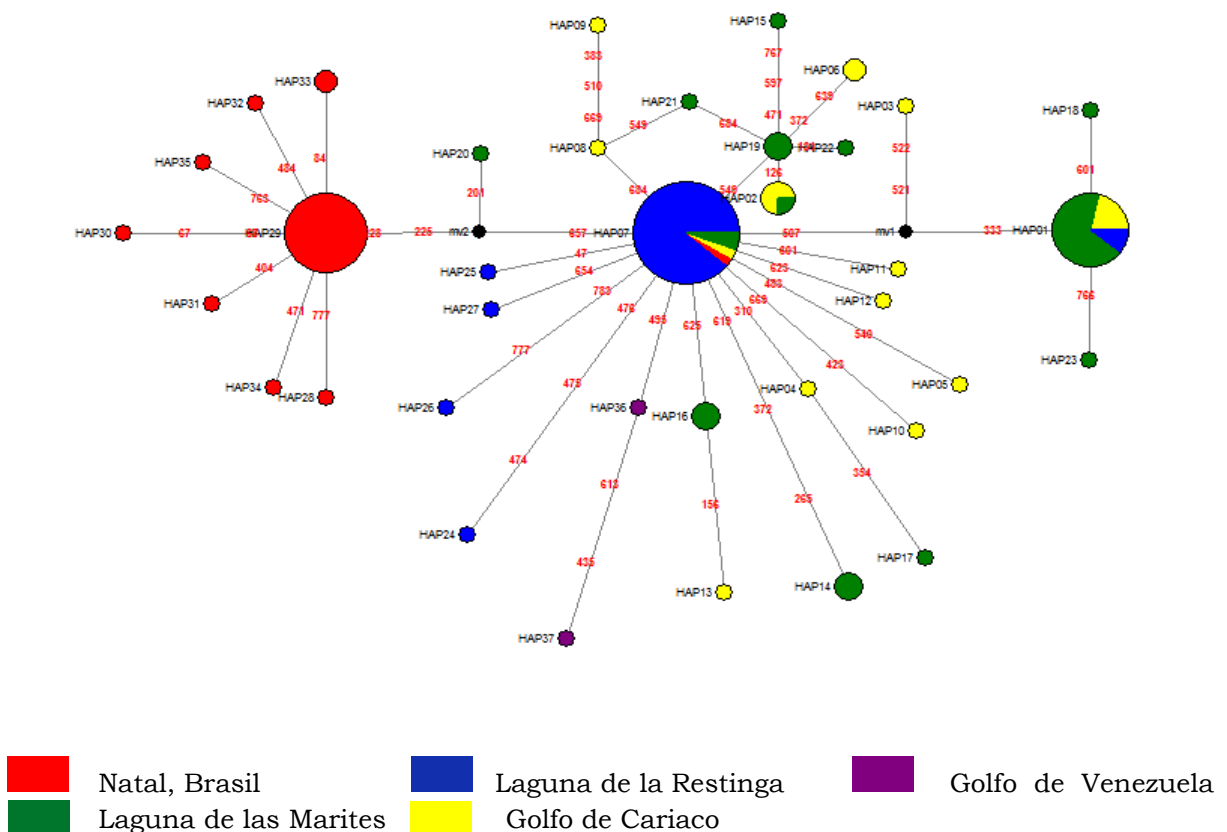
B) Laguna de la Restinga, Venezuela

C) Laguna las Marites, Venezuela

D) Golfo de Cariaco, Venezuela

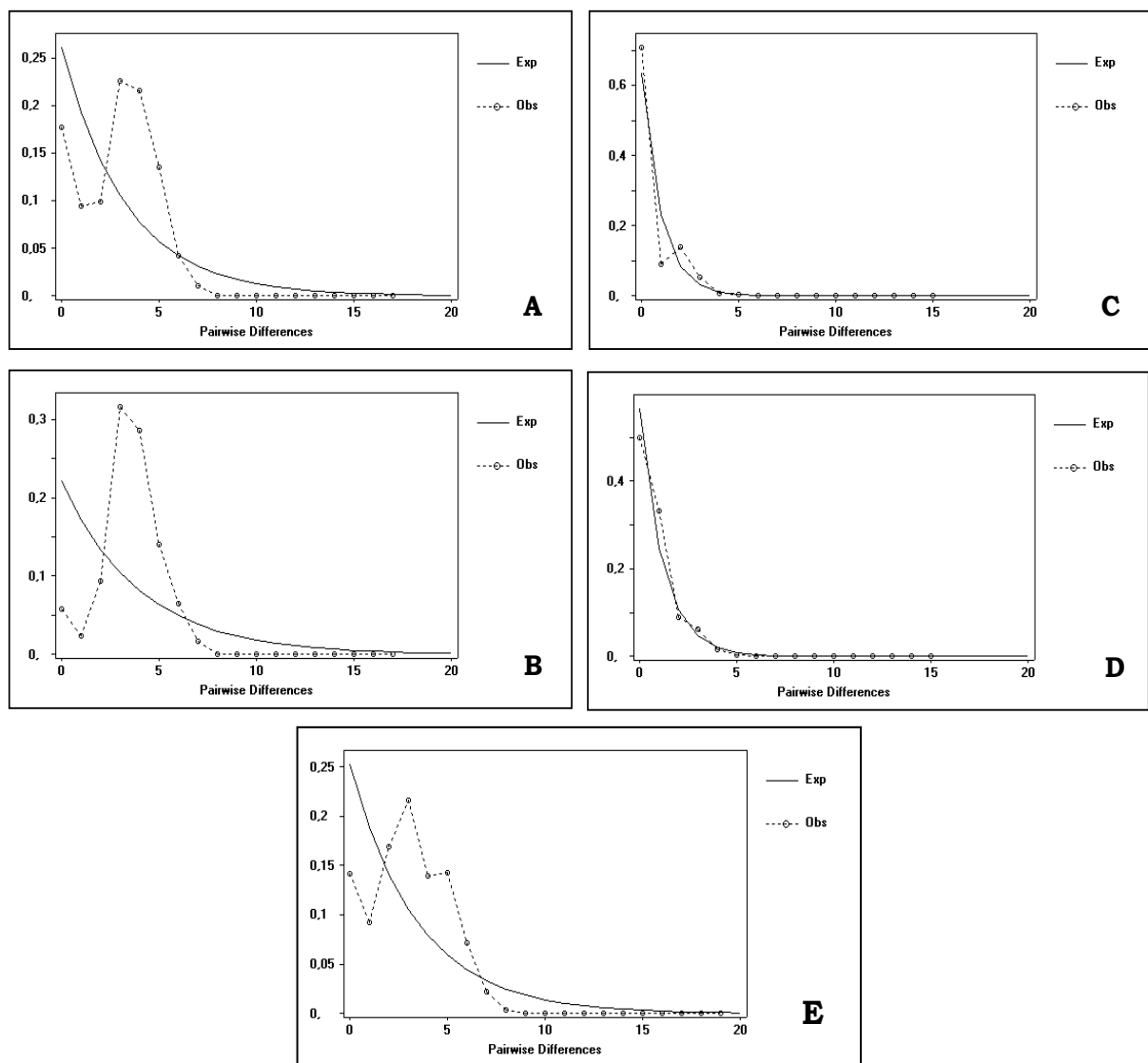
Figura 27.- Redes de haplotipos de las 4 localidades de muestreo.

Los haplotipos identificados como ancestrales fueron numéricamente dominantes en cada una de las localidades, con la excepción de la localidad Golfo de Cariaco, donde todos los haplotipos presentes mostraron una abundancia relativamente homogénea. En el caso particular del Golfo de Venezuela no se pudo construir una red de haplotipos, debido a que solo se disponía de dos muestras para esta localidad, por lo que no realizaron análisis de inferencia demográfica, ni se logró identificar el posible haplotipo ancestral, dado que ambos haplotipos presentaron igual probabilidad. Sin embargo, la construcción de una red de haplotipos con la totalidad de los individuos (Figura 28), permitió detectar la relación de los haplotipos del Golfo de Venezuela con el haplotipo 7, encontrándose que el Haplotipo 36 se diferencia de éste por tan solo un solo paso mutacional, mientras que el haplotipo 37 se diferencia del 36 por dos mutaciones.



**Figura 28.- Red de haplotipos de los 122 individuos de las 4 localidades de muestreo.**

En la Figura 29 se presentan las gráficas de distribución mismatch, bajo el modelo de población con tamaño constante, para cada una de las localidades, así como para la totalidad de los individuos de Brasil y Venezuela en conjunto, en las que puede evidenciarse que no existe en buen ajuste de los datos entre la distribución observada en la muestra y la esperada de acuerdo al modelo de poblaciones con tamaño constante, por lo que pudiese inferirse la ocurrencia de cambios en el tamaño de estas poblaciones.



**Figura 29.- Distribuciones mismatch bajo el modelo de población con tamaño constante: A) Laguna las Marites, B) Golfo de Cariaco, C) Laguna de la Restinga, D) Natal y E) Todas las localidades en conjunto.**

Con la finalidad de verificar la probabilidad de poder rechazar el modelo de expansión poblacional sugerido por las distribuciones mismatch, se calcularon los valores de los parámetros de expansión poblacional (Tau  $\tau$ , Theta 0, Theta 1), así como los valores del índice *Raggedness* de Harpending (HRI), los cuales presentaron probabilidades claramente no significativas en todas las localidades, lo cual indicaría que el modelo de expansión poblacional, no puede ser rechazado para estas poblaciones, con un nivel de confianza del 95% (Tabla 14).

**Tabla 14.- Parámetros de expansión poblacional de *Hippocampus reidi* determinados para las localidades de estudio**

	GC	LM	LR	NA
Tau	3,836	4,043	3,000	0,791
Tau qt 2.5%	2,271	1,027	0,348	0,000
Tau qt 5%	2,598	1,508	0,396	0,000
Tau qt 95%	5,098	6,576	3,500	1,752
Tau qt 97.5%	5,334	7,119	3,500	2,049
Theta0	0,000	0,000	0,000	0,000
Theta0 qt 2.5%	0,000	0,000	0,000	0,000
Theta0 qt 5%	0,000	0,000	0,000	0,000
Theta0 qt 95%	0,635	1,194	0,002	0,093
Theta0 qt 97.5%	1,090	1,951	0,005	0,223
Theta1	99.999,000	8,398	0,382	3,269
Theta1 qt 2.5%	14,566	4,172	0,000	0,704
Theta1 qt 5%	19,645	5,397	0,000	1,238
Theta1 qt 95%	99.999,000	99.999,000	99.999,000	99999,000
Theta1 qt 97.5%	99.999,000	99.999,000	99.999,000	99999,000
SSD	0,033	0,018	0,021	0,002
Model (SSD) p-valor	0,04	0,27	0,25	0,71
Indice <i>Raggedness</i>	0,09	0,04	0,39	0,09
<i>Raggedness</i> p-valor	0,05 <sup>NS</sup>	0,52 <sup>NS</sup>	0,54 <sup>NS</sup>	0,81 <sup>NS</sup>



Adicionalmente, los resultados de la prueba  $F_s$  de  $F_u$  fueron consistentes con los indicios de expansión poblacional, detectados mediante el análisis de las distribuciones mismatch y los índices calculados con base en los parámetros de expansión poblacional, para la mayoría de las localidades (Tabla 15) y para todas las localidades en conjunto ( $F_s=-28,43$ ;  $p=0,000$ ).

