



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR



MAESTRÍA EN CIENCIAS EN RECURSOS ACUÁTICOS

**SISTEMA DE APAREAMIENTO EN *Mustelus henlei*:
INFLUENCIA DE LOS PROCESOS CRÍPTICOS POST-
COPULATORIOS DE LAS HEMBRAS EN LA PATERNIDAD
MÚLTIPLE**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN RECURSOS ACUÁTICOS
EN EL ÁREA DE APROVECHAMIENTO SUSTENTABLE DE RECURSOS
PESQUEROS**

PRESENTA:

José Juan Rendón Herrera

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Nancy Claudia Saavedra Sotelo

Mazatlán, Sinaloa, México, Octubre del 2023.



Dirección General de Bibliotecas
Ciudad Universitaria
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57
dgbuas@uas.edu.mx

UAS-Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional Buelna

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial
Compartir Igual, 4.0 Internacional



RESUMEN

El sistema de apareamiento (SA) es la estructura del comportamiento sexual de diversas especies de vertebrados, este comportamiento tiene influencia en la recuperación de las poblaciones, ya que la abundancia poblacional dependerá del número de parejas reproductoras. La poliandria es el SA más reportado en elasmobranchios, el cual tiene como resultado paternidad múltiple (PM) y promueve sesgo en la paternidad debido a estrategias de selección sexual. Dichas estrategias suelen provenir de ambos sexos, sin embargo, existen pocos estudios que han evaluado los mecanismos que dirigen la selección sexual. *Mustelus henlei* es un vivíparo placentario con PM, la cual varía de acuerdo con la región geográfica. Es un recurso pesquero dentro del Golfo de California, por lo que es relevante conocer los mecanismos que promueven su SA. Tomando esto en cuenta, se hipotetiza que las camadas de *M. henlei* tienen un sesgo en la paternidad masculina promovido por procesos de selección críptica post-copulatoria de las hembras, como son ovulación y nutrición controladas. Para probar esta hipótesis se evaluó la relación entre los patrones de paternidad de las camadas, con el factor de condición y posición de los embriones dentro de los úteros. Se detectó una frecuencia de PM de entre 66.7 y 75 % utilizando siete loci microsatelitales. El análisis morfométrico no mostró diferencias significativas en la relación longitud-peso de los embriones entre úteros ($F_{Chen}=0.02$, $P\text{-valor}=0.9$). En contraste, se observaron diferencias significativas en el factor de condición de los embriones en función de la paternidad (GLM: $Wald\chi^2=64.52$, $P\text{-valor}<0.001$), pero no así en la posición de los embriones en función de la paternidad (GLZ: $Wald\chi^2=31.38$, $P\text{-valor}=0.14$). Los resultados sugieren la existencia de nutrición controlada como mecanismo de selección sexual de las hembras, lo que podría ser promovido por la placentotrofia.

Palabras clave: selección sexual, monogamia, poliandria, elasmobranchios, Triakidae.

ABSTRACT

The mating system (MS) is the main structure of sexual behavior in a variety of vertebrates, this influences the recovery capacity of populations, because abundance depends on the number of reproductive couples. Polyandry is the most common MS in elasmobranchs, which usually results in multiple paternity (MP), and promotes a skew in the paternity due to sexual selection strategies. These strategies usually come from both sexes, however, there is few studies that have assessed the sexual selection process. *Mustelus henlei* is a placental viviparous species that exhibits variation in the MP frequency according to the geographic region. This species is a valuable fishing resource in the Gulf of California, thus it is relevant to understand the mechanisms that promote its MS. According to the above, it is hypothesized that the *Mustelus henlei* litters have a male paternity skew promoted by cryptic post-copulatory selection processes, such as controlled ovulation and embryo nutrition. To assess this hypothesis, the relationship between the paternity patterns and the condition factor of the embryos, as well as, between the paternity patterns and the position of the embryos were evaluated. A MP frequency between 66.7 and 75 % was detected using a set of seven microsatellite loci. The morphometric analysis did not show significant differences in the length-weight relations of the embryos from the left and right uteri ($F_{Chen}=0.02$, $P\text{-value}=0.9$). In contrast, significant differences were detected in the condition factors of the embryos in function of paternity (GLM: $Wald\chi^2=64.52$, $P\text{-value}<0.001$). Nevertheless, there was no difference between the position of the embryos and paternity (GLZ: $Wald\chi^2=31.38$, $P\text{-value}=0.14$). These results suggest the existence of controlled nutrition as a mechanism for female sexual selection that might be promoted by placentotrophy.

Kew words: Sexual selection, monogamy, polyandry, elasmobranchs, Triakidae.

DEDICATORIA

Para mi familia,

Gracias a todos por su apoyo incondicional,

espero algún día ser el hijo, el hermano, el nieto y el tío que se merecen.

*“Un hombre que se permite malgastar una hora de su tiempo
no ha descubierto el valor de la vida”*

-Charles Darwin.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT)**, por el apoyo económico otorgado para mi manutención y realización de mi tesis con el número de becario 1154384.

A mi alma mater, la **Facultad de Ciencias del Mar**, por nuevamente contribuir a mi formación profesional.

A mi directora la **Dra. Nancy Claudia Saavedra Sotelo** por su invaluable tutela durante la realización de este trabajo, en la que hizo gala de su paciencia, pero también tuvo a bien apresurarme cuando fue necesario.

A mi **comité evaluador**, conformado por la **Dra. Ofelia Escobar Sánchez**, la **Dra. Rebeca Sánchez Cárdenas**, el **Dr. Juan Carlos Pérez Jiménez** y el **Dr. Felipe Amezcua Martínez**. Sus observaciones y críticas durante los dos años del programa de maestría hicieron posible este trabajo.

Al **Dr. Erick Cristóbal Oñate González** por su ayuda en la recolección e identificación de los organismos en campo.

Al **Dr. Alfredo Castillo Guerrero** y al **M.C. Marcos Douglas Calle Morán** por su asesoramiento durante la realización de los análisis estadísticos.

A los compañeros del Laboratorio de Ecología Molecular, el biólogo **Alexis Omar Tárula Marín** y el próximo biólogo pesquero **Alberto Alvarado Marín**, quienes siempre me brindaron de su apoyo cuando lo necesité.

A la **Dra. Beatriz Rivera González** por siempre estar dispuesta a brindar su punto de vista en este trabajo y por siempre ofrecerme una taza de café cuando trabajaba hasta tarde.

Al biólogo en formación **Víctor Gabriel Hernández**, quien brindó su apoyo durante la extracción de ADN genómico.

A mis compañeros de generación, por siempre estar dispuestos a discutir nuestros avances y ofrecernos retroalimentación.

Finalmente, un agradecimiento a mi familia, quienes nunca me permitieron tirar la toalla en mis momentos de mayor estrés.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	11
II. ANTECEDENTES	14
Evolución de la Poliandria en Elasmobranquios.....	14
Variación Geográfica de la Paternidad Múltiple en Tiburones.....	17
Selección Sexual Femenina.....	20
<i>Mustelus henlei</i>	22
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	24
IV. HIPÓTESIS	26
V. OBJETIVOS.....	27
Objetivo general.....	27
Objetivos particulares.....	27
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
Trabajo de Campo	28
Trabajo de Laboratorio.....	30
Análisis Genéticos.....	34
Análisis Estadísticos.....	36
VII. RESULTADOS	39
Análisis de Morfometría	39
Diversidad Genética de los Marcadores Moleculares.....	44
Probabilidad de Detectar Paternidad Múltiple	45
Análisis de Paternidad y Hermandad	47
Análisis de Selección Sexual Femenina.....	51
VIII. DISCUSIÓN	52
Estimación de la Frecuencia de Paternidad Múltiple y Sesgo de Paternidad	52
Desarrollo Embrionario Diferencial como Mecanismo de Selección Sexual Femenina	53
La Ovulación Diferencial como Mecanismo de Selección Sexual Femenina	56
Relevancia del Comportamiento Reproductivo en el Manejo Pesquero.....	57
IX. CONCLUSIONES.....	60
X. LITERATURA CITADA.....	61
XI. ANEXOS	70

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representación esquemática de la coevolución antagónica entre los sexos. Modificado de Portnoy y Heist, 2012. 15
- Figura 2. Variación en los parámetros reproductivos de *Mustelus henlei* a lo largo de su distribución. Abreviaturas: California (CA), norte del Golfo de California (NGC), Baja California Sur (BCS), longitud de madurez de los machos (LMm), longitud de madurez de las hembras (LMh), fecundidad (Fec), periodo de gestación (Gest) y periodo de alumbramiento (Alum) (Yudin y Cailliet, 1990; Pérez-Jiménez y Sosa-Nishizaki, 2008; Soto-López *et al.*, 2018). 23
- Figura 3. Sitio de recolecta de tejidos de *Mustelus henlei* dentro del Golfo de California. . 29
- Figura 4. Embriones de *Mustelus henlei* retirados de la hembra con sus posiciones asignadas comenzando por el embrión del útero derecho más alejado de la cloaca y terminando con el embrión del útero izquierdo más cercano a esta. 30
- Figura 5. Relación entre longitud total (*LT*) y distancia entre aletas dorsales (*DFD*) en hembras de *Mustelus henlei*. La recta se ajustó por $LT = 2.2957 (DFD) + 14.3467$ ($r^2 = 0.8741$, $F = 270.8$, $P\text{-valor} < 0.001$, $n = 41$). 36
- Figura 6. Distribución de tallas de las hembras de *Mustelus henlei* recolectadas ($n = 13$). .. 39
- Figura 7. Relación entre la longitud total (*LT*) de las hembras de *Mustelus henlei* y su tamaño de camada (*TC*). La recta se ajustó por $TC = 0.6012 (LT) - 36.053$ ($r^2 = 0.7066$, $F = 24.49$, $P\text{-valor} < 0.001$, $n = 13$). 40
- Figura 8. Distribución de tallas de los embriones de las hembras de *Mustelus henlei* recolectadas ($n = 99$). 41
- Figura 9. Comparación entre el crecimiento de los embriones de *Mustelus henlei* de los úteros izquierdo (azul) y derecho (rosa). Las relaciones longitud-peso fueron ajustadas por $peso = 0.0154 (LT)^{2.4723}$ ($r^2 = 0.909$, $F = 492.23$, $P\text{-valor} < 0.001$, $n = 50$) y $peso = 0.0145 (LT)^{2.4923}$ ($r^2 = 0.7917$, $F = 168.26$, $P\text{-valor} < 0.001$, $n = 45$), respectivamente. 42
- Figura 10. Comparación entre los factores de condición de los embriones de *Mustelus henlei* entre úteros. Los puntos por encima del valor de 1.0 representan embriones con un desarrollo óptimo. 42
- Figura 11. Representación esquemática de los patrones de distribución de los embriones de *Mustelus henlei* dentro de los úteros. Los embriones están numerados del más grande (1) al más pequeño (4). A) Patrón alternado, en un mismo útero hay embriones grandes y pequeños. B) Patrón sesgado, los embriones más grandes se encuentran en un útero y los más pequeños en otro. Modificado de Lyons *et al.* (2017). 43

Figura 12. Relaciones de hermandad para cada una de las camadas de *Mustelus henlei* utilizando COLONY. Los rombos representan relaciones de ‘hermanos completos’ (un color para hermanos del mismo macho), los triángulos verdes debajo de la diagonal representan relaciones de medios hermanos y las líneas naranjas representan embriones únicos de padre. Las camadas se encuentran delimitadas por las líneas negras.....48

Figura 13. Relación entre el tamaño de camada de las hembras de *Mustelus henlei* (TC) y el número de padres (NP) estimado por COLONY. La recta se ajustó por $NP = 0.0197 (TC) + 2.004$ ($r^2 = 0.0065$, $F = 0.065$, $P\text{-valor} = 0.8034$, $n = 12$).....50

Figura 14. Relación entre el tamaño de camada de las hembras de *Mustelus henlei* (TC) y el número de padres estimado por GERUD (NP). La recta se ajustó por $NP = 0.0657 (TC) + 1.1245$ ($r^2 = 0.3697$, $F = 5.864$, $P\text{-valor} = 0.036$, $n = 12$).....50

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Lista de loci microsatelitales diseñados para *Mustelus henlei* por Chabot (2012). Abreviaturas: Cebador Forward (F), Cebador Reverse (R), motivo de repetición (MR), pares de bases (pb), temperatura de anillamiento en °C (T/A).....33

Tabla II. Resultados de las pruebas para la detección de alelos nulos para los siete loci microsatelitales diseñados para *Mustelus henlei*. Las estimaciones se realizaron mediante los algoritmos propuestos por Chakraborty *et al.* (1992) y Brookfield (1996). Frecuencias iguales o menores a 0.1 en ambos algoritmos indican la ausencia de alelos nulos.44

Tabla III. Diversidad genética de los siete loci microsatelitales diseñados para *Mustelus henlei*. Abreviaturas: Número de alelos (A), heterocigosidad esperada (He), heterocigosidad observada (Ho) y valores de significancia de la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg ($P\text{-valor}$).....45

Tabla IV. Probabilidad de detectar paternidad múltiple utilizando los siete loci microsatelitales diseñados para *Mustelus henlei*. La estimación se realizó mediante el uso del software PrDM. Cada probabilidad está asociada a un escenario que incluye número de padres por camada, tamaño de camada, con y sin sesgo reproductivo.46

Tabla V. Análisis de paternidad en las camadas de *Mustelus henlei* utilizando COLONY y GERUD. NP: número de padres; ERM: éxito reproductivo masculino.49

Tabla VI. Resultados de las relaciones del factor de condición y posición de los embriones de *Mustelus henlei* con la identidad de los padres.51

I. INTRODUCCIÓN

En el reino animal se han descrito dos sistemas de apareamiento principales, en función del número de parejas para cada individuo: monogamia y poligamia (Kvarnemo, 2018). La monogamia generalmente se entiende como el sistema en donde un macho y una hembra se aparean de forma exclusiva, en cuanto a la poligamia, esta se divide en dos grupos: poliginia y poliandria (Karl, 2008). La poliginia consiste en que un macho se aparee con más de una hembra, mientras que, en la poliandria una hembra se aparee con varios machos. Estos dos últimos comportamientos pueden derivar en paternidad múltiple (PM), una estrategia reproductiva dentro de la teoría de la selección sexual.

Los elasmobranquios (tiburones y rayas) constituyen un grupo interesante desde el punto de vista evolutivo, ya que presentan una amplia gama de modos de reproducción que los vuelven especialmente adecuados para estudiar procesos de selección sexual (Byrne y Avise, 2012). Hasta la fecha se ha estudiado el sistema de apareamiento en más de 30 especies de siete órdenes de elasmobranquios, en la mayoría de estas se ha encontrado evidencia de poliandria (Lamarca *et al.*, 2020; Lyons *et al.*, 2021). De acuerdo con esto, se ha considerado que la poliandria es un rasgo pleisomórfico dentro de los elasmobranquios, lo que significa que surgió en un ancestro común para el grupo. Considerando que en teoría la poliandria puede ser un comportamiento más sencillo que la monogamia, este último es un comportamiento que ha evolucionado de forma independiente en los elasmobranquios (Lamarca *et al.*, 2020), esto explicaría su baja frecuencia en muchas especies de tiburones.