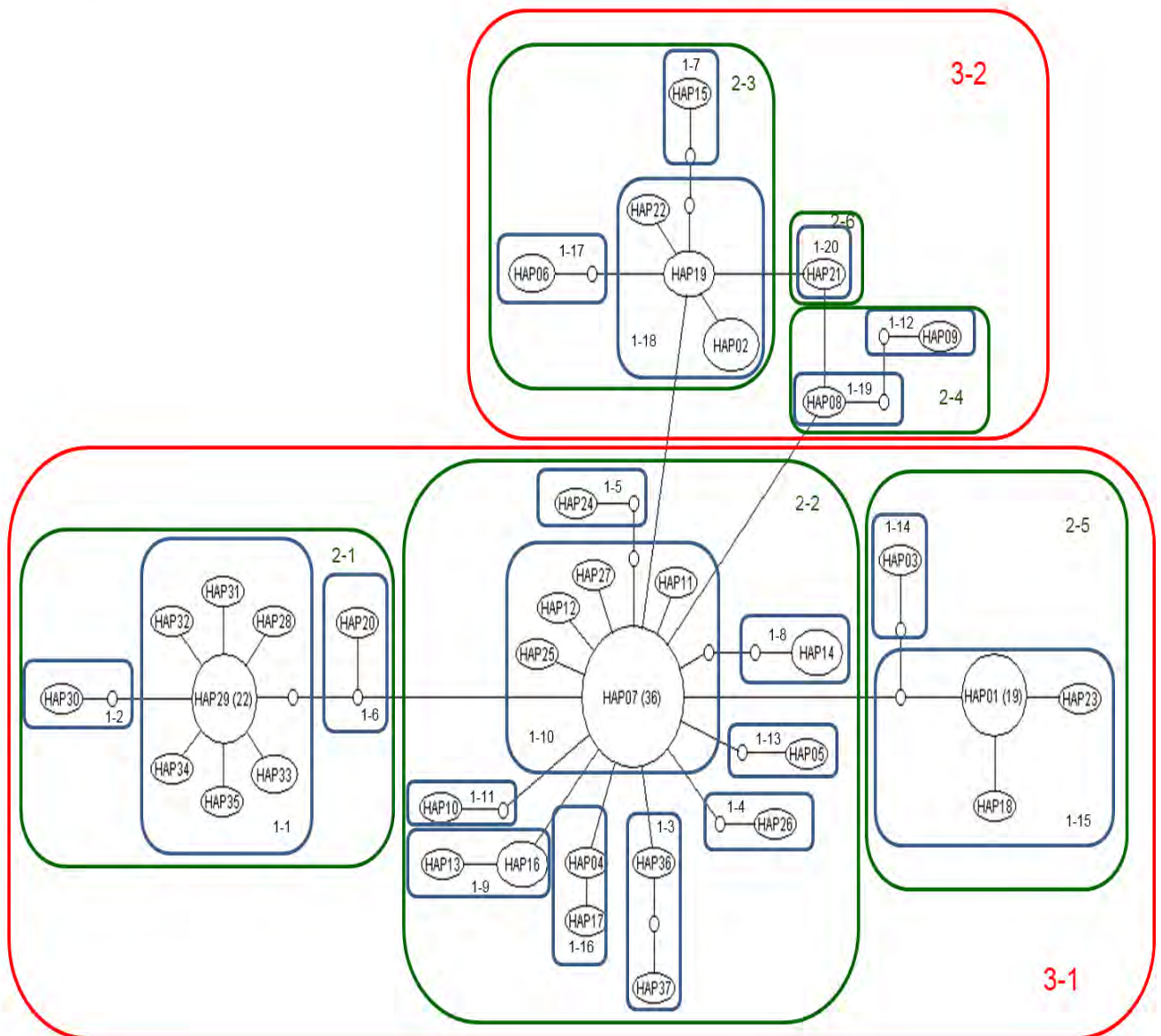
**Tabla 15.- Prueba  $F_s$  de  $F_u$  para las secuencias de *Hippocampus reidi* de las localidades de estudio.**

	<b>GC</b>	<b>LM</b>	<b>LR</b>	<b>NA</b>
<b>N° real de alelos</b>	13	13	6	9
<b>N° original de alelos</b>	13	13	6	9
<b>Theta pi</b>	3,515	2,833	0,573	0,770
<b>N° Esperado de alelos</b>	6,972	7,596	3,027	3,448
<b>FS</b>	-6,158	-4,292	-3,127	-6,708
<b>FS p-valor</b>	0,002 *	0,02*	0,009 *	0,000 *

#### **4.3.5.- Análisis de Clados Anidados:**

La red de haplotipos y su correspondiente diseño anidado asociado para *Hippocampus reidi* en el Mar Caribe y el Atlántico Sur Occidental son presentados en la Figura 30. Las áreas de los círculos son proporcionales al número de individuos que comparten cada haplotipo. Las líneas sólidas representan mutaciones de un solo nucleótido y los círculos blancos pequeños representan haplotipos que no estuvieron presentes en la muestra pero que fueron hipotetizados para conectar los haplotipos observados.

El análisis filogenético de clados anidados (NCPA) resulto en una jerarquía de tres pasos y permitió establecer un total de 28 clados anidados, de los cuales 20 correspondieron a clados de un solo paso (1-1 al 1-20), 6 a clados de dos pasos (2-1 al 2-6) y 2 a clados de tres pasos mutacionales (3-1 y 3-2).



**Figura 30.- Red de haplotipos y su diseño anidado asociado para *Hippocampus reidi* en el Mar Caribe y el Atlántico Sur Occidental.**

Para el caso de los clados 1-9, 1-15, 1-16, 1-18, 2-3, 2-5 y 3-2 no fue posible encontrar evidencias que permitiesen rechazar la hipótesis nula de no asociación entre haplotipos y/o clados de superior nivel jerárquico y localidades de muestreo, lo que podría sugerir panmixia en poblaciones de reproducción sexual. Mientras que para los clados 1-10 y 2-1, el análisis filogenético de los clados anidados revelo asociación significativa entre haplotipos o clados de superior nivel jerárquico y localidades de muestreos, señalándose como escenario más probable la existencia de flujo genético restringido con aislamiento por distancia, así como dispersión por distancia. El análisis del cladograma total no permitió realizar inferencias globales debido a que no fue posible determinar el estatus extremo/interior (Anexo 5).

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1.- Caracterización Taxonómica de las Especies

La comparación de los resultados obtenidos para los rangos de valores encontrados para las variables merísticas, con relación a los reseñados en la literatura, no permitió detectar diferencias entre las especies analizadas, ni con respecto a las restantes especies reseñadas para el Océano Atlántico (Tabla 16); con la excepción de *Hippocampus capensis*, considerado especie endémica de los estuarios del sur de África e *Hippocampus zosterae* que además de mostrar una merística diferente en las aletas pectorales y la dorsal, presenta un tamaño mucho menor a las especies en estudio, con una longitud máxima de 38 milímetros (Lourie *et al.*, 1999; 2004) y al parecer distribución restringida al Golfo de México, Bermuda, Bahamas, Cuba y las costas de Florida (Vari, 1982).

**Tabla 16.- Valores de las variables merísticas de las especies reseñadas para océano Atlántico.**

Especie	DFR	AFR	PFR	TrR	TaR	RUDF	ES	CS	Fuente
<i>H. reidi</i> (Holotipo)	17	ND	16	11	37	ND(3*)	ND(2*)	ND(1*)	Ginsburg, 1933
<i>H. reidi</i> (n=39)	16-19	ND	15-17	11	31-39	3	1-2	1-2	Lourie, 1999; 2004
<i>H. reidi</i> (n= 68)	16-19	3-4	15-17	11	33-37	ND	ND	ND	Vari, 1982
<i>H. algiricus</i> (n=18)	17-18	ND	15-17	11	35-37	3	1-2	1-2	Lourie, 1999; 2004
<i>H. erectus</i> (Holotipo)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Poey, 1810
<i>H. erectus</i> (n=51)	16-20	ND	14-18	11	34-39	3	1	1-2	Lourie, 1999; 2004
<i>H. erectus</i> (n=213)	16-20	3-4	14-17	11	33-38	ND	ND	ND	Vari, 1982
<i>H. guttulatus</i> (n=48)	17-20	ND	16-18	11	35-40	3	1	1	Lourie, 1999; 2004
<i>H. hippocampus</i> (n=35)	16-19	ND	13-15	11	36-38	3	0-1-2	0-1-2	Lourie, 1999; 2004
<i>H. zosterae</i> (n=31)	12	ND	11-12	9-10	31-32	2	0	0	Lourie, 1999; 2004
<i>H. zosterae</i> (n=146)	10-13	3-4	10-13	9-11	28-34	ND	ND	ND	Vari, 1982
<i>H. capensis</i> (n=96)	14-17	ND	14-17	11	32-37		0	0	Lourie, 1999; 2004

ND: No determinado en la descripción original de la especie

\*: Determinado para el presente estudio en el material tipo original de la especie

A pesar de que en la mayoría de las claves de identificación elaboradas para las especies *H. reidi* e *H. erectus* (Vari, 1982; Fritzsche, 2002) se hace énfasis en los patrones de coloración y la disposición de manchas sobre distintas regiones del cuerpo, en este estudio fue posible evidenciar que los patrones de coloración presentaron una amplia variación de tonos y disposición corporal de patrones de manchas que no se corresponden a una especie en particular, por lo que se presume que dichas características carecen de valor diagnóstico para la identificación de las especies y están más bien relacionados con el entorno en el cual habitan los individuos de ambas especies y la capacidad que presentan estos para mimetizarse, evitar la depredación y aumentar las posibilidades de capturar las presas de las que se alimentan. En relación a esto, Foster & Vincent (2004), han señalado que los caballos marinos no solo pueden cambiar sus patrones de coloración a lo largo de su ciclo de vida, para confundirse con el entorno que los rodea, sino que son capaces de realizar cambios de coloración a corto plazo durante las conductas de cortejo y otras interacciones intraespecíficas.

Paralelamente, ha sido mencionado que la existencia de diferencias en la magnitud de la espinación corporal de los anillos y la presencia de filamentos corporales de piel, podría ser utilizada como carácter diagnóstico entre algunas especies del género *Hippocampus* (Ginsburg, 1933; Cervigón, 1973; Vari, 1982; Cervigón, 1991). No obstante, en este estudio pudo confirmarse que dichos caracteres no presentan validez taxonómica en las especies estudiadas, dado que además de presentarse en ambas especies, la presencia de filamentos corporales o espinación marcada varían a lo largo del ciclo de desarrollo ontogenético y de acuerdo al tipo de hábitat al que se encuentran asociados los caballitos de mar.

Un caso similar, ha sido encontrado entre las especies *H. guttulatus* e *H. Hippocampus*, especies para las cuales Goofredo *et al.* (2004), utilizaron estas características para la identificación en el campo durante la realización de censos poblacionales de las especies anteriormente señaladas, siendo demostrado posteriormente por Curtis (2006), la carencia de validez

taxonómica de estas características, debido a su presencia en ambas especies y a la potencialidad que presentan todas las especies del género a desarrollar filamentos corporales (Garrick-Maidment, 1998).

El análisis de los datos morfométricos mediante la aplicación de la técnica de componentes principales permitió detectar las diferencias entre las especies en los dos primeros componentes principales, fundamentalmente. De esta manera, debido a que los coeficientes de contribución de todas las variables al CP 1 (Figura 11) fueron de igual signo y similar magnitud, se podría considerar una contribución relativamente homogénea de todas las variables a la varianza total de los datos para este componente, por lo que éste puede ser interpretado como un promedio ponderado de todas las variables, o un factor global de “tamaño” que no contribuye a la diferenciación de la forma entre las especies analizadas (Mardia *et al.*, 1995).

Por otra parte, acorde a lo observado en las figuras 12 y 13 puede evidenciarse que la separación de las especies *Hippocampus erectus* e *Hippocampus reidi* se realiza fundamentalmente en función del segundo componente principal (CP 2); donde los mayores coeficientes, en orden decreciente de importancia, se encontraron en las variables: Longitud del rostro (SnL = + 0,6086); Ancho del cuerpo a nivel del noveno anillo del tronco (TW 9 = - 0,5340), Altura de la coroneta (HC = - 0,3485) y Longitud de la cabeza (HL = + 0,2430).

Mardia *et al.* (1995), han señalado que de la magnitud absoluta de los coeficientes de contribución de las variables a cada componente puede deducirse su importancia relativa, por lo que las variables SnL, TW9, HC y HL podrían considerarse como variables de importancia diagnóstica para la identificación de las especies *Hippocampus reidi* e *Hippocampus erectus*, resultados que concuerdan con las descripciones realizadas en varias de las claves taxonómicas elaboradas para la identificación de estas especies (Vari, 1982; Fritzsche, 2002), donde se señala que la principal diferencia entre

estas especies se encuentra reflejada en la longitud de rostro. Sin embargo, el amplio margen de solapamiento señalado en cuanto a este carácter, entre las especies estudiadas, no permite tomar una decisión taxonómica concreta, solamente con base en esta variable, como se pretende indicar en la mayoría de las claves que involucran la diferenciación de estas especies.

Además, Lourie *et al.* (1999), han señalado que las proporciones corporales de los caballos de mar cambian a lo largo del ciclo ontogenético, encontrándose que en la mayoría de las especies los juveniles presentan cabezas de mayor tamaño, en relación al tamaño corporal que los adultos, son más delgados, presentan tubérculos o filamentos corporales más desarrollados y coroneta más alta y definida, por lo que estas diferencias deben ser consideradas cuando se identifican individuos juveniles.

A pesar de ser compleja la identificación de las especies de caballos marinos, debido a la existencia de gran intergradación en las características merísticas y morfométricas, las variaciones en su ciclo ontogenético y lo conservado de sus patrones morfológicos, los resultados del presente estudio, en relación a la caracterización taxonómica de las especies del nororiente de Venezuela, permitieron identificar la existencia de dos entidades taxonómicas en la región, correspondientes a *Hippocampus reidi* e *Hippocampus erectus*, con base en la caracterización merística, morfométrica y morfológica de las mismas, a través de la utilización conjunta de varias de las características utilizadas en el presente estudio, las cuales se emplearon para la elaboración de una clave de identificación taxonómica que facilite la toma de decisiones basadas en un mayor número de caracteres a los comúnmente señalados en las claves preexistentes.

Estos resultados confirman lo señalado previamente por otros investigadores para las especies del género *Hippocampus* para la región del Atlántico Occidental y el Caribe (Vari, 1982; Cervigón, 1991; Fritzsche, 2002), con respecto al número de especies que habitan en la región y resaltan la importancia de la utilización de diferentes caracteres

provenientes de diferentes fuentes de información para la identificación de las especies de este género.