Dada la alta frecuencia de poliandria en los elasmobranquios, es posible que una de las ventajas evolutivas de este comportamiento sea el mantenimiento de la diversidad genética. Teniendo en consideración que los elasmobranquios se caracterizan por presentar bajas tasas mutacionales (Domingues *et al.*, 2017), y que las estrategias reproductivas de las especies tienen un impacto en la diversidad de todo el genoma (Ellegren y Galtier, 2016), la paternidad múltiple (PM) estaría aportando una mayor diversidad de alelos y por lo tanto sería una ventaja. Este comportamiento permitiría asegurar la diversidad genética

de las camadas y, por lo tanto, su supervivencia en un ambiente cambiante (Neff y Pitcher, 2005).

Varios estudios sobre comportamiento reproductivo en elasmobranquios han perpetuado la idea de que las hembras se limitan a tener un rol pasivo en el apareamiento con múltiples machos (Feldheim *et al.*, 2004; DiBattista *et al.*, 2008b; Lage *et al.*, 2008; Griffiths *et al.*, 2012; Nosal *et al.*, 2013; Pirog *et al.*, 2015; Rossouw *et al.*, 2016). Esta idea se plantea en una hipótesis denominada ‘poliandria de conveniencia’, la cual sugiere que las hembras se someten al violento proceso de apareamiento debido a que el costo energético de resistirse es mayor al de ceder (DiBattista *et al.*, 2008b). Sin embargo, dado que las hembras presentan una elevada inversión de energía en la producción de crías, aunado a que en algunas especies existe bajo potencial reproductivo, debería existir una selección de pareja para maximizar la aptitud de su descendencia (Lyons *et al.*, 2021). Hasta la fecha son escasos los registros que han explorado mecanismos de selección femenina en elasmobranquios (Chapman *et al.*, 2013; Farrell *et al.*, 2014; Lyons *et al.*, 2017).

El cazón pardo, *Mustelus henlei* (Gill, 1863), es una especie vivípara placentaria perteneciente a la familia Triakidae, cuya distribución es discontinua, desde la costa de California en Estados Unidos hasta el Golfo de California en México, con una segunda zona de distribución que va desde las costas de Ecuador hasta Perú (Compagno, 1984). A pesar de que la especie se encuentra en la categoría de “Preocupación menor” en la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (Pérez-Jiménez *et al.*, 2016), durante las últimas tres décadas, ha constituido una de las principales capturas de elasmobranquios dentro del Golfo de California (Saldaña-Ruiz *et al.*, 2017), lo que la convierte en un recurso pesquero importante para el país. Por lo tanto, el estudio de su comportamiento reproductivo podría brindar información valiosa para entender parte de su dinámica poblacional y mejorar estrategias de manejo pesquero (Stephens y Sutherland, 2000).

Actualmente, se sabe que esta especie presenta una variación geográfica de su comportamiento reproductivo en el Pacífico nororiental. Se ha observado un comportamiento principalmente poliándrico en las hembras de Las Barrancas, Baja

California Sur (Byrne y Avise, 2012), así como en las de Puerto Libertad, Sonora (Rendón-Herrera *et al.*, 2022), mientras que en Santa Catalina, California se ha observado un comportamiento principalmente monógamo (Chabot y Haggin, 2014). Esta variación podría atribuirse a diferencias en la biología reproductiva entre poblaciones, las cuales a su vez podrían estar moduladas por factores ambientales (Rendón-Herrera *et al.*, 2022). El objetivo de este estudio fue evaluar la paternidad de las crías de las hembras de *M. henlei* del norte del Golfo de California y su relación con el factor de condición y posición de las mismas, como un proxy de procesos críticos post-copulatorios femeninos. Los resultados permitirán una mejor comprensión sobre el comportamiento reproductivo de las hembras, así como del tipo de beneficios a los que acceden a través de un comportamiento poliándrico, los cuales repercuten en la viabilidad de su progenie y en la permanencia de la población.

II. ANTECEDENTES

Evolución de la Poliandria en Elasmobranquios

Hasta el momento se han realizado 47 estudios sobre el sistema de apareamiento en 35 especies de elasmobranquios, de los cuales 37 reportan evidencia de PM, siendo el orden Carcharhiniformes el más representado, incluyendo las familias Carcharhinidae y Triakidae (Lamarca *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2020; Nash *et al.*, 2021; Armada-Tapia *et al.*, 2022; Torres *et al.*, 2022; Nevatte *et al.*, 2023). En general, el apareamiento suele ser un proceso ‘violento’ desde el punto de vista antropocéntrico, los machos muerden las aletas y los flancos de las hembras para inducir las a copular (Byrne y Avise, 2012). Las lesiones ocasionadas por las mordeduras de los machos, así como traumatismos en la parte inferior del tracto reproductivo, suponen costos energéticos visibles para las hembras (Pratt, 1979; Pratt y Carrier, 2001). Debido a esto, se plantea la hipótesis de ‘poliandria de conveniencia’, donde las hembras ceden ante el comportamiento coercitivo de los machos porque los costos de resistencia son mayores que los de ceder (Pratt y Carrier, 2001; DiBattista *et al.*, 2008b). Sin embargo, esta idea ha dejado de ser plausible, ya que la poliandria promueve conflictos intersexuales, dando como resultado una coevolución antagonica; en esta carrera armamentista, los rasgos coercitivos de los machos son contrarrestados por los rasgos de defensa de las hembras (Zeh y Zeh, 2003).

Algunos rasgos presentes en los machos derivados de esta coevolución antagonica son (Figura 1): presencia de ganchos y espuelas de los gonopterigios que garantizan la descarga del esperma dentro de la hembra (Gilbert y Heath, 1972); el desarrollo estacional de dientes con cúspide durante la temporada de apareamiento en especies en donde el resto del año presentan una dentadura molariforme (Kajiura y Tricas, 1996); y proteínas del fluido seminal que facilitan la supervivencia del esperma dentro de la glándula oviducal (Hamlett, 1999). Por su parte, las hembras presentan características físicas que contrarrestan las características de los machos como son: tamaño corporal más grande en comparación al sexo opuesto (Carrier *et al.*, 2004), lo que podría permitir defenderse de los apareamientos cuando no hay colaboración entre los machos (Byrne y Avise, 2012); una

piel más engrosada que los machos en algunas especies, lo que permitiría resistir las mordeduras durante el apareamiento (Pratt y Carrier, 2001); y finalmente un rasgo de comportamiento podría ser la segregación sexual, donde las hembras permanecen la mayor parte del tiempo en grupo y alejadas de los machos (Klimley, 1985).