## **5.2.- Diferenciación Molecular de las Especies**

Los análisis filogenéticos realizados mediante la utilización de las tres bases de datos permitieron detectar diferencias claras entre las dos entidades taxonómicas, preliminarmente identificadas mediante la utilización de las técnicas de taxonomía convencional con base en las características propuestas (*Hippocampus reidi* e *Hippocampus erectus*). De hecho, en las figuras 16 y 17, donde se representan los alineamientos de las secuencias de los fragmentos de los genes Citocromo Oxidasa I y Citocromo B, respectivamente, ya puede evidenciarse la diferencia genética existente entre las especies *H. reidi* e *H. erectus*, así como las diferencias existentes entre estas especies y la especie *Hippocampus kuda*, utilizada como referencia.

Los valores de distancias genéticas detectados en cada una de las particiones analizadas fueron similares, tanto a nivel intraespecífico como interespecífico, encontrándose que las distancias genéticas entre la especie *Hippocampus erectus* y las especies *H. reidi* e *H. kuda* fueron mayores ( $d=0,115 - 0,123$ ) que las distancias genéticas detectadas entre estas dos últimas entidades taxonómicas ( $d=0,023$ ). Estos valores de distancia genética son del mismo orden de magnitud que los reportados por Casey *et al.* (2004), en un estudio filogenético realizado para investigar el origen del género *Hippocampus* y elucidar las relaciones entre las especies del Océano Atlántico y del Indo-Pacífico, con base en secuencias completas del gen Citocromo B (1141 pb), quienes señalan valores de distancia genética entre *H. erectus* y las especies *H. reidi* y *H. kuda* de 0,122 y 0,142, respectivamente; mientras que entre las especies *H. reidi* y *H. kuda* obtuvieron valores de distancia genética de 0,039; las pequeñas diferencias entre los resultados obtenidos por estos investigadores y los indicados en el presente estudio, probablemente estén relacionadas con las diferencias en el



número de pares de bases utilizadas en ambos estudios.

Las topologías de los árboles filogenéticos obtenidas mediante los diferentes métodos de inferencia empleados fueron todas muy similares, lo cual sugiere que la congruencia de los agrupamientos observados es bien robusta. Al respecto, Hall (2004) realizó un estudio comparativo entre varios métodos de inferencia filogenética utilizando secuencias de proteínas y ADN, en el cual demostró que no existen diferencias significativas entre la precisión de las topologías obtenidas por los métodos Neighbour – Joining, Máxima Parsimonia y Máxima Probabilidad para longitudes de ramas menores a las 50 mutaciones y menos de 32 taxones.

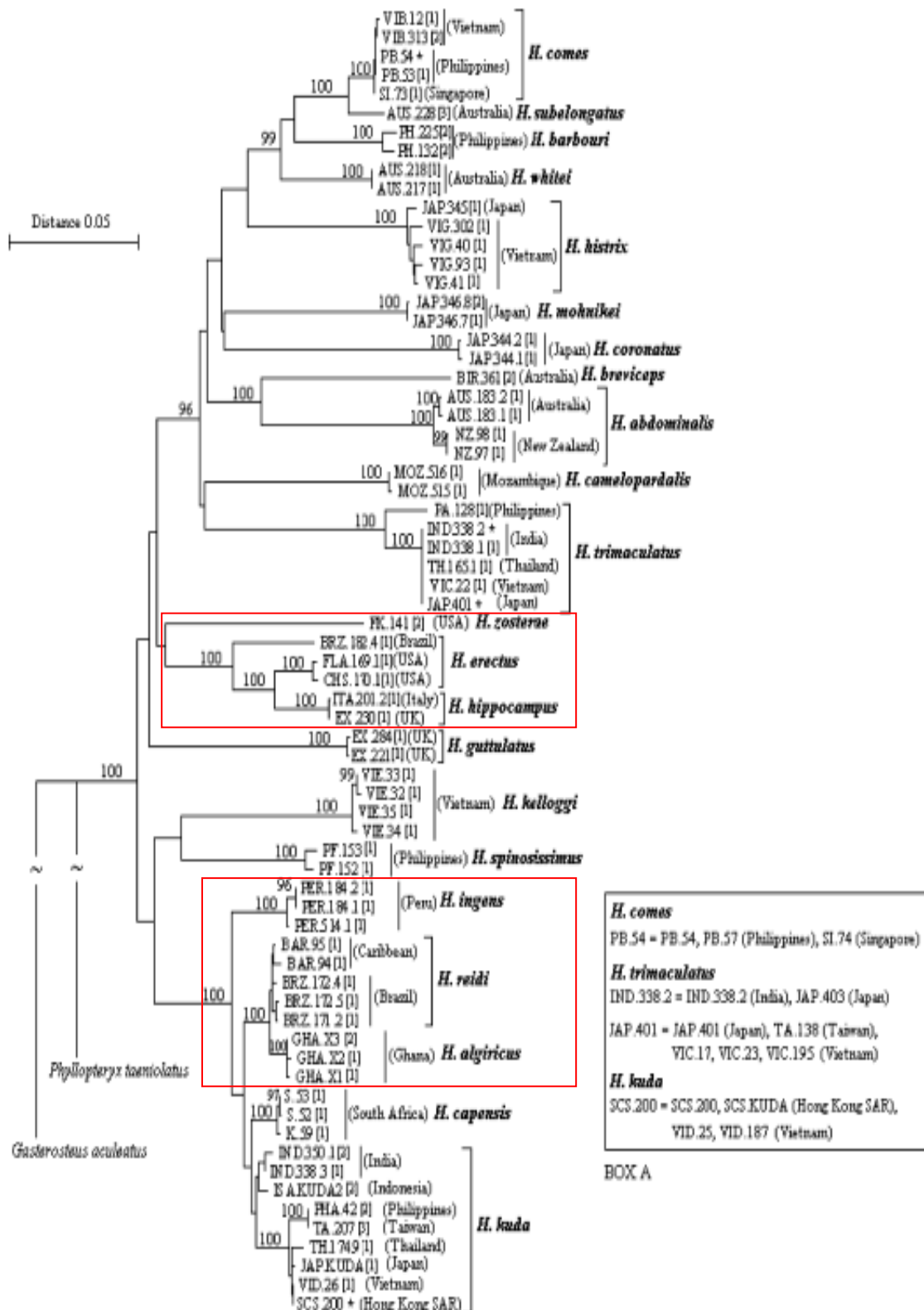
Del análisis de las topologías de los diferentes árboles construidos, resulta interesante señalar que en todos los casos fue posible observar la conformación de un clúster con elevados valores de bootstrap (85,6 - 98,2) integrado por la totalidad de los ejemplares provenientes de Natal (Brasil), preliminarmente identificados como *Hippocampus reidi*, lo que podría resultar en una evidencia de cierto grado de estructuración poblacional de esta especie dentro de su amplio rango de distribución.

Un estudio preliminar realizado por Emmanuel (2006), con base en las secuencias completas del gen Citocromo B de *H. reidi*, provenientes de diferentes localidades de las costas de Brasil (n=12) y otras secuencias de la misma especie obtenidas del Genbank de muestras del Brasil, el Mar Caribe y de la especie *H. algiricus*, sugiere indicios de estructuración poblacional de esta especie dentro de las costas de Brasil y con respecto a las muestras provenientes del Mar Caribe, por lo que señala la necesidad de realizar estudios con un mayor número de muestras y la profundización de estudios morfológicos y sistemáticos con ésta y otras especies del género *Hippocampus*.

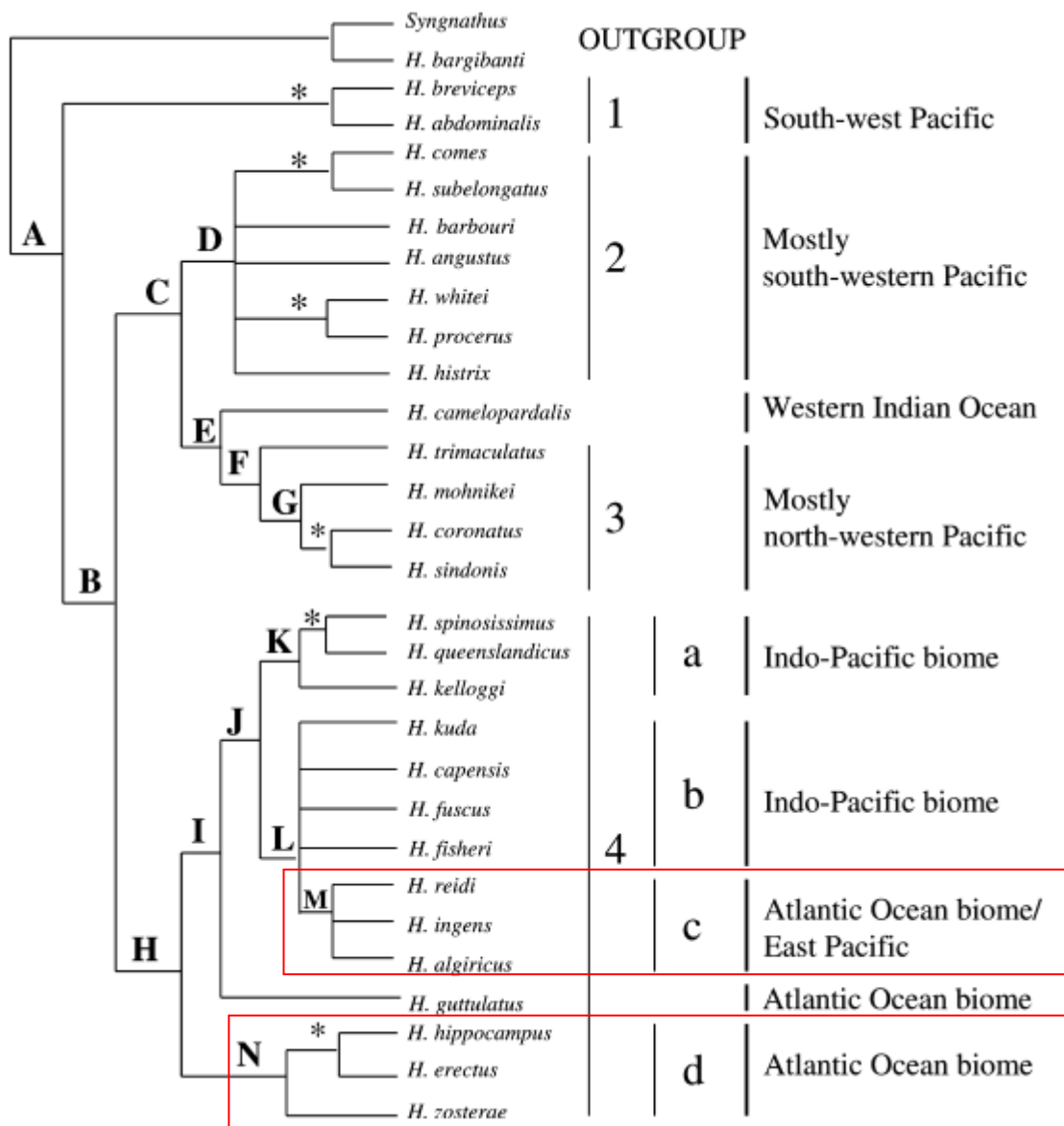
Una vez determinada la utilidad de los marcadores moleculares Citocromo Oxidasa I y Citocromo B en la discriminación de las entidades

taxonómicas bajo estudio, en función de la congruencia encontrada entre los valores de distancia genética, la similitud de las topologías de los árboles construidos mediante la implementación de diferentes métodos de inferencia y los resultados derivados de la identificación preliminar de las especies con base en las variables empleadas y las técnicas de taxonomía convencional utilizadas, la construcción de un árbol filogenético mediante el método de máxima parsimonia con la totalidad de las secuencias del gen Citocromo B (43 haplotipos) y secuencias obtenidas del Genbank de las demás especies del océano Atlántico más la especie *H. ingens* del océano Pacífico (Figura 24), se confirmó que las especies detectadas en las localidades evaluadas durante la realización de este estudio se correspondieron con las especies *Hippocampus erectus* e *Hippocampus reidi*, validando así la utilidad de los genes Citocromo Oxidasa I y Citocromo B como marcadores moleculares para la identificación de estas especies.

Además, la evaluación de las relaciones filogenéticas inferidas a partir de la construcción de este árbol filogenético permitió evidenciar la existencia de dos clados principales sustentados por elevados valores de bootstrap (Figura 24), el primero de ellos constituido por las especies *Hippocampus erectus* e *Hippocampus hippocampus* y el segundo conformado por las especies *Hippocampus ingens*, *Hippocampus kuda*, *Hippocampus reidi* e *Hippocampus algiricus*. Por otra parte, la relación de la especie *Hippocampus zosterae* con el clado conformado por las especies *H. erectus* y *H. hippocampus*, a pesar de ser evidente en la topología del árbol no presentó valores de bootstrap altos (55,81), mientras que no se logró identificar la relación de la especie *H. guttulatus* con ninguno de los clados señalados anteriormente, manteniéndose en posición basal con respecto a las demás especies analizadas. Estas relaciones son consistentes con los resultados obtenidos por Casey *et al.* (2004) (Figura 31) y Teske *et al.* (2004) (Figura 32) en investigaciones realizadas para elucidar el origen y la historia evolutiva de las especies del género *Hippocampus*.