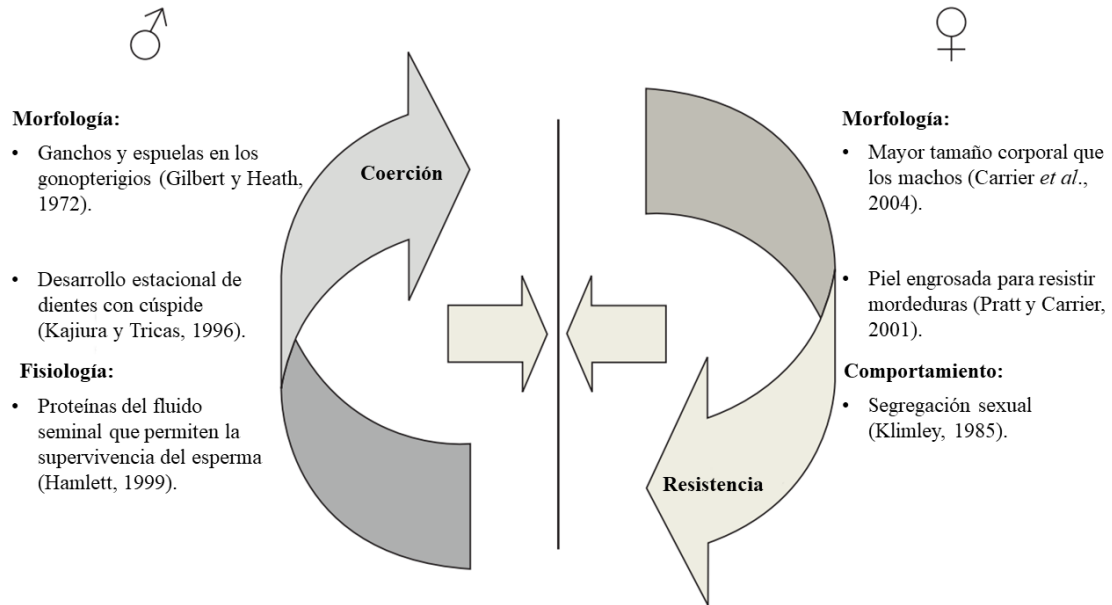


Figura 1. Representación esquemática de la coevolución antagonista entre los sexos. Modificado de Portnoy y Heist, 2012.

Como regla general, la coevolución sexual antagonista deriva de las diferentes estrategias de las que se valen ambos sexos para maximizar los beneficios de la reproducción, al mismo tiempo que se minimizan sus costos (Chapman *et al.*, 2003). Los beneficios suelen variar en función del sistema de apareamiento de las especies (Kvarnemo, 2018), pero para las hembras, estos generalmente se presentan en la forma de regalos nupciales o en la contribución de los machos al cuidado parental (Dawkins, 1976). Sin embargo, en las especies donde las hembras no obtienen beneficios aparentes, se ha sugerido que estas tienden a realizar una selección gamética que les permite recibir beneficios indirectos, que además asegurarían la supervivencia y el potencial éxito

reproductivo de su progenie (Kirkpatrick, 1987). Particularmente en los elasmobranquios, no existen beneficios directos derivados del apareamiento poliándrico para las hembras, por lo que se ha propuesto que cualquier beneficio debe de ser genético (Webster *et al.*, 1995; Zeh y Zeh, 1997; Radwan, 2003; Chapman *et al.*, 2004; Ellegren y Galtier, 2016). Por ejemplo, la poliandria podría incrementar la posibilidad de producir crías con parejas de mayor calidad (Jennions y Petrie, 2000; Hasson y Stone, 2009; Slatyer *et al.*, 2012; Culina *et al.*, 2015), ya que “no se apuestan todos los huevos a la misma canasta reproductiva” (Lyons *et al.*, 2021).

Estos beneficios genéticos son variados y favorecen la supervivencia y el éxito reproductivo potencial de las crías (Olsson *et al.*, 1996; Newcomer *et al.*, 1999; Tregenza y Wedell, 2000; García-González y Simmons, 2005; Zeh y Zeh, 2006), en general, se pueden clasificar en dos tipos principales: 1) beneficios intrínsecos, aquellos que provienen de los genes paternos hacia los embriones (herencia de ‘genes buenos’), y 2) aquellos beneficios que solamente suponen una defensa contra la incompatibilidad genética (Zeh y Zeh, 1996, 2003; Tregenza y Wedell, 2000; Neff y Pitcher, 2005). Cabe resaltar que estos beneficios no son mutuamente excluyentes, por ejemplo, se ha observado que las hembras evitan el apareamiento con parientes cercanos como una forma de evitar la incompatibilidad genética, lo cual podría derivar en un beneficio intrínseco como el aumento de la heterocigosidad y en consecuencia en la diversidad genética (Brown, 1997). Además, otro beneficio intrínseco derivado de este comportamiento sería el aumento de la viabilidad y el potencial éxito reproductivo que tendrá la progenie (Brown, 1997).

A pesar de que la poliandria tiene como resultado un probable aumento en la heterocigosidad de la progenie, la idea de que este sistema podría llevar a las poblaciones a una mayor diversidad genética ha sido cuestionada (Nunney, 1993; Karl, 2008; Lotterhos, 2011). Esto se ha demostrado mediante modelos matemáticos, los cuales simulan poblaciones bajo distintos sistemas de apareamiento (como monogamia, poliginandria, poliginia extrema y poliginia moderada), en donde los resultados apuntan a que de alguna manera todas estas formas de ‘estructura social’ minimizan la endogamia sin necesidad de un mecanismo específico (Parreira y Chikhi, 2015). Esto último podría explicar la

presencia de monogamia en algunas especies de elasmobranquios (Chapman *et al.*, 2004; Lage *et al.*, 2008; Daly-Engel *et al.*, 2010; Veríssimo *et al.*, 2011; Holmes *et al.*, 2018; Tárula-Marín y Saavedra-Sotelo, 2021), un comportamiento que ha evolucionado de forma independiente en este grupo (Lamarca *et al.*, 2020).

Variación Geográfica de la Paternidad Múltiple en Tiburones

A pesar de que los registros de comportamiento reproductivo en elasmobranquios apuntan a una predominancia de comportamiento poliándrico y subsecuente PM, la frecuencia de esta última suele variar entre especies y entre diferentes poblaciones de una misma especie a lo largo de su distribución. Este aspecto podría ser relevante al momento de establecer estrategias de manejo pesquero, ya que las condiciones ambientales pueden presionar a la población hacia un comportamiento reproductivo determinado y/o promover ciertas preferencias en las hembras durante el proceso de selección sexual (Rosenthal y Ryan, 2022). Una de las primeras especies en la que se reportó variación geográfica en la PM fue en el tiburón limón, *Negaprion brevirostris*, en un área de crianza cercana a Bimini, Bahamas, se reportó una frecuencia de PM de 86% (Feldheim *et al.*, 2004); mientras que en otra área de crianza cercana a Marquesas Key, Florida, se reportó un 81% (DiBattista *et al.*, 2008a). La poca variación del sistema de apareamiento entre localidades podría atribuirse a que los organismos en ambas áreas de crianza forman parte de una sola población panmíctica (Feldheim *et al.*, 2001), lo que a su vez podría propiciar poca variación en los parámetros reproductivos entre sitios. Además, la elevada frecuencia de PM en ambas áreas de crianza podría estar relacionada con un aumento en las tasas de encuentro entre parejas que ocurre estacionalmente debido al comportamiento filopátrico de las hembras (Feldheim *et al.*, 2004).

Algunos reportes sobre PM indican que la variación regional del comportamiento poliándrico está relacionada con el comportamiento gregario de las hembras. *Squalus acanthias* ha mostrado variación en la frecuencia de PM en dos localidades dentro de su distribución. En un estudio realizado en 10 camadas del Golfo de Maine se detectó un

30% de PM (Lage *et al.*, 2008); mientras que en la Bahía de Chesapeake en la costa de Virginia en el Atlántico noroccidental se reportó un 17% en 29 camadas (Veríssimo *et al.*, 2011). Si bien hay una diferencia clara entre ambos resultados, esta podría no ser significativa debido a los tamaños de muestra. Aun así, ambas frecuencias indican que el sistema de apareamiento a lo largo de la distribución de esta especie es predominantemente monógamo, lo cual puede atribuirse al comportamiento gregario de las hembras maduras, lo que evita que los machos sean persistentes durante el cortejo y abandonen luego de unos cuantos intentos (Veríssimo *et al.*, 2011).

De manera similar al ejemplo anterior, se ha reportado variación en las frecuencias de PM entre dos poblaciones de *Mustelus mustelus*, uno de los estudios llevado a cabo en el mar Adriático reportó un 47% de PM en 19 camadas (Marino *et al.*, 2015), mientras que en la costa de Sudáfrica se reportó una frecuencia de 67% en seis camadas (Rossouw *et al.*, 2016). Si bien el tamaño de muestra en este caso también es un factor importante a considerar, debe tenerse en cuenta que los resultados provienen de dos poblaciones distintas y, por lo tanto, el comportamiento reproductivo podría estar respondiendo a presiones ambientales distintas.

La ‘teoría de las tasas de encuentro’ predice que las poblaciones con elevadas abundancias y sin segregación sexual presentarán altas frecuencias de PM (Daly-Engel *et al.*, 2010). *Carcharhinus plumbeus* ha mostrado variación regional en las frecuencias de PM: en Hawái se observó 40% en un conjunto de 20 camadas, mientras que en Atlántico noroccidental se reportó 85% en la misma cantidad de camadas (Daly-Engel *et al.*, 2007; Portnoy *et al.*, 2007). De acuerdo con la teoría de las tasas de encuentro, Hawái debería presentar mayor frecuencia de PM, ya que ambos sexos se encuentran mezclados a lo largo del año, a diferencia de lo que sucede en el Atlántico, donde esto solamente ocurre durante el invierno (Daly-Engel *et al.*, 2010). Sin embargo, la frecuencia de PM es más del doble en el Atlántico que en Hawái, lo que, si bien no refuta la teoría de las tasas de encuentro, sugiere la presencia de posibles procesos crípticos post-copulatorios que afectan la frecuencia de PM que cabría esperar en una población como la de Hawái.

El sistema de apareamiento del cazón pardo, *M. henlei*, ha sido evaluado en tres localidades a lo largo del Pacífico nororiental, mostrando PM con diferentes frecuencias en tres poblaciones: Santa Catalina en California (22% en 18 camadas; Chabot y Haggin, 2014), Las Barrancas en Baja California Sur (93% en 14 camadas; Byrne y Avise, 2012) y el norte del Golfo de California (86% en 15 camadas; Rendón-Herrera *et al.*, 2022). Esta variación geográfica podría estar respondiendo a diferencias en los rasgos reproductivos entre las poblaciones, como lo son los tamaños de camada, tamaño de las hembras adultas y segregación sexual (Chabot y Haggin, 2014; Rendón-Herrera *et al.*, 2022). Aunado a lo anterior, la variación ambiental a la que están expuestas las poblaciones a lo largo del Pacífico nororiental influye en la biología reproductiva de los organismos de cada población. Esto último se ha observado en una especie congénica, los parámetros reproductivos de *Mustelus manazo* en Japón y Taiwán son influenciados por la temperatura, las poblaciones que habitan en aguas más frías presentan una menor fecundidad que aquellas que habitan en aguas más cálidas (Yamaguchi *et al.*, 2000). En el caso de *M. henlei*, también se ha propuesto que hay una relación estrecha entre la fecundidad y la temperatura, ya que la fecundidad parece aumentar hacia el sur, con aguas más cálidas, mientras disminuye hacia el norte, con aguas más frías (Soto-López *et al.*, 2018). Esto está ligado a que la fecundidad influye en la densidad de la población, la cual afecta directamente a las tasas de encuentro entre parejas que podrían promover la PM (Chabot y Haggin, 2014).

A pesar de que se tienen registros de variación geográfica en la frecuencia de PM en *M. henlei* en el Pacífico nororiental, los diseños experimentales han fallado en considerar toda una serie de factores que pueden incidir en la frecuencia de PM. Por ejemplo, se ha encontrado evidencia de sesgo en la paternidad de los machos en las camadas de la costa de California así como dentro del Golfo de California (Chabot y Haggin, 2014; Rendón-Herrera *et al.*, 2022), sin embargo, no existen evaluaciones sobre los procesos de selección sexual femenina que ocurren dentro del aparato reproductor (procesos crípticos post-copulatorios) y que pueden derivar en dicho sesgo de paternidad.

Selección Sexual Femenina

Como se ha mencionado, entre los intentos para explicar la frecuencia de la poliandria en los elasmobranquios está la hipótesis de ‘poliandria de conveniencia’ (DiBattista *et al.*, 2008b), la cual ha sido citada en varios estudios a pesar de que aún no hay un diseño experimental que permita comprobar esta idea (Lyons *et al.*, 2021). Este dogma retrata a las hembras como competidoras pasivas, sugiriendo que la poliandria no trae ningún beneficio para ellas, sin embargo, la ausencia de elección femenina puede producir una descendencia subóptima como resultado del apareamiento con machos de baja calidad, lo que potencialmente reduce su éxito reproductivo (Lyons *et al.*, 2021). Por lo tanto, en esta sección se analizarán las características reproductivas de las hembras que podrían estar relacionadas con la selección sexual femenina, en la mayoría de los casos dichas características derivan en procesos crípticos de selección posteriores a las cópulas. Estos procesos de selección sexual explicarían los beneficios indirectos de la poliandria para las hembras.

Uno de los motivos por los cuales las hembras obtendrían un beneficio derivado de la poliandria es el maximizar la probabilidad de supervivencia de sus crías, considerando que el potencial reproductivo femenino es limitado (Chapman *et al.*, 2003). Esta limitación se explica debido a que las hembras tienen la capacidad de producir solo cierto número de huevos viables durante la vitelogénesis para una temporada reproductiva (Lyons *et al.*, 2021), a diferencia de los machos donde el éxito reproductivo suele estar en función del número de apareamientos (Bateman, 1948). Aunado a esto, la producción de gametos junto con la gestación interna pueden ser energéticamente costosos para las hembras (Byrne y Avise, 2012), esto sin contar las características de vida de los tiburones (crecimiento lento, madurez sexual tardía y baja fecundidad), por lo que, los costos de reproducción pueden acentuarse en este grupo (Smith *et al.*, 1998; Musick *et al.*, 2000).

Otra evidencia de selección sexual femenina la podemos encontrar en la variedad de modos de nutrición fetal. Los elasmobranquios muestran diversos modos de nutrición fetal

que van desde la presencia de un saco vitelino de donde los embriones obtienen la totalidad de sus nutrientes (lecitotrofia), hasta varias formas suplementarias de aprovisionamiento materno (matrotrofia), como la leche uterina (histotrofia), huevos sin fertilizar (oofagia) o mediante una conexión placentaria entre la madre y sus embriones (placentotrofia; Conrath y Musick, 2012). Esta inversión energética y la compleja e íntima conexión con sus embriones sugieren que las hembras deben de ejercer algún tipo de selección sobre la cantidad de ovocitos que puede fecundar un macho (Lyons *et al.*, 2021). Por otro lado, algunos modos de nutrición fetal permiten a las hembras un grado de control sobre los embriones, dando preferencia a algunos para su desarrollo de forma exitosa (Lyons *et al.*, 2017). Además, se ha observado en hembras de especies placentotróficas, la capacidad de llevar a cabo un aborto selectivo (Hertig y Rock, 1949; Gosling, 1986; Zeh y Zeh, 1996) e interrumpir el desarrollo de las crías inviábiles (Heideman, 1988; Kozlowski y Stearns, 1989).