**Figura 31.- Relaciones filogenéticas entre 22 especies del género Hippocampus con base en un árbol Neighbour – Joining realizado a partir de secuencias del gen Citocromo B.**



**Figura 32.- Síntesis de las relaciones filogenéticas entre 29 especies del género *Hippocampus* con base árboles de Máxima Parsimonia e Inferencia Bayesiana construidos a partir de las particiones individuales y combinadas de los genes Aldolasa, RP1, 16S RNA y Citocromo B. La monofilia de los clados 1-4 esta soportada por altos valores de Bootstrap. La agrupación de los caballos marinos del clado 4 en los subgrupos a, b, c y d está basada principalmente en sus asociaciones con regiones geográficas específicas.**

### **5.3.- Diversidad y Estructura Genética Poblacional**

#### **5.3.1.- Diversidad Nucleotídica y Diversidad Haplotípica:**

Los valores obtenidos de la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y haplotípica ( $h$ ) de la especie *Hippocampus reidi* en las localidades estudiadas, así como de la población en conjunto, se encontraron dentro del rango esperado para el gen Citocromo B en estudios previos ejecutados con ésta y otras especies del género *Hippocampus* realizados por Lourie & Vincent (2004), Lourie *et al.* (2005) y Emmanuel (2006). Mientras que en un contexto más amplio, estos valores también se corresponden con los promedios esperados para poblaciones de peces marinos señalados por Graves (1998), quien indica valores promedio de  $h$  que oscilan entre 0,58 - 0,96 y de  $\pi$  entre 0,1% - 2,48%. En general, se puede observar que los valores de  $\pi$  son relativamente bajos en todas las localidades estudiadas, aunque son marcadamente inferiores en las localidades de la Laguna de la Restinga y Natal, mientras que los valores de diversidad haplotípica son bastante altos para las localidades del Golfo de Cariaco y la Laguna las Marites, e igualmente bajos para las localidades de Natal y la Laguna de la Restinga (Tabla 7).

Avise (2000), señala que en base a las magnitudes relativas de los valores de estos descriptores de la diversidad genética, pueden inferirse algunos patrones generales de la historia demográfica de las poblaciones, señalando que valores bajos de la diversidad nucleotídica acompañados de valores altos de la diversidad haplotípica, pueden corresponderse con poblaciones que han sufrido un rápido crecimiento desde poblaciones ancestrales con un pequeño tamaño efectivo ( $N_e$ ), en un tiempo suficiente para recuperar la variación haplotípica por mutación, pero muy corto para acumular grandes diferencias entre las secuencias, mientras que valores bajos para ambos índices de diversidad genética  $\pi$  y  $h$  sugieren que las poblaciones pueden haber experimentado prolongadas o severas reducciones de su tamaño poblacional en tiempos recientes.

Adicionalmente, la presencia de tan solo 3 haplotipos (HAP 07, HAP 01 y HAP 2) compartidos entre las localidades del nororiente de Venezuela y de solo 1 haplotipo (HAP 07) común para la región comprendida entre todas las localidades de estudio, conjuntamente con las diferencias en las frecuencias entre localidades y la gran cantidad de haplotipos únicos detectados en cada una (Tabla 8), sugieren que el equilibrio genético esperado entre las localidades de la población pudiese estar siendo alterado por factores como migración, deriva génica y mutaciones (Frankham *et al.*, 2008).

La realización de las pruebas de neutralidad D de Tajima y D\* y F\* de Fu & Li, no detectaron diferencias significativas de lo esperado bajo el modelo de selección neutral para las localidades del Golfo de Cariaco y la Laguna de las Marites, mientras que si detectaron diferencias significativas de lo esperado en las localidades de la Laguna de la Restinga y Natal (Tabla 7). En concordancia con lo expuesto con anterioridad, ha sido señalado que desviaciones significativas del modelo neutral sugeridas por la D de Tajima pueden deberse a efectos derivados de la expansión poblacional, cuellos de botella o heterogeneidad de las tasas de mutación (Aris-Brosou & Excoffier, 1996; Tajima, 1996).

### **5.3.2.- Estructura Genética Poblacional:**

Los análisis moleculares de varianza realizados con la finalidad de someter a prueba las hipótesis de estructuración genética de las poblaciones a escala micro geográfica (Poblaciones Insulares *vs.* Poblaciones Continentales) y a escala macro geográfica (Poblaciones del Mar Caribe Venezolano *vs.* Poblaciones del Océano Atlántico Sur Occidental), permitieron detectar valores de  $\Phi_{st}$  que oscilan entre 0,091 (Tabla 9) y 0,64 (Tabla 10), siendo ambos altamente significativos, los cuales permitirían categorizar los niveles de divergencia genética a estas escalas espaciales, como diferenciación genética moderada y diferenciación genética muy alta, respectivamente, de acuerdo al criterio de Hartl & Clark (1997).

Esta afirmación es consistente con los análisis de comparaciones inter poblacionales realizados, como el cálculo de los índices  $F_{st}$  entre pares de poblaciones (Tabla 11), las estimaciones del número absoluto de migrantes por generación (Tabla 12) y la prueba exacta de diferenciación poblacional (Tabla 13), donde se pudo evidenciar marcadas diferencias entre casi todos los pares de poblaciones, acompañados de restricciones totales o parciales al flujo genético, por lo que la ocurrencia de panmixia en la población es rechazada y se corrobora el desvío significativo de las condiciones de equilibrio, sugiriendo que fuerzas evolutivas como la deriva génica, las mutaciones y la migración pudieran haber intervenido de manera diferencial a lo largo de la historia demográfica de esta especie, para generar los patrones de estructura genética poblacional que observamos hoy en día (Frankham, 2008).

Ha sido señalado que la identificación de áreas de alta diversidad genética, la estimación del nivel de flujo genético entre poblaciones y la determinación de evidencias de estructuración genética son los principales pasos a seguir, en orden de poder evaluar si las poblaciones de una especie en particular constituyen distintas unidades de manejo de acuerdo a los criterios de Moritz (1994). En función de esto, la estructura poblacional de *Hippocampus reidi* (soportada por los valores de  $F_{ST}$  y  $\Phi_{st}$ ), sugiere que cada una de las localidades de estudio constituye una diferente unidad de manejo, por lo que en la ausencia de datos adicionales esta información derivada del ADNmt es muy importante, como un primer paso para la identificación de áreas de alto valor para la conservación, así como para proveer una guía preliminar para la elaboración de estrategias de manejo y preservación de estas regiones y la biodiversidad que en ellas se desarrolla. Sin embargo, la conclusión de que las poblaciones de las localidades hayan evolucionado relativamente de manera independiente bajo diferentes procesos estocásticos, es cuando mucho tentativa, debido al pequeño tamaño de la muestra y la utilización de un único marcador molecular (Teske *et al.*, 2003).

Los índices *Fst* entre pares de poblaciones pueden ser utilizados como distancias genéticas a corto plazo entre poblaciones, con la aplicación de una ligera transformación para linearizar la distancia con el tiempo de divergencia poblacional, bajo la hipótesis nula de no diferenciación entre las poblaciones (Escoffier, 2006). Por lo tanto, para intentar dilucidar a cual modelo de estructuración poblacional se ajustan mejor las diferencias genéticas encontradas entre las localidades de estudio, se aplicó la prueba de Mantel para verificar la posible correlación entre las distancias genéticas (*Fst*) y las distancias geográficas en las dos escalas espaciales utilizadas en este estudio, a nivel macro geográfico con todas las localidades y a escala micro geográfica incorporando solamente las localidades de las costas de Venezuela.

Los resultados de la prueba de Mantel permitieron detectar una correlación significativa entre las diferencias genéticas y las distancias geográficas para todo el rango de distribución estudiado, indicando que el flujo genético entre las poblaciones se da en función de las distancias, por lo que el Modelo de aislamiento por distancia sería el más adecuado a este nivel de comparación, para explicar la estructura genético poblacional de *Hippocampus reidi* determinada para la región. El modelo de aislamiento por distancia, se caracteriza porque el factor principal para la diferenciación es la limitación de la dispersión en función de la distancia geográfica, dentro de una población sin subdivisiones aparentes. De manera que en las poblaciones de distribución continua, se puede detectar un patrón de aislamiento, en el que el flujo genético entre las subpoblaciones disminuye a medida que la distancia genética entre ellas aumenta (Wright, 1978).

Estudios previos de filogeografía comparada, realizados por Lourie *et al.* (2005) con base en secuencias del gen Citocromo B en otras especies del genero *Hippocampus* (*H. kuda*, *H. trimaculatus*, *H. barbouri* y *H. spinosissimus*), han sido congruentes con estos resultados, al detectar correlaciones significativas entre las distancias genéticas y geográficas en todas las especies estudiadas para el sudeste asiático.



Por otra parte, en un estudio también de corte filogeográfico comparativo realizado por Teske *et al.* (2005), con base en secuencias de la región control del ADN mitocondrial en las especies *H. kuda*, *H. fuscus* e *H. capensis* en la región del Indo-Pacífico, estos investigadores señalan que no existió correlación significativa entre las distancias genéticas y las distancias geográficas para ninguna de las especies analizadas y sugieren que esta pérdida de correlación puede estar asociada a las capacidades de dispersión a largas distancias que pudiesen tener estas especies a través de su sujeción a estructuras flotantes, lo cual al parecer es una situación factible dentro de este grupo de especies (Teske *et al.*, 2007), que pudiese jugar un rol bien importante en la explicación de los patrones de estructura genética, donde existe evidencia de marcadas contracciones del tamaño poblacional, ya que tanto los patrones de diferenciación ocasionados tanto “cuellos de botella”, como por efecto fundador pueden dejar huellas similares en la historia demográfica de las poblaciones.

A pesar de haberse detectado un patrón de estructura poblacional a nivel macro geográfico concordante con lo esperado según el Modelo de aislamiento por distancia, a escala micro geográfica, cuando se consideraron solamente las localidades de la costa de Venezuela, no se detectó correlación significativa entre las distancias genéticas y las geográficas, por lo que se pudiera proponer que la estructura genética a esta escala de comparación pudiese ser mejor explicada por otros modelos como el Modelo paso a paso (Stepping Stone). Al respecto, Kimura & Weiss (1964), han señalado que este es el más adecuado para describir la estructura poblacional de especies que presentan dispersión geográfica limitada.

La importancia de la determinación del modelo que mejor se ajuste a la variabilidad genética encontrada, por lo general, constituye una de las primeras etapas en el conocimiento de la biología poblacional de cualquier especie (Galletti, 2008), especialmente si se considera que las poblaciones naturales de casi todas las especies presentan algún grado de subdivisión, permitiendo que éstas evolucionen en forma separada y se diversifiquen.

### **5.3.3.- Inferencia Demográfica y Análisis de Clados Anidados:**

La construcción de redes de haplotipos incorporando las frecuencias alélicas construidas a través del programa TCS, permitió detectar que todas las localidades estuvieron caracterizadas por una filogenia en forma de estrella, con un solo haplotipo, identificado como el “haplotipo ancestral” o “haplotipo raíz” de cada una de las redes, el cual ha dado origen a algunos haplotipos derivados, de acuerdo a los criterios señalados por Crandall & Templeton (1993) y Castelloe & Templeton (1994). Los haplotipos ancestrales de las localidades en estudio correspondieron al haplotipo 29 para la localidad de Natal, Brasil; el haplotipo 1 para la localidad de las Marites y el haplotipo 07 para las localidades de la Restinga y el Golfo de Cariaco, respectivamente (Figura 27).

Slatkin & Hutson (1991), han señalado que las redes de haplotipos que presentan filogenias en forma de estrella son indicativas de una rápida expansión poblacional, y que las poblaciones caracterizadas por un haplotipo raíz muy abundante y muchos haplotipos raros cercanamente asociados, son “jóvenes” y se están expandiendo más rápidamente; a diferencia de poblaciones caracterizadas por un haplotipo raíz menos abundante con haplotipos derivados que difieren de éste por varias sustituciones de nucleótidos, las cuales pueden, en comparación con las anteriores ser consideradas más “viejas” y estables. En función del razonamiento anterior, podría entonces señalarse que las localidades de Natal, en Brasil y la Laguna de la Restinga, en Venezuela, parecieran evidenciar signos de expansión poblacional muy reciente, quizás derivados de contracciones poblacionales muy severas o prolongadas en el tiempo, mientras que las localidades de la Laguna de las Marites y el Golfo de Cariaco, en Venezuela, serían comparativamente más estables y los eventos de expansión poblacional ocurrieron hace mucho más tiempo.

En concordancia con lo anteriormente expuesto, los valores del estadístico Tau ( $\tau$ ), que indican hace cuanto tiempo se llevó a cabo la

expansión en cada una de las poblaciones (Tabla 10), corroboran dichos planteamientos, encontrándose que las localidades de la Laguna de las Marites y el Golfo de Cariaco mostraron los mayores valores, indicando una mayor antigüedad para la expansión poblacional, mientras que en las localidades de la Laguna de la Restinga y Natal este evento parece haberse originado más recientemente. Aunque los estimados de Tau ( $\tau$ ) no parecen apropiados para determinar la edad exacta de las poblaciones, debido a que estos están basados en un solo locus y con base en muestras relativamente pequeñas, Teske *et al.* (2005), señalan que estos valores pueden ser apropiados para comparar la edad relativa de las poblaciones.