Uno de los procesos de selección post-copulatoria femenina más reportados en la literatura es la elección de esperma, este proceso está relacionado con la presencia de glándulas oviducuales que almacenan espermatozoides por largos periodos de tiempo y donde potencialmente podría ocurrir un proceso de selección sexual críptica (Fitzpatrick *et al.*, 2012). Otro mecanismo de selección es el relacionado con los periodos de ovulación y de apareamiento (Castro, 2000; Kajiura *et al.*, 2000); en algunas especies estos periodos no siempre coinciden, por lo que las hembras podrían controlar la contribución de los machos en las camadas a través de patrones de ovulación que limiten o favorezcan el acceso de algunos machos hacia sus ovocitos (Lyons *et al.*, 2017). Hasta el momento, han sido pocos los estudios que han propuesto un diseño experimental para evaluar la influencia de los procesos crípticos post-copularorios que ocurren en el aparato reproductor de las hembras. En la especie *Uroobatis halleri*, se evaluó la influencia de los patrones de ovulación diferencial de las hembras para limitar el acceso de los machos a los ovocitos, los resultados sugirieron que es este proceso el que promueve diferencias en el desarrollo de los embriones (Lyons *et al.*, 2017). De esta manera las hembras tienen un control en la

elección de los padres para sus camadas, lo cual puede repercutir en el aporte de alelos a la población.

Mustelus henlei

El cazón pardo, *M. henlei*, es una especie vivípara placentaria perteneciente a la familia Triakidae. En el Golfo de California, este tiburón es económicamente importante en la pesca artesanal de elasmobranquios (Saldaña-Ruiz *et al.*, 2017). A pesar de que durante las últimas tres décadas ha presentado una alta presión por pesca, mantiene altas abundancias en los desembarques (Bizzarro *et al.*, 2009; Saldaña-Ruiz *et al.*, 2017). Por lo tanto, estudios sobre diversidad genética y reproducción permitirán tener un mejor entendimiento de su dinámica poblacional actual.

Para el cazón pardo se han evaluado diversos aspectos de su biología reproductiva en localidades del Pacífico nororiental (Figura 2). Tanto en el Golfo de California como en la costa occidental de Baja California Sur se ha reportado un ciclo reproductivo anual (Pérez-Jiménez y Sosa-Nishizaki, 2008; Soto-López *et al.*, 2018). Sin embargo, se ha observado variación en algunos parámetros reproductivos como la longitud de madurez de los machos (LMm: 51-63 cm en California, 55-56 cm en el Golfo de California y 63.5 cm en Baja California Sur) así como en las hembras (LMh: 52-66 cm, 57-66 cm y 65.8 cm, respectivamente; Yudin y Cailliet, 1990; Pérez-Jiménez y Sosa-Nishizaki, 2008; Soto-López *et al.*, 2018). Las fecundidades más altas se han observado en las hembras del Golfo de California y Baja California Sur (1-21 y 4-20 embriones por camada, respectivamente; Pérez-Jiménez y Sosa-Nishizaki, 2008; Soto-López *et al.*, 2018); mientras que la más baja se ha observado en las hembras de California (1-10 embriones por camada; Yudin y Cailliet, 1990). Por otra parte, se han observado periodos de gestación similares en las tres regiones (10-11 meses; Yudin y Cailliet, 1990; Pérez-Jiménez y Sosa-Nishizaki, 2008; Soto-López *et al.*, 2018). Además, se han observado periodos de alumbramiento distintos entre el Golfo de California y Baja California Sur (enero-abril y mayo-junio; Pérez-Jiménez y Sosa-Nishizaki, 2008; Soto-López *et al.*, 2018).

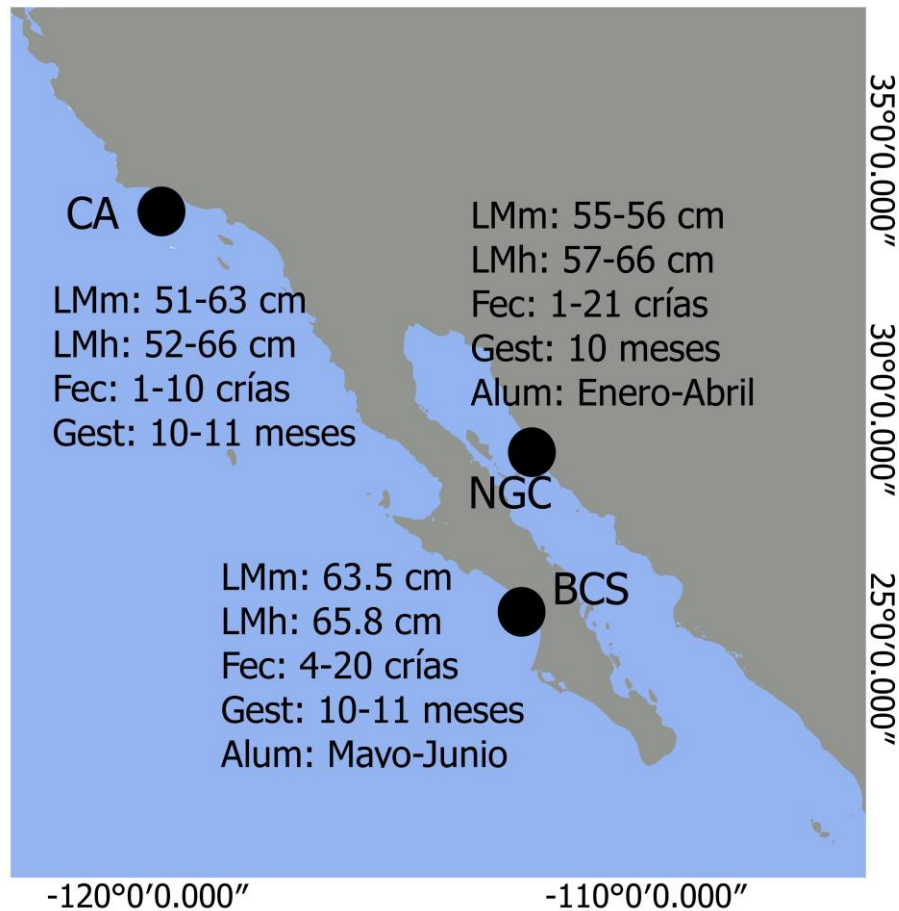


Figura 2. Variación en los parámetros reproductivos de *Mustelus henlei* a lo largo de su distribución. Abreviaturas: California (CA), norte del Golfo de California (NGC), Baja California Sur (BCS), longitud de madurez de los machos (LMm), longitud de madurez de las hembras (LMh), fecundidad (Fec), periodo de gestación (Gest) y periodo de alumbramiento (Alum) (Yudin y Cailliet, 1990; Pérez-Jiménez y Sosa-Nishizaki, 2008; Soto-López *et al.*, 2018).