Los indicios de expansión poblacional detectados por las redes de haplotipos en las localidades de estudio, fueron también confirmados mediante el análisis de las gráficas de la distribución mismatch (Figura 29), y los valores del índice de *Raggedness* (Tabla 10), cuyos valores de probabilidad no permitieron rechazar el modelo de expansión poblacional para ninguna de las localidades.

Adicionalmente, la utilización de la prueba  $F_s$  de  $F_u$ , permitió confirmar los indicios de expansión poblacional, sugeridos por los demás análisis para todas las localidades de muestreo (Tabla 11).  $F_u$  (1997), señala que esta prueba es particularmente sensible a desviaciones de la neutralidad en secuencias no-recombinantes, caracterizadas por una alta frecuencia de haplotipos raros y mutaciones recientes.

Por otra parte, a pesar de haberse identificado un haplotipo ancestral para cada una de las poblaciones a través de las redes de haplotipos construidas individualmente, la presencia del haplotipo 07 en todas en las localidades dentro del rango de estudio de la población de *Hippocampus reidi*, conjuntamente con elevados valores de probabilidad obtenidos por este haplotipo como grupo externo, permitirían proponer que es éste el haplotipo ancestral (HAP 07) para toda la población, dada la amplitud de su rango de distribución geográfica.

La organización de todos los haplotipos de la población en una red con forma de estrella presentada en la Figura 28, conjuntamente con la distribución mismatch unimodal (Figura 29E) y el valor negativo y altamente significativo de la prueba  $F_s$  de  $F_u$  ( $F_s = -28,43$ ;  $p = 0,000$ ), fueron consistentes con las evidencias de expansión poblacional encontradas individualmente en cada una de las poblaciones.

De ser este el caso, donde el haplotipo ancestral de toda la población se correspondiese con el haplotipo 07, sería lógico esperarse que este se encontrara bien representado en todas las localidades de muestreo, dada su mayor tiempo de permanencia en la región. No obstante, la distribución diferencial de las frecuencias de este haplotipo entre las diferentes localidades de estudio, conjuntamente con las evidencias de contracción y/o expansión poblacional, sugieren que la población de *Hippocampus reidi* en la región de estudio estuvo sometida a variaciones importantes de su tamaño poblacional a lo largo de su historia demográfica.

El análisis de clados anidados resultó en una jerarquía de solo tres pasos, la cual permitió corroborar la existencia de intercambio genético entre las localidades de la Laguna de las Marites y el Golfo de Cariaco, reflejada por el alto número de migrantes por generación entre esas localidades (Tabla 11) y los valores no significativos de la prueba  $F_{st}$  (Tabla 12), al no poder determinar asociación entre los haplotipos y la localidad geográfica para los clados 1-9, 1-15, 1-16, 1-18, 2-3, 2-5 y 3-2 (Figura 30), principalmente conformados por individuos pertenecientes a esas localidades.

Igualmente, permitió confirmar la hipótesis de flujo genético restringido con aislamiento por distancia, entre las localidades del nororiente de Venezuela y la localidad de Natal, siendo también capaz de evidenciar la ocurrencia de dispersión a larga distancia, demostrada por la presencia de un individuo de la localidad de Natal portador del haplotipo 07. Sin embargo, el bajo número de clados y la insuficiente resolución genética no permitieron

discriminar entre los eventos de expansión de rango de distribución por colonización y limitación al flujo genético por dispersión restringida.

En concordancia con lo encontrado en este estudio, Lourie *et al.* (2005), señalan en un estudio filogeográfico comparativo realizado entre las especies *H. kuda*, *H. barbouri*, *H. trimaculatus* e *H. spinosissimus* del sudeste asiático, que los patrones de dispersión restringida con aislamiento por distancia fueron detectados particularmente en los niveles bajos de los clados, mientras que los patrones de asociaciones significativas que permitieron realizar inferencias sobre fragmentación y/o colonización a larga distancia con el subsecuente aislamiento, fueron detectados en los niveles más altos de anidamiento.

Además, estos investigadores sugieren que al parecer existe cierta relación entre las fuerzas que determinan la estructura filogeográfica de las diferentes especies y su rango de distribución de profundidades, señalando que los eventos de fragmentación y/o colonización a larga distancia han estructurado principalmente las especies que se distribuyen en las aguas someras como *H. barbouri* e *H. kuda*, mientras que la dispersión restringida con aislamiento por distancia y expansión de rango han sido evidentemente más importantes en la determinación de la estructura poblacional de las especies de hábitos más relacionados con las aguas profundas como *H. spinosissimus* e *H. trimaculatus*.

#### **5.3.4.- Consideraciones Taxonómicas y para la Conservación.**

La existencia de inconsistencias en el establecimiento de las fronteras que delimitan la distribución de las especies y la ocurrencia de complejos de especies son un problema común en la sistemática de los organismos marinos (Avice, 1994). El hecho de que *Hippocampus reidi* e *H. erectus* presenten una amplia distribución a lo largo de la costa del océano Atlántico Occidental (Lourie *et al.*, 1999; 2004), sugiere la posibilidad de que los taxónomos tradicionales hayan sido muy conservadores en la delimitación

de las especies, aceptando como variaciones intraespecíficas ligeras diferencias sutiles que en la realidad pudieran corresponderse con especies diferentes (Sole-Cava, 2004) sobre todo en especies de difícil identificación como es el caso de un buen número de las especies que conforman el género *Hippocampus*, lo que se evidencia claramente en la amplia lista de sinonimias y el surgimiento reciente de muchas nuevas especies tales como: *Hippocampus waleananus* Gomon & Kuitert, 2009, *Hippocampus Tyro* Randall & Lourie, 2009 e *Hippocampus debelius* Gomon & Kuitert, 2009 (Froese y Pauly, 2010).

La consideración de que *H. erectus* podría consistir en un complejo de especies, ya ha sido señalada con anterioridad por Casey *et al.*, 2004, en función de los elevados valores de distancia genética (5,9%) encontrados entre una muestra identificada como procedente de Brasil y otras dos provenientes de los Estados Unidos, los cuales superan los valores de distancia esperados a nivel intraespecífico y sugieren la necesidad de utilizar un mayor número de ejemplares y profundizar los estudios filogenéticos a fin de resolver estas inconsistencias taxonómicas.

Con respecto a *H. reidi*, la situación no es muy diferente a la presentada por *H. erectus*, en esta especie los resultados de los análisis filogenéticos realizados por Casey *et al.*, 2004, han revelado que la distancia genética encontrada entre *H. reidi* y su especie hermana *H. algiricus*, distribuida en la costa oriental del océano Atlántico, fueron más bajas de lo esperado (1,3%), aproximándose a los valores de distancia encontrados a nivel intraespecífico (1,1%) en las especies *H. abdominalis*, *H. histrix* e *H. barbouri*.

Por otra parte, en un estudio filogenético realizado por Teske *et al.*, 2004, donde empleó dos muestras de *Hippocampus reidi*, una procedente de México y otra de Brasil (solo tejido proveniente del comercio para acuariofilia) se pudo constatar que el espécimen proveniente de México estuvo más cercanamente relacionado con la especie *H. ingens*, distribuida

en la costa oriental del océano Pacífico, mientras que la muestra de Brasil, estuvo más emparentada con *H. algiricus*.

En función de lo anterior y de acuerdo a las revisiones realizadas en la literatura (Vari, 1982; Cervigon, 1991; Lourie *et al.*, 1999; Lourie *et al.*, 2004) sobre las características de *H. reidi* e *H. algiricus*, se pudo constatar que estas especies no presentan casi ninguna diferencia en sus características merísticas, morfológicas, ni morfométricas, por lo que se deberán realizar nuevas revisiones taxonómicas, con base en otros marcadores moleculares y la utilización de un mayor número de especímenes, a fin de corroborar la validez de mantener esas dos especies separadas en entidades taxonómicas diferentes.

La habilidad para identificar las especies del género *Hippocampus* en el campo mediante el examen morfológico de sus características o el desarrollo métodos no destructivos de identificación, basados en marcadores moleculares, es un requerimiento clave para dirigir las acciones de conservación enfocadas hacia la preservación de estas especies. Ha sido estimado que al menos 20.000.000 de caballos marinos son explotados anualmente para satisfacer las demandas de la medicina china tradicional solamente, con grandes números de ejemplares también explotados para la fabricación de artesanías y como peces ornamentales (Vincent, 1996). Sin embargo, recientemente se ha observado un creciente interés por el mercado de estas especies en Latino América, en un reciente estudio realizado por Baum & Vincent (2005), fue detectado que 8 países de la región están involucrados directamente en la comercialización de caballos marinos secos hacia 10 diferentes países de Asia y norte América; mientras que 5 países latinoamericanos están involucrados en la comercialización de caballitos de mar vivos hacia 11 países de Europa, norte América y Asia, señalándose a Brasil como el principal exportador dentro de este renglón.

La correcta identificación de las especies es por lo tanto, un requerimiento urgente para dilucidar el impacto de esta explotación sobre

las especies individuales y para el desarrollo de programas de cría en cautiverio que contribuyan a disminuir la presión de extracción sobre las poblaciones naturales, así como para la apropiada evaluación de los cambios en los parámetros demográficos (Casey *et al.*, 2004).



## 6. CONCLUSIONES

- La gran variabilidad fenotípica conjuntamente con la amplia intergradación de caracteres merísticos, morfométricos y morfológicos sugiere que la identificación de las especies del género *Hippocampus* requiere de la utilización de varias variables conjuntamente para llegar a definir la especie correcta.
- Las variables merísticas morfométricas y morfológicas con mayor valor diagnóstico para la identificación correcta de las especies *Hippocampus reidi* e *Hippocampus erectus* fueron: la relación entre la longitud de la cabeza y la longitud del rostro (HL/SnL), la posición de los anillos prominentes dorsales, la convexidad y el ancho de la región torácica (TW9), la altura de la coroneta (CH) y la forma de la espina supraocular (ES).
- Los genes Citocromo Oxidasa I y Citocromo B demostraron ser útiles como marcadores moleculares para la identificación de las especies *Hippocampus reidi* e *Hippocampus erectus*.
- La utilización conjunta de las técnicas de taxonomía convencional y molecular permitió confirmar la presencia de solo dos especies en la región nororiental de Venezuela correspondientes a *Hippocampus reidi* e *Hippocampus erectus*.
- Se infiere la existencia de al menos dos linajes filogenéticos de la especie *Hippocampus reidi* en el área de estudio, el primero de ellos distribuido en la región correspondiente al Atlántico Sur Occidental, específicamente en la localidad de Natal, Brasil y el segundo en el nororiente de Venezuela en el Sur del Mar Caribe, específicamente en las localidades de la Laguna de la Restinga, Laguna de las Marites y el Golfo de Cariaco.

- La estructura genética de la población de *Hippocampus reidi* estuvo caracterizada por una divergencia genética moderada entre las localidades del nororiente de Venezuela y una divergencia genética muy alta entre la localidad de Natal y la región nororiental de Venezuela, lo cual sugiere que cada una de las localidades constituye una diferente unidad de manejo de acuerdo a lo indicado por Moritz (1994).
- Fue posible evidenciar que la población de la especie *Hippocampus reidi* ha pasado al menos por un evento de expansión poblacional, lo cual se refleja en cada una de las localidades de estudio y posiblemente esté relacionado con los cambios climáticos y geográficos históricos como los movimientos de las placas tectónicas y los cambios en el nivel del mar ocurridos durante el pleistoceno.
- Se detectó una correlación significativa entre las diferencias genéticas y las distancias geográficas para el rango de distribución entre las localidades sugiriendo que el flujo genético entre las poblaciones se da en función de las distancias, por lo que el Modelo de aislamiento por distancia sería el más adecuado para explicar la estructura genético poblacional determinada para la región. Sin embargo, a escala micro geográfica, cuando se consideraron solamente las localidades de la costa de Venezuela, no se detectó correlación significativa entre las distancias genéticas y las geográficas, por lo que la estructura genética a esta escala de comparación pudiese ser mejor explicada por el Modelo paso a paso (Stepping Stone).

## 7. RECOMENDACIONES

- Continuar invirtiendo esfuerzos en el estudio de la variabilidad genética de las especies *Hippocampus reidi* e *Hippocampus erectus* a lo largo de su rango de distribución, mediante la utilización de un mayor número de marcadores moleculares nucleares y mitocondriales a fin de colaborar a la resolución de las incertezas taxonómicas y conocer mejor los patrones de distribución de la variabilidad genética de sus poblaciones, para poder desarrollar planes de manejo adecuados que permitan la sobrevivencia de estas especies en el tiempo y el mantenimiento de nuestra biodiversidad.
- Realizar actividades de monitoreo ambiental de las poblaciones de *Hippocampus reidi* e *Hippocampus erectus* con la finalidad de levantar la información biológica, ecológica y demográfica de campo que permita interpretar mejor la situación real de sus poblaciones naturales.
- Realizar el seguimiento de las actividades de comercialización de las especies *Hippocampus reidi* e *Hippocampus erectus*, con la finalidad de conocer el origen de los individuos a comercializar (actividades de acuacultura y/o extracción del medio ambiente) para analizar y prevenir los posibles impactos que puedan generarse y dar cumplimiento a las regulaciones exigidas por el CITES y otras regulaciones nacionales e internacionales que se hayan suscrito.
- Desarrollar líneas de investigación dirigidas al cultivo de las especies *Hippocampus reidi* e *Hippocampus erectus* en cautiverio, con la finalidad de abastecer los requerimientos del comercio nacional e internacional de estas especies y disminuir la presión de extracción que sufren sus poblaciones naturales y los ecosistemas donde habitan.

## 8. BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., & Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Aris-Brosou, S. & Excoffier, L. 1996. The impact of population expansion and mutation heterogeneity on DNA sequences polymorphism. *Molecular Biology and Evolution.* 13: 494 – 504.
- Avise, J.C. 1986. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Phil Trans Roy Soc London B.* 312: 325-342.
- Avise, J.C. 1994. *Molecular markers, natural history and evolution.* Chapman & Hall. New York. 511 pp.
- Avise, J.C. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species.* Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. 447 pp.
- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A. & Sauders, N.C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann Rev Ecol Syst.* 18: 489-522.
- Baum, J. & Vincent, A. 2005. Magnitude and inferred impacts of the seahorse trade in Latin America. *Environmental Conservation.* 32(4): 305-319.
- Baum, J., Meeuwig, J. & Vincent, A. 2003. Bycatch of lined seahorses (*Hippocampus erectus*) in a Gulf of Mexico shrimp trawl fishery. *Fishery Bulletin* 101(4): 721-731.
- Beheregaray, L.B., Ciofi, C., Caccone, A., Gibbs, J.P. & Powell, J.R. 2003. Genetic divergence, phylogeography and conservation units of giant tortoises from Santa Cruz and Pinzón, Galapagos Islands *Conserv Genti.* 4: 31-46.
- Beheregaray, L.B., Sunnucks, P. & Briscoe, D.A. 2002. A rapid fish radiation associated with the last sea-level changes in southern Brazil: The silverside *Odontesthes perugiae* complex. *Proc. R. Soc. London B.* 269: 65-73.

- Bell, E., Lockyear, J. & McPherson, J. 2003. First field studies of an endangered South African seahorse, *Hippocampus capensis*. *Environmental Biology of Fishes* 67: 35-46.
- Bermingham, E. & Avise, J.C. 1986. Molecular zoogeography of freshwater fishes in the southeastern United States. *Genetics*. 113: 939-965.
- Bijukumar, A., Abraham, K. & Soumya, D. 2008. Morphometry and meristics of longnose seahorse *Hippocampus trimaculatus* (Actinopterygii; Syngnathidae), from Kerala, South West coast of India. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*. 38 (2): 149-155.
- Billington, N. & Herbert, P. 1991. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. *Can J Fish Aquat Sci*. 48: 80-94.
- Bonhomme, F., Naciri, M., Bahri-Sfar, L. & Lemaire, C. 2002. Comparative analysis of genetic structure of two species of marine fish *Dicentrarchus labrax* and *Dicentrarchus punctatus*. *C. R. Biol.* 325: 213-220.
- Bookstein, F. L. 1991. Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. Cambridge Univ. Press. New York, 435 pp.
- Broughton, R.E. & Dowling, T.E. 1994. Length variation and mitochondrial DNA of the minnow *Cyprinella spilopleura*. *Genetics*. 138: 179-190.
- Brown, B.L. & Chapman, R.W. 1991. Gene flow and mitochondrial DNA variation in the killifish *Fundulus heteroclitus*. *Evolution*. 45:1147-1161.
- Brown, W.M., George, M. Jr. & Wilson, A.C. 1979. Rapid evolution of animals mitochondrial DNA. *Proc Natl Acade Sci USA*. 76: 1967-1971.
- Carvalho, G.R. & Hauser, L. 1998. Molecular genetics and the stock concept in fisheries. *Fish Biology*. 4: 326-350.
- Casey, S.P., Hall, H.J., Stanley, H.F. & Vincent, A.C. 2004. The origin and evolution of seahorses (genus *Hippocampus*): a phylogenetic study using cytochrome b gene of mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 30: 261 - 272.
- Castelloe, J. & Templeton, A.R. 1994. Root probabilities for intraspecific gene trees under neutral coalescent theory. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 3: 102-113.

- CDB. 1992. Convenio sobre la diversidad biológica. World Wide Web electronic publication. <http://www.biodiv.org>.
- Cervigón, F. 1966. Los Peces Marinos de Venezuela. Fundación La Salle de Ciencias Naturales. Monografías 11 y 12. 951 pp.
- Cervigón, F. 1973. Los Peces marinos de Venezuela. Complemento III. Contribuciones Científicas. N°4. Universidad de Oriente, Núcleo Nueva Esparta. 70 pp.
- Cervigón, F. 1991. Los Peces Marinos de Venezuela. Volumen I. Fundación Científica Los Roques. Caracas, Venezuela. 349 pp.
- CITES, 2002. Conservación de los Caballitos de Mar y otros Miembros de la Familia Syngnathidae. Duodécima Reunión de la Conferencia de las Partes. Santiago, Chile. 20 pp.
- Clayton, D.A. 1982. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell*. 28: 693-705.
- Clement, M., Posada, D. & Crandall, K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*. 9: 1657-1659.
- Coltman, D.W. 2005. Differentiation by dispersal. *Nature*. 433: 23-24.
- Crandall, K.A. & Templeton, A.R. 1993. Empirical test of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics*. 134: 959-969.
- Curtis, J. 2006. A case of mistaken identity: skin filaments are unreliable for identifying *Hippocampus guttulatus* and *Hippocampus hippocampus*. *Journal of Fish Biology*. 69: 1855-1859.
- Curtis, J., Moreau, M., Marsden, D., Bell, E., Martin-Smith, K., Samoilys, M. & Vincent, A. 2004. Underwater visual census for seahorse population assessment. Project seahorse technical report No. 8. Project Seahorse, Fisheries Centre, University of British Columbia. Vancouver, Canadá. 28 pp.
- Desjardins, P. & Morais, R. 1990. Sequence and organization of the chicken mitochondrial genome. A novel gene order in higher vertebrates. *J. Mol. Biol.* 212: 599-634.
- Dias, T., Rosa, I. & Baum, J. 2002. Threatened fishes of the world: *Hippocampus erectus* Perry, 1810 (Syngnathidae). *Environmental*

- Biology of Fishes. 65: 326.
- Dominguez, O. & Vázquez, E. 2009. Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal Biodiversity and Conservation*. 32(1): 59-70.
- Duminil, J., Fineschi, S., Hampe, A., Jordano, P., Salvini, D., Vendramin, G. & Petit, R. 2007. Can population genetic structure be predicted from life history traits?. *The American Naturalist*. 169 (5): 662-672.
- Emmanuel, M.J. 2006. Análise filogeográfica da variação genética intraespecífica do cavalo marinho *Hippocampus reidi* ao longo da costa brasileira. Dissertação de Maestrado. Universidade Federal de Sao Carlos, Brasil. 69 pp.
- Emerson, B.C., Paradis, E. & Thébaud, C. 2001. Revealing the demographic histories of species using DNA sequences. *Trends in Ecology & Evolution*. 16: 707-716.
- Excoffier, L., Smouse, P.E. & Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 131: 479-491.
- Excoffier, L.G. & Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*. 1: 47-50.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 39: 783-791.
- Felsenstein, J. 2004. *Inferring phylogenies*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, 664 pp.
- Ferris, S.D. & Berg, W.J. 1987. The utility of mitochondrial DNA in fish genetics and management. In: *Population Genetics and Fisheries Management* (Ryman, N. and Utter, F., eds.). University of Washington Press Seattle WA. 277-301.
- Foster, S. & Vincent, A. 2004. Life History and Ecology of Seahorses: Implications for Conservation and Management. *Journal of Fish Biology*. 65: 1 - 61.
- Foster, S. & Vincent, A. 2005. Enhancing sustainability of the international trade in seahorses with a single minimum size limit. *Conservation*

- Biology. 19(4): 1044-1050.
- Frankham, R., Ballou, J.D. & Briscoe, D.A. 2008. Fundamentos de Genética da Conservação. Editora Sociedade Brasileira de Genética. Riberão Preto, Brasil. 262 pp.
- Freeland, J. R. 2005. Molecular Ecology. John Wiley & Sons, Ltd. England. 388 pp.
- Fritzsche, R.A. 2002. Order Gasterosteiformes: Syngnathidae. In: Carpenter, K.E. (ed.). The living marine resources of the Western Central Atlantic. Vol. 2: Bony fishes, part 1 (Acipenseridae to Grammatidae). FAO Species identification guide for fishery purposes and American Society of Ichthyologist and Herpetologist Special Publication. N°5: 1221-1225.
- Froese, R. & D. Pauly, Editores. 2010. FishBase. World Wide Web electronic publication. <http://www.fishbase.org>
- Fu, Y.X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics. 147: 915-925.
- Fu, Y.X. & Li, W.H. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. Genetics, 133: 693-709.
- Funk, D.J. & Omland, K.E. 2003. Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. Annual Review of Ecology and Systematics. 34: 397-423.
- Galetti Jr., P.M., Rodrigues, F.P., Sole-Cava, A.M., Miyaki, C.Y., Carvalho, D., Eizirik, E., Veasey, E.A., Santos, F.R., Farias, I.P, Vianna, J.A., Oliveira, L.R., Weber, L.I., Almeida-Toledo, L.F., Francisco, M.R., Redondo, R.A., Siciliano, F., Del Lama, S.N. Freitas, T.R., Hrbek, T., & Molina, W. 2008. Genética da Conservação na Biodiversidade Brasileira. Pp. 199-229. En: Fundamentos de Genética da Conservação. Frankham, R., Ballou, J.D. & Briscoe, D.A. Editora SBG. 280 pp.
- Garrick-Maidment, N. 1998. A note on the status of indigenous species of sea horse. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. 78: 691-692.



- Gillenstein, U.B., Wharton, D., Josefsson, A. & Wilson, A.C. 1991. Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature*. 352:255-257.
- Ginsburg, I. 1933. Description of five new species of seahorse. *Journal of the Washington Academy of Sciences*. 23(12):561-562.
- Goffredo, S., Piccinetti, C. & Zaccanti, F. 2004. Volunteers in marine conservation monitoring : a study of the distribution of seahorses carried out in collaboration with recreational scuba divers. *Conservation Biology*. 18(6): 1492-1503.
- Graves, J.E. 1998. Molecular insights into the population structures of cosmopolitan marine fishes. *J. Hered.* 89:427-437.
- Guindon, S. & Gascuel, O. 2003. A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*. 52(5): 696-704.
- Hall, B.G. 2004. Comparison of the accuracies of several phylogenetic methods using protein and DNA sequences. *Molecular Biology and Evolution*. 22 (3): 792 – 802.
- Hammer, Ø., D.A. HarperARPER & P. D. RyanYAN. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*. 4 (1): 1-9.
- Harpending, H.C., Sherry, S.T., Rogers, A.R. & Stoneking, M. 1993. Genetic structure of ancient human populations. *Curr. Anthropol.* 34: 483-496.
- Harper, J.L. & Hawksworth, D.L. 1994. Biodiversity: measurement and estimation. *Phil.Trans.Roy.Soc.Lond. B*. 345: 5-12.
- Harrison, G.R. 1989. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends Ecol. Evol.* 4: 6-11.
- Hartl, D. 2000. A primer of population genetics. Third edition. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts, USA. 221 pp.
- Hartl, D.L. & Clark, A.G. 1997. Principles of population genetics. Sinauer Associates, Sunderland, M.A. 542 pp.
- Hasegawa, M., Kishino, K. & Yano, T. 1985. Dating the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*. 22: 160-174.

- Hebert, P.D., Cywinska, A., Ball, S.L. & Waard, J.D. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings Royal Society of London. Series B.* 270: 313-321.
- Hebert, P.D.; Ratnasingham, S. & Waard, J.D. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. *Royal Society of London. Series B.* 270: 896-899.
- Hewitt, G. 2000. The genetic legacy of the quaternary ice ages. *Nature.* 405: 907-913.
- Hey, J. & Machado, C.A. 2003. The study of structured populations – new hope for a difficult and divided science. *Genetics.* 4: 535-543.
- Hoeh, W.R., Blakley, K.H. & Brown, W.M. 1991. Heteroplasmy suggests limited biparental inheritance of *Mytilus* mitochondrial DNA. *Science.* 251: 1488-1490.
- Hoelzel, A.R. 1993. Evolution by DNA turnover in the control region of vertebrate mitochondrial DNA. *Curr. Opin. Geneti. Dev.* 3: 891-895.
- Hudson, R.R. 1990. Gene genealogies and the coalescent process. En: Futuyma, D. & Antonovics J. (eds). *Oxford surveys in evolutionary biology:* 1-44. Oxford University Press, Oxford U.K.
- Hudson, R.R. 1998. Island models and the coalescent process. *Molecular Ecology.* 7: 413-418.
- Hudson, R.R., Slatkin, M. & Maddison, W.P. 1992. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics.* 132: 583-589.
- Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics.* 17: 754-755.
- Ihssen, P.E., Booke, H.E., Casselman, J.M. McGlade, J.M., Payne, H.R. & Utter, F.M. 1981. Stock identification: materials and methods. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 38: 1838-1855.
- IUCN. 2003. The IUCN Red List of Threatened Species, IUCN, Gland, Switzerland. World Wide Web electronic publication. <http://www.redlist.org>.
- Janke, A., Feldmaier-Fuchs, G., Thomas, K., Von Haeseler, A. & Pääbo, S. 1994. The marsupial mitochondrial genome and the evolution of placental mammals. *Genetics.* 137: 243-257.