En el Pacífico nororiental, *M. henlei* muestra principalmente poliandria con variación en la frecuencia de PM (Byrne y Avise, 2012; Chabot y Haggin, 2014; Rendón-Herrera *et al.*, 2022), esta variación se debe a sesgos en la paternidad de los machos. Hasta el momento, se desconocen cuáles son los factores que promueven el sesgo en la paternidad en algunas regiones como la costa de California y dentro del Golfo.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los sistemas de apareamiento de las especies tienen efectos directos en las tasas de recuperación poblacional. Específicamente, esto tiene relación con el número de parejas potenciales en una población que pueden aportar descendientes, lo que se define como tamaño poblacional efectivo (N_e), parámetro crucial en la permanencia de una población. Poblaciones con un N_e reducido pueden tener bajas densidades poblacionales, por lo que tienden a perder diversidad genética (Stephens y Sutherland, 2000). En poblaciones con un sistema de apareamiento poliándrico se observa sesgo en el éxito reproductivo de los machos, derivado de mecanismos de selección críptica post-copulatoria, lo que resulta en un menor número de parejas reproductivas en comparación con una población de comportamiento monógamo estacional. Esta idea contraintuitiva se explica porque en un sistema monógamo, cada temporada de apareamiento un solo macho tiene la misma oportunidad de engendrar la totalidad de los embriones de una hembra, por lo que su éxito reproductivo no se ve sesgado (Karl, 2008). Debido a esto, los estudios de comportamiento reproductivo en especies de importancia comercial se han vuelto relevantes.

Aunado a lo anterior, cuando una población presenta tasas de recuperación poblacional lentas se considera que presenta un efecto Allee, el cual promueve una disminución de la tasa de crecimiento poblacional (Stephens *et al.*, 1999). Estas bajas tasas de crecimiento poblacional se pueden atribuir a las bajas tasas de encuentro entre parejas, por lo tanto, conocer el número de parejas a las que tiene acceso un individuo permite obtener información sobre los mecanismos que podrían llevar a un declive poblacional (Stephens y Sutherland, 2000). Este punto es relevante para el caso de especies de importancia pesquera, ya que la extracción en la población puede afectar o modificar el sistema de apareamiento y, por lo tanto, la capacidad de recuperación poblacional.

Evaluar el sistema de apareamiento de cualquier especie puede parecer trivial, sin embargo, el proceso de cópula no es el único que le da forma al sistema, ya que existen diversos procesos post-copulatorios de selección sexual que influyen en el sistema de apareamiento. Los sistemas de apareamiento pueden dividirse en un componente social,

que describe los patrones de las cópulas (comportamiento) y un componente genético que describe el resultado real de esas cópulas (paternidades) (DeWoody y Avise, 2001). Debido a la existencia de procesos crípticos de selección sexual, es imposible identificar un sistema de apareamiento solo con observación directa, sin embargo, con el uso de herramientas moleculares se han alcanzado avances significativos en el análisis del componente genético de varias especies (Kvarnemo, 2018). En los tiburones, existen procesos crípticos de selección sexual que promueven una aparente monogamia (Boomer *et al.*, 2013; Chabot y Haggin, 2014; Tárula-Marín y Saavedra-Sotelo, 2021), lo que ha llevado a la necesidad de analizar los sistemas de apareamiento de una forma holística para explicar el componente genético dentro de las camadas (Lyons *et al.*, 2021).

A pesar de los grandes avances tecnológicos que han permitido ahondar en el componente genético de los sistemas de apareamiento en elasmobranquios, sigue habiendo una tendencia a utilizar a la ‘poliandria de conveniencia’ como explicación predeterminada del comportamiento reproductivo de las hembras, pese a la dificultad de probar su influencia empíricamente (Lyons *et al.*, 2021). Esta idea impide considerar la acción de toda una gama de procesos que influyen en la selección sexual, debido a esto, son escasos los estudios que proponen un diseño experimental adecuado para evaluar la acción de estas variables en la paternidad de las camadas.

El cazón pardo es una especie de importancia pesquera en el norte del Golfo de California desde hace varias décadas, por lo tanto, es crucial conocer los mecanismos que regulan las poblaciones de la especie, como es el caso de los sistemas de apareamiento. En el norte del Golfo de California, *M. henlei* presenta una frecuencia de PM del 86% con sesgo en las paternidades (Rendón-Herrera *et al.*, 2022), sin embargo, se desconocen cuáles son los mecanismos que promueven dicho sesgo en las camadas. De acuerdo con esto surge la siguiente pregunta de investigación: ¿existe un control críptico post-copulatorio femenino sobre la paternidad de las crías de *M. henlei*?

IV. HIPÓTESIS

H1: Las camadas de las hembras poliándricas de *Mustelus henlei* presentan un sesgo en el éxito reproductivo de los machos.

Predicción de H1: Debido a procesos de selección críptica post-copulatoria que ocurren en el aparato reproductor de las hembras de *M. henlei*, se observará la dominancia de un macho que engendrará a la mayoría de los embriones en cada camada.

H2: Los embriones engendrados por el macho dominante de cada camada tienen un mayor factor de condición que sus medios hermanos.

Predicción de H2: Debido a que *M. henlei* es una especie placentotrófica y a la selección sexual femenina, existirá una inversión nutricional diferencial en el desarrollo de los embriones, por lo tanto, se espera observar embriones engendrados por machos dominantes con un mayor factor de condición.

H3: Los embriones engendrados por el macho dominante de cada camada ocupan una posición distinta a la que ocupan sus medios hermanos.

Predicción de H3: Debido a la selección sexual femenina existirá una ovulación diferencial que les permite a las hembras controlar el momento en el que sucede la fecundación, por lo tanto, se espera observar un patrón de posición de los embriones que se asocia con la paternidad.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar los procesos de selección críptica post-copulatoria en hembras de *Mustelus henlei* mediante el análisis de los patrones de paternidad en las camadas y su relación con el factor de condición y posición de los embriones.

Objetivos particulares

- Estimar la presencia o ausencia de paternidad múltiple en las camadas de las hembras recolectadas.
- Determinar el mínimo número de padres posibles para cada camada con paternidad múltiple.
- Evaluar la variación del factor de condición de los embriones en función de la paternidad.
- Identificar la posición de los embriones dentro del útero y su relación con la paternidad.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Trabajo de Campo

Se recolectaron tejidos de 13 hembras grávidas y sus camadas (101 embriones en total) provenientes de los desembarques de la pesca artesanal en la localidad de Puerto Libertad (29° 54' 15'' N, 112° 40' 59'' W) dentro del Golfo de California, los días 19 y 20 de abril del 2022 (Figura 3). Los individuos fueron identificados de acuerdo con las descripciones morfológicas realizadas por Ebert (2003) y posteriormente mediante análisis moleculares (detalles en Trabajo de Laboratorio). Se tomaron medidas de longitud total (LT) en todas las hembras grávidas, en el caso de los organismos desembarcados sin aletas y sin cabeza se tomó la distancia desde la marca del inicio de la primera aleta dorsal hasta el inicio de la segunda aleta dorsal (DFD). Se recolectaron úteros completos con la finalidad de ubicar las posiciones de cada embrión. Para esto, se realizó una incisión ventral desde la cloaca hasta el centro de las aletas pectorales de las hembras grávidas. Posteriormente, se removieron los órganos y mesenterio que cubren al aparato reproductor, para extraer los úteros y colocarlos en charolas de plástico. En todos los casos se usaron cordones de plástico para mantener cerrados los úteros y evitar la expulsión de los embriones. Para asignar posiciones a cada una de las crías dentro de los úteros se tomó como referencia la posición del ovario, ya que este suele encontrarse encima del lado izquierdo del útero.

Una vez identificados los úteros izquierdo y derecho, se realizó una incisión en cada flanco para liberar a los embriones, reduciendo en la medida de lo posible el movimiento de estos. Las posiciones se asignaron de forma ascendente, comenzando con el embrión del útero derecho más alejado de la cloaca y finalizando con el embrión del útero izquierdo más cercano a la cloaca (Figura 4). Se emplearon los cordones umbilicales como guías cuando esto fue posible con el fin de facilitar la asignación de las posiciones dentro del útero. En el caso de cuatro embriones que se obtuvieron durante el proceso de ser expulsados a través de la cloaca, estos se colectaron sin asignar posición o útero, por lo que solo se incluyeron en los análisis genéticos y se dejaron fuera de los análisis morfométricos que requerían los datos faltantes. Previo a la recolecta de los tejidos se tomaron medidas de

LT y peso en gramos de todos los embriones para el cálculo del factor de condición de Fulton (K), modificado por LeCreen (1951, detalles en Análisis Estadísticos).