- Kawahara, R., Miya, M., Mabuchi, K., Lavoué, S., Inoue, J., Satoh, T., Kawaguchi, A. & Nishida, M. 2008. Interrelationships of the 11 gasterosteiform families (Sticklebacks, pipefish, and their relatives): A new perspective based on whole mitogenome sequences from 75 higher teleost. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 46: 224-236.
- Kimura, M. & Weiss, G.H. 1964. The stepping-stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics* . 49: 561-574.
- Knowles, L. & Maddison, W.P. 2002. Statistical phylogeography. *Molecular Ecology*. 11: 2636-2635.
- Kondo, R., Satta, Y., Matsuura, E.T., Ishima, H., Takahata, N. & Chigusa, S.I. 1990. Incomplete maternal transmission of mitochondrial DNA in *Drosophila*. *Genetics*. 126: 657-663.
- Kuiter, R. 2001. Revision of the Australian seahorses of the genus *Hippocampus* (Syngnathiformes: Syngnathidae) with descriptions of nine new species. *Records of the Australian Museum*. 53: 293-340.
- Kuiter, R.H. 2000. Seahorses, pipefishes and their relatives: Pictorial guide to Syngnathiformes. Chorleywood, U.K. TMC Publishing. 119 pp.
- Kuusipalo, L. 1999. Genetic differentiation of endemic Nile perch *Lates stappersi* (Centropomidae, Pisces) populations in Lake Tanganika suggested by RAPD markers. *Hydrobiologia*. 407: 141-148.
- Kvarnemo, C., Moore, G., Jones, A., Nelson, W. & Avise, J. 2000. Monogamous pair bonds and mate switching in the Western Australian seahorse, *Hippocampus subelongatus*. *Journal of Evolution and Biology*. 13: 882-888.
- Lacy, R.C. & Lindenmayer, D.A. 1995. Simulation study of the impacts of population subdivision on the mountain brushtail possum *Trichosurus caninus* Ogilby (Phalangeridae: Marsupialia), in South-Eastern Australia. II. Loss of genetic variation within and between subpopulations. *Biological Conservation*. 73: 131-42.
- Levy, J.A. & Cassano, V.P.F. 1994. Biochemical-genetic comparison of *Cynoscion jamaicensis* and *Cynoscion striatus* (Teleostei: Perciformes: Scianidae) in South Brazil. *Comparative Biochemistry and Physiology*.

107 (4): 515-517.

- Li, M., Wei, F., Goossense, B., Freng, Z., Tamate, H.B., Bruford, M.W. & Funk S.M. 2005. Mitochondrial filogeography and subspecific variation in the red panda (*Ailurus fungens*): Implication for conservation. *Mol. Phylogenet. Evol.* 36: 78-89.
- Librado, P. & Rozas, J. 2009. DnaSP v.5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics.* 25: 1451-1452.
- Liu, H., Mitton, J. & Wu, S. 1996. Parental mitochondrial DNA differentiation far exceeds maternal mitochondrial DNA and allozyme differentiation in the freshwater mussel, *Anodonta grandis grandis*. *Evolution.* 50: 952-957.
- Lourie, S.A, Foster, S., Cooper, E. & Vicent, A. 2004. A guide to the identification of seahorses. Project seahorses & TRAFFIC North America. Washington, D.C. University of British Columbia and World Wildlife Fund. 120 pp.
- Lourie, S.A., Vincent A.C. & Hall, H.J. 1999. Seahorses: An identification guide to the world's species and their conservation. London, Project Seahorse, 214 pp.
- Lourie, S. & Vincent, A.C. 2004. A marine fish follows Wallace's Line: the phylogeography of the three-spot seahorse (*Hippocampus trimaculatus*, Syngnathidae, Teleostei) in Southeast Asia. *Journal of Biogeography.* 31: 1975 -1985.
- Lourie, S., Green, M. & Vincent, A.C. 2005. Dispersal habitat differences, and comparative phylogeography of Southeast Asian seahorses (Syngnathidae: *Hippocampus*). *Molecular Ecology.* 14: 1073 – 1094.
- Macey, J.R., Larson, A., Ananjeva, N., Fang, Z. & Papenfuss, T.J. 1997. Two novel gene orders and the role of light-strand replication in rearrangement of the vertebrate mitochondrial genome. *Mol. Biol. Evol.* 14: 91-104.
- Macey, J.R., Schulte, J.A., Larson, A., Fang, Z., Wang, Y., Tuniyev, B.S., Papenfuss, T.J. 1998. Phylogenetic relationships of toads in the *Bufo bufo* species group from the eastern escarpment of the Tibetan Plateau: a case of vicariance and dispersal. *Mol. Phylogenet. Evol.* 9:

80-87.

- Mago, F.L. 1970. Lista de los peces de Venezuela, incluyendo un estudio preliminar sobre ictiogeografía del país. Ministerio de Agricultura y Cria, Oficina Nacional de Pesca. Caracas – Venezuela. 283 pp.
- Mardia, K.V, Kent, J.T. & Bibby, J.M. 1995. Multivariate Analysis. 10<sup>a</sup> ed. Academic Press, INC. U.S.A., 519 pp.
- MARN, 2001. Estrategia nacional sobre diversidad biológica y su plan de acción. Oficina Nacional de Diversidad Biológica. Caracas, Venezuela. 135 pp.
- Martin-Smith, K. & Vincent, A. 2005. Seahorse declines in the Derwent Estuary, Tasmania in the absence of fishing pressure. *Biological Conservation*. 123: 533-545.
- Martin-Smith, K., Meeuwig, M., Samoilys, J., & Vincent, A. 2004. Collaborative Development of Management Options for an Artisanal Fishery for Seahorses in the Central Phillipines. *Ocean and Coastal Management*. 47: 165–193.
- McCracken, K.G. & Sorensen, M.D. 2005. Is homoplasy or lineage sorting the source of incongruent mtDNA and nuclear gene trees in the stiff-tailed ducks (*Nomonyx-Oxyura*)?. *Systematic Biology*. 54: 35-55.
- Miya, M. & Nishida, M. 1999. Organization of the mitochondrial genome of a deep-sea fish, *Gonostoma gracile* (Teleostei: Stomiiformes) first example of transfer RNA gene rearrangements in bony fishes. *Mar. Biotechnol.* 1: 416-426.
- Monteiro-Neto, C., Cunha, F.E.A., Nottingham, M.C., Araujo, M.E., Rosa, I.L. & Barros, G.M.L. 2003. Analysis of the marine ornamental fish trade at Ceara State, Northeast Brazil. *Biodiversity. And Conservation*. 12(6): 1287-1295.
- Moore, W.S. 1995. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution*. 49: 718-726.
- Moritz, C., Dowling, T.E. & Brown, W.M. 1987. Evolution of animals mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Ann. Rev. Eol. Syst.* 18: 269-292.

- Nei, M. & Kumar, S. 2000. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, New York, USA. 333 pp.
- Nei, M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press. New York.
- Nelson, J.S. 2006. Fishes of the World. 3<sup>a</sup> ed. John Wiley & Sons, INC. U.S.A. 622 pp.
- Nordborg, M. 2000. Coalescent theory. En: Balding D., Bishop, M. & Cannings, C. (eds). Handbook of statistical genetics: 1-37. John Wiley & Sons, London, United Kingdom.
- Ong, T.L., Stabile, J., Wirgin, I. & Waldman, J.R. 1996. Genetic divergence between *Acipenser oxyrinchus* and *A. o. desotoi* as assessed by mitochondrial sequencing analysis. *Copeia*. 464-469.
- Ortí, G., Petry, P., Porto, J.I.R., Jégo, M. & Meyer, A. 1996. Patterns of nucleotide change in mitochondrial ribosomal RNA genes and the phylogeny of piranhas. *J. Mol. Evol.* 42: 169-182.
- Pääbo, S., Thomas, W.K., Whitfield, K.M., Kumazawa, Y. & Wilson, A.C. 1991. Rearrangement of mitochondrial transfer RNA genes in marsupials. *J. Mol. Evol.* 33: 426-430.
- Panchal, M. 2007. The automation of Nested Clade Phylogeographic Analysis. *Bioinformatics*, 23: 509-510.
- Perante, N., Pajaro, M., Meeuwig, J. & Vincent, A. 2002. Biology of a seahorse species, *Hippocampus comes* in the Central Philippines. *Journal of Fish Biology*. 60: 821-837.
- Perry, G. 1810. Arcana, for the museum of natural history.. 45pp.
- Pestano, J. & Brown, R.P. 1999. Geographical structuring of mitochondrial DNA in *Chalcides sexlineatus* within the island of Gran Canaria. *Proc. R. Soc. Lond. Serie B*. 266: 805-812.
- Petit, R.J., Aguinagalde, I., De Beaulieu, J.L., Bittkau, C., Brewer, S., Cheddadi, R. & Ennos, 2003. Glacial refugia hotspot but not melting pots of genetic diversity. *Science*. 300: 1563-1565.
- Poortenaar, C., Woods, C., James, P., Giambartolomei, F. y Lokman, P. 2004. Reproductive biology of female big-bellied seahorses. *Journal of Fish Biology*. 64: 717-725.

- Posada D. & Crandall, K.A. 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology & Evolution*. 16: 37-45.
- Posada, D. & Crandall, K.A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14 (9): 817-818.
- Posada, D., Crandall, K.A. & Templeton, A.R. 2000. GeoDis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Mol. Ecol.* 9: 487-488.
- Quinn, T.W. & Mindell, D.P. 1996. Mitochondrial gene order advanced two the control region in crocodile, turtle and tuatara. *Mol. Phylogenet. Evol.* 5: 344-351.
- Raymond, M. & Rousset, F. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution*. 49: 1280-1283.
- Reed, R.D. & Sperling, F.A. 1999. Interactions of process partitions in phylogenetic analysis: an example from the swallowtail butterfly genus *Papilio*. *Molecular Biology and Evolution*. 16: 286-297.
- Rogers, A.R. & Harpending, H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* 9: 552-569.
- Rohlf, F. J. 2004a. tpsUtil, file utility program. version 1.26. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
- Rohlf, F. J. 2004b. tpsDig, digitize landmarks and outlines, version 2.0. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
- Román, B. 1980. Peces Marinos de Venezuela. Sociedad de Ciencias Naturales la Salle. 409 pp.
- Rubinoff, D. 2005. Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. *Conservation Biology*. 20(4): 1026-1033.
- Saitoh, K., Miya, M., Inoue, J.G., Ishiguro, N.B. & Nishida, M. 2003. Mitochondrial genomes of ostariophysan fishes: Perspectives on phylogeny and biogeography. *J. Mol. Evol.* 56: 464-472.
- Saitou, N. & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Salin, K., Yohannan, T. & Mohanakumaran, C. 2005. Fisheries and trade of seahorses, *Hippocampus spp.*, in Southern India. *Fisheries*

- Management and Ecology. 12: 269-273.
- Sanetra, M. & Crozier, R.H. 2003. Patterns of population subdivision and gene flow in the ant *Nothomyrmecia macrops* reflected in microsatellite and mitochondrial DNA markers. Mol. Ecol. 12: 2281-2295.
- Sivasundar, A., Bermingham, E. & Orti, G. 2001. Population structure and geography of migratory freshwater fishes (Prochilodus: Characiformes) in major South american rivers. Mol. Ecol. 10: 407-417.
- Slatkin, M. 1985. Gene flow in natural populations. Ann. Rev. Ecol. Syst. 16: 393-430.
- Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. Science. 236: 787-792.
- Slatkin, M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium population. Evolution. 47: 264-279.
- Smith, P.J., Jamieson, A. & Birley, A.J. 1990. Eletrophoretic studies and stock concept in marine teleosts. J. Cons. Int. Explor. Mer. 47: 231-328.
- Sole-Cava, A. 2004. Biodiversidade molecular e genética da conservação. pp. 177-192. En.: Biologia Molecular e Evolução. Russo Matioli, S (Ed.) Holos Editora, Ltda. Brasil. 202 p.
- Stepien, C.A. & Faber, J.E. 1998. Population genetic structure, philogeography and spawning philopatry in walleye (*Stizostedion vitreum*) from mitochondrial DNA control region sequences. Mol. Ecol. 7: 1757-1769.
- Stoeckle, M. 2003. Taxonomy, DNA, and the barcode of life. BioScience. 53: 2-3.
- Strauss, E. 1999. Can mitochondrial clocks keep time? Science. 283:1435-1438.
- Suñe, M. 2003. Caracterização genético-molecular da biodiversidade. Capítulo 11. En: Kanan, E. (Org.). Diagnóstico Genético-Molecular. p. 259-282. Editora da Universidade Luterana do Brasil, Canoas, Brasil. 371 pp.
- Swofford, D.L. 2002. PAUP\* - Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Version 4b10. Sinauer, Sunderland. 128 pp.



- Swofford, D.L., Olsen, G.J., Waddell, P.J. & Hillis, D.M. 1996. Phylogenetic inference. IN: Molecular Systematics. (Hillis, D.M, Moritz, C., Mable, B.K., eds). Sinauer Associates, Inc., Massachusetts, USA, 407-514 pp.
- Szymura, J.M., Spolsky, C. & Uzzell, T. 1986. Concordant change in mitochondrial and nuclear gene in a hybridzone between two frog species (genus *Bombina*). *Experientia*. 41: 1469-1470.
- Tajima, F. 1983. Evolutionary relationship of ADN sequences in finite populations. *Genetics*. 105: 437-460.
- Tajima, F. 1989. Statistical-method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 123: 585-595.
- Tamura, K. 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C content biases. *Mol. Biol. Evol.* 9: 678-687.
- Tajima, F. 1996. The amount of DNA polymorphism maintained in a finite population when neutral mutation rate varies among sites. *Genetics*. 143: 1457 - 1465.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 24: 1596-1599.
- Templeton, A. 2004. Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology*. 13: 789-809.
- Templeton, A. 2008. Nested clade analysis: an extensively validated method for strong philogeographic inference. *Molecular Ecology*. 17: 1877-1880.
- Templeton, A.R. & Sting, C.F. 1993. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analyses with cladograms uncertainty and recombination. *Genetics*. 134: 659-669.
- Templeton, A.R., Boerwinkle, E. & Sing, C.F. 1987. A cladistic analysis of phenotypic association with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. *Genetics*. 117: 343-351.
- Templeton, A.R., Crandall, K.A. & Sing, C.F. 1992. A cladistic analysis of

- phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*. 132: 619-633.
- Templeton, A.R., Routman, E., & Phillips, C. 1995. Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics*. 140:767-782.
- Teske, P., Hamilton, H., Mathee, C. & Barker, N.P. 2007. Signatures of seaway closures and founder dispersal in the phylogeny of a circumglobally distributed seahorse lineage. *BMC Evolutionary Biology*. 7:138-155
- Teske, P.R., Cherry, M.I. & Matthee, C. 2004. The evolutionary history of seahorses (Syngnathidae: *Hippocampus*): molecular data suggest a West Pacific origin and two invasions to the Atlantic Ocean. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 30: 273-286.
- Teske, P.R., Hamilton, H., Palbolll, P.J., Choo, C.K., Gabr, H., Lourie, S., Santos, M., Sreepada, A., Cherry, M.I. & Matthee, C. 2005. Molecular evidence for long distance colonization in an Indo-Pacific seahorse lineage. *Marine Ecology Progress Series*. 286: 249-260.
- Teske, P.R., M.I. Cherry, M.I. y& C.A. Matthee, C.A.. 2003. Population genetics of the endangered Knysna seahorse, *Hippocampus capensis*. *Molecular Ecology*,. 12: 1703-1715
- Thacker, C.E. 2003. Molecular phylogeny of the gobioid fishes (Teleostei: Perciformes: Gobioidaei). *Mol. Phyl. Evol.* 26: 354-368.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22: 4673-4680.
- Valdéz, J. & Aguilera, O. 1987. Los Peces del Golfo de Venezuela. Fondo Editorial CONICIT. Caracas – Venezuela. 215 pp.
- Vari, R.P. 1982. The seahorses (subfamily Hippocampinae). *Fishes of the western North Atlantic*. *Mem. Sears Found. Mar. Res.* 1(8): 173-189.
- Vásquez, E. 2007. Filogeografía y vertebrados. En: Eguiarte, L.; Souza, V. &

- Aguirre, X. (Comp.). *Ecología Molecular*. p. 441-466. Instituto Nacional de Ecología – CONABIO. Mexico, DF. 592 pp.
- Vázquez, E., Castañeda, S., Garrido, T. & Gutierrez, T. 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.
- Vincent, A.C. 1996. *The international trade in seahorses*. TRAFFIC International, Cambridge, U.K.
- Ward, R.D., Woodswark, M. & Skibinski, D.O.F. 1995. A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. *Journal of Fish Biology*. 44: 48-52.
- Whitlock, M.C. & McCauley, D.E. 1999. Indirect measures of gene flow and migration:  $F_{ST} \approx 1/(4Nm+1)$ . *Heredity*. 82: 117-125.
- Wood, E.M. 2001. *Collection of coral reef fish for aquaria global trade, conservation issues and management strategies*. Marine Conservation Society, Ross on Wye, U.K. 80 pp.
- World Conservation Monitoring Centre (WCMC). 2002. *Global Marine aquarium database*. World Wide Web electronic publication. <http://www.unep-wcmc.org/marine/GMAD/description.html>.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*. 15: 323-354.
- Wright, S. 1978. *Evolution and the genetics of populations*. Genetics. University of Chicago Press, Chicago.
- Xia, X., & Xie, Z. (2001). DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *J. Heredity*. 92: 371-373.
- Zouros, E.; Freeman, K.R.; Ball, A.O. & Pogson, G.H. 1992. Direct evidence for extensive paternal mitochondrial DNA inheritance in the marine mussel *Mytilus*. *Nature*. 359: 412-414.

# ANEXOS

























	810	820	830	837
HrHap. 1 (19)	CTCAATTTTA	GTGTTAATAC	TAGTTCCAAT	CCTCCAC
HrHap. 2 (4)	CTCAATTTTA	GTGTTAATAC	TAGTTCCAAT	CCTCCAC
HrHap. 3 (1)	CTCAATTTTA	GTGTTAATAC	TAGTTCCAAT	CCTCCAC
HrHap. 4 (1)	CTCAATTTTA	GTGTTAATAC	TAGTTCCAAT	CCTCCAC
HrHap. 5 (1)	CTCAATTTTA	GTGTTAATAC	TAGTTCCAAT	CCTCCAC
HrHap. 6 (2)	CTCAATTTTA	GTGTTAATAC	TAGTTCCAAT	CCTCCAC
HrHap. 7 (36)	CTCAATTTTA	GTGTTAATAC	TAGTTCCAAT	CCTCCAC
HrHap. 8 (1)	CTCAATTTTA	GTGTTAATAC	TAGTTCCAAT	CCTCCAC
HrHap. 9 (1)	CTCAATTTTA	GTGTTAATAC	TAGTTCCAAT	CCTCCAC
HrHap. 10 (1)	CTCAATTTTA	GTGTTAATAC	TAGTTCCAAT	CCTCCAC
HrHap. 11 (1)	CTCAATTTTA	GTGTTAATAC	TAGTTCCAAT	CCTCCAC
HrHap. 12 (1)	CTCAATTTTA	GTGTTAATAC	TAGTTCCAAT	CCTCCAC
HrHap. 13 (1)	CTCAATTTTA	GTGTTAATAC	TAGTTCCAAT	CCTCCAC
HrHap. 14 (3)	CTCAATTTTA	GTGTTAATAC	TAGTTCCAAT	CCTCCAC
HrHap. 15 (1)	CTCAATTTTA	GTGTTAATAC	TAGTTCCAAT	CCTCCAC
HrHap. 16 (3)	CTCAATTTTA	GTGTTAATAC	TAGTTCCAAT	CCTCCAC
HrHap. 17 (1)	CTCAATTTTA	GTGTTAATAC	TAGTTCCAAT	CCTCCAC
HrHap. 18 (1)	CTCAATTTTA	GTGTTAATAC	TAGTTCCAAT	CCTCCAC
HrHap. 19 (3)	CTCAATTTTA	GTGTTAATAC	TAGTTCCAAT	CCTCCAC
HrHap. 20 (1)	CTCAATTTTA	GTGTTAATAC	TAGTTCCAAT	CCTCCAC
HrHap. 21 (1)	CTCAATTTTA	GTGTTAATAC	TAGTTCCAAT	CCTCCAC
HrHap. 22 (1)	CTCAATTTTA	GTGTTAATAC	TAGTTCCAAT	CCTCCAC
HrHap. 23 (1)	CTCAATTTTA	GTGTTAATAC	TAGTTCCAAT	CCTCCAC
HrHap. 24 (1)	CTCAATTTTA	GTGTTAATAC	TAGTTCCAAT	CCTCCAC
HrHap. 25 (1)	CTCAATTTTA	GTGTTAATAC	TAGTTCCAAT	CCTCCAC
HrHap. 26 (1)	CTCAATTTTA	GTGTTAATAC	TAGTTCCAAT	CCTCCAC
HrHap. 27 (1)	CTCAATTTTA	GTGTTAATAC	TAGTTCCAAT	CCTCCAC
HrHap. 28 (1)	CTCAATTTTA	GTGTTAATAC	TAGTTCCAAT	CCTCCAC
HrHap. 29 (22)	CTCAATTTTA	GTGTTAATAC	TAGTTCCAAT	CCTCCAC
HrHap. 30 (1)	CTCAATTTTA	GTGTTAATAC	TAGTTCCAAT	CCTCCAC
HrHap. 31 (1)	CTCAATTTTA	GTGTTAATAC	TAGTTCCAAT	CCTCCAC
HrHap. 32 (1)	CTCAATTTTA	GTGTTAATAC	TAGTTCCAAT	CCTCCAC
HrHap. 33 (2)	CTCAATTTTA	GTGTTAATAC	TAGTTCCAAT	CCTCCAC
HrHap. 34 (1)	CTCAATTTTA	GTGTTAATAC	TAGTTCCAAT	CCTCCAC
HrHap. 35 (1)	CTCAATTTTA	GTGTTAATAC	TAGTTCCAAT	CCTCCAC
HrHap. 36 (1)	CTCAATTTTA	GTGTTAATAC	TAGTTCCAAT	CCTCCAC
HrHap. 37 (1)	CTCAATTTTA	GTGTTAATAC	TAGTTCCAAT	CCTCCAC
HelM01.2	CTCAATCTTA	GTATTGATAC	TCGTTCCCAAT	TCTCCAC
HelM02.2	CTCAATCTTA	GTATTGATAC	TCGTTCCCAAT	TCTCCAC
HelM03.2	CTCAATCTTA	GTATTGATAC	TCGTTCCCAAT	TCTCCAC
HelM04.2	CTCAATCTTA	GTATTGATAC	TCGTTCCCAAT	TCTCCAC
HecC01.6	CTCAATCTTA	GTATTGATAC	TCGTTCCCAAT	TCTCCAC
HecH01.7	CTCAATCTTA	GTATTGATAC	TCGTTCCCAAT	TCTCCAC

**NOTAS:**

1. Las siglas al inicio del nombre del haplotipo se corresponden con las especies:

Hr = *Hippocampus reidi*

He = *Hippocampus erectus*

2. Los números entre paréntesis corresponden al número de individuos portadores del haplotipo.

3. Ver Tabla 8 para conocer la distribución de cada haplotipo.



## **ANEXO 5.- Resultados de la Implementación de la Clave de Inferencia de Templeton (2005) para el análisis de los resultados del Análisis Filogenético de Clados Anidados**

### **Clade 1-9**

Chain of Inference : Null hypothesis cannot be rejected.

Moving on to next clade

### **Clade 1-10**

Chain of Inference : 1-2-3-4 NORestricted gene flow with isolation by distance (restricted dispersal by distance in non-sexual species).

### **Clade 1-15**

Chain of Inference : Null hypothesis cannot be rejected.

Moving on to next clade

### **Clade 1-16**

Chain of Inference : Null hypothesis cannot be rejected.

Moving on to next clade

### **Clade 1-18**

Chain of Inference : Null hypothesis cannot be rejected.

Moving on to next clade

### **Clade 2-1**

Chain of Inference : 1-2-11-17-4 NO

Restricted gene flow with isolation by distance (restricted dispersal by distance in non-sexual species).

### **Clade 2-2**

Chain of Inference : 1-2-11-17 NO

Inconclusive outcome.

### **Clade 2-3**

Chain of Inference : Null hypothesis cannot be rejected.

Moving on to next clade

### **Clade 2-5**

Chain of Inference : Null hypothesis cannot be rejected.

Moving on to next clade

### **Clade 3-1**

Chain of Inference : 1-2-3-5-6\*-7-8 YES

Restricted gene flow/dispersal but with some long-distance dispersal over intermediate areas not occupied by the species; or past gene flow followed by extinction of intermediate populations.

Too few Clades: Insufficient genetic resolution to discriminate between range expansion/colonization and restricted dispersal/gene flow.

Question 7 and 8 try to distinguish between long vs. short distance movement

### **Clade 3-2**

Chain of Inference : Null hypothesis cannot be rejected.

Moving on to next clade

### **Total Cladogram**

Chain of Inference : 1-2 IO

I-T Status Undetermined: Inconclusive outcome.