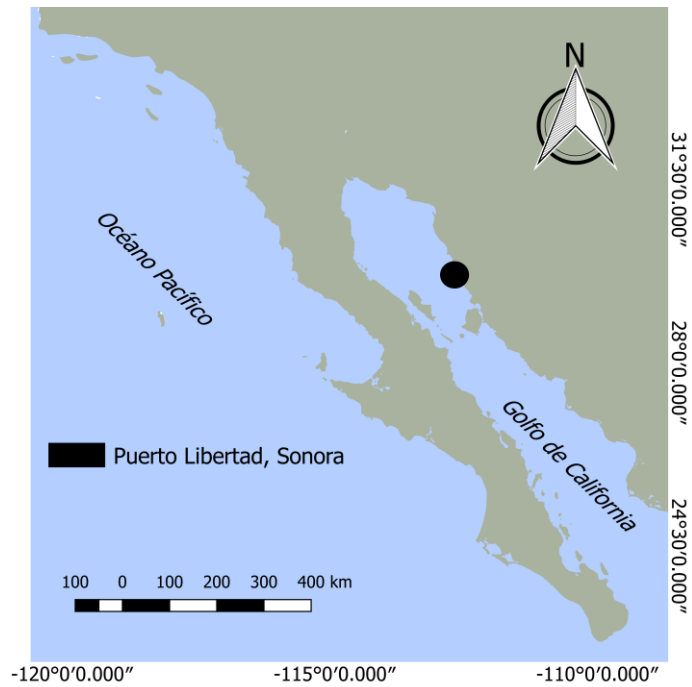


Figura 3. Sitio de recolecta de tejidos de *Mustelus henlei* dentro del Golfo de California.



Figura 4. Embriones de *Mustelus henlei* retirados de la hembra con sus posiciones asignadas comenzando por el embrión del útero derecho más alejado de la cloaca y terminando con el embrión del útero izquierdo más cercano a esta.

Trabajo de Laboratorio

Se realizaron extracciones de ADN genómico del tejido de las hembras y los embriones a partir de 25 mg de tejido macerado, para lo cual se utilizó el protocolo de digestión de tejidos con proteinasa K y precipitación con cloruro de litio (LiCl) (Aljanabi y Martinez, 1997). La concentración y calidad del ADN extraído se verificó con un espectrofotómetro de microvolúmenes (NanoDrop Lite, Thermo), mediante la razón de absorbancia A260/A280. La integridad del ADN se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en una solución tampón (TBE 0.5X), para posteriormente observar el gel en un fotodocumentador Gel DocTMXR+(Bio-Rad).

La identificación de las hembras recolectadas se verificó mediante la amplificación del locus mitocondrial NADH2 utilizando los oligonucleótidos ND2-F (5'-AAG GAG CAG TTT GAT AGA GT-3') y ND2-R (5'-AAC GCT TAG CTG TTA AA-3') (Naylor *et al.*, 2005). Dichas amplificaciones se realizaron mediante la técnica de Reacción en Cadena

de la Polimerasa (PCR). Las condiciones químicas de cada reacción fueron: 0.3 mM de dNTP's, 1.6X PCR buffer libre de magnesio, 0.5 μ M de cada cebador, 4 mM de MgCl₂, 0.75 U de Taq DNApol y 20 ng totales de ADN genómico en un volumen total de reacción de 15 μ l. El perfil de termociclado consistió en: un periodo inicial de activación de 5 min a 95°C; seguido de 30 ciclos de 94°C durante 30 s, 52°C durante 45 s y 72°C durante 1 min; y una extensión final de 72°C durante 10 min. Los productos de PCR fueron secuenciados a través del servicio de los laboratorios de Macrogen Inc., en Corea del Sur.

Para evaluar la paternidad de los embriones se amplificaron 7 loci microsatelitales reportados para *M. henlei* (Chabot, 2012) para cada individuo colectado (Tabla I). Las amplificaciones de los microsatélites se realizaron mediante el método de marcado de amplicones fluorescentemente con cebadores universales M13 (De Arruda *et al.*, 2010). A cada cebador específico forward se le agregó una cola M13 la cual se incorporó en el amplicón, finalmente esta cola M13 es reconocida por un cebador universal M13 con fluoróforo (6-FAM, VIC, PET o NED). La incorporación del cebador con fluoróforo al amplicón permitió la posterior detección de los tamaños alélicos en un secuenciador automatizado. Las condiciones químicas de cada reacción fueron: 0.2 mM de dNTP's, 1x PCR buffer libre de magnesio, 0.3 μ M de cada cebador forward y reverse no marcado, 2 mM de MgCl₂, 0.45 U de Taq DNApol, 0.7 mg/ μ l de BSA, 0.3 μ M de cebador forward marcado con fluoróforo y 10 ng totales de ADN genómico en un volumen total de reacción de 15 μ l.

Los perfiles de termociclado para cada PCR se realizaron en dos fases: la primera fase de amplificación consistió en un periodo inicial de activación de 5 min a 94°C; seguido por 25 ciclos de 94°C durante 30 s, temperatura de anillamiento (T/A; Tabla I) para cada par de cebadores por 30 s y 72°C por 1 min. Durante la segunda fase se agregó el cebador universal M13 con fluoróforo (0.3 μ M) a cada reacción, la cual consistió de 20 ciclos de: 94°C durante 30 s, 53°C (temperatura a la cual se incorpora el cebador universal M13) durante 30 s y 72°C durante 1 min; y una extensión final de 30 min a 72°C. La verificación del tamaño de los amplicones de cada locus se llevó a cabo en geles de agarosa al 2%. En todas las reacciones de PCR se incluyeron controles negativos para descartar

contaminación de muestras o reactivos y asegurar la fidelidad de las amplificaciones. Posteriormente se observó el gel en un fotodocumentador Gel DocTMXR+(Bio-Rad). Se realizaron mezclas de cuatro loci microsatelitales conformando un panel de genotipificación, estos fueron separados en un secuenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems Inc., CA) en la Universidad de Arizona en EUA. El control de calidad de la genotipificación de cada microsatélite para cada individuo se realizó mediante el programa GeneMarker (Softgenetics®).

Tabla I. Lista de loci microsatelitales diseñados para *Mustelus henlei* por Chabot (2012). Abreviaturas: Cebador Forward (F), Cebador Reverse (R), motivo de repetición (MR), pares de bases (pb), temperatura de anillamiento en °C (T/A).

Locus	Dirección	Secuencia	MR	Tamaños alélicos (pb)	T/A
Mh1	F	GGAGGAGGGAAGCCTATGG	(AG) _n	178–222	59
	R	TCTCTGGCTCCATTCAGGG			
Mh6	F	CATGTCCACTTCCCATCGC	(CT) _n	191–203	58
	R	GGAGAGATTAGAACAGGTGG C			
Mh13	F	ACTCGATAGGCCAAAGGGC	(ATCT) _n	194–212	59
	R	ATGACTGGGCACCTCCAAG			
Mh15	F	TGCCCTTCGAGGTGGTAAG	(ATTT) _n	416–426	56
	R	TAGGCTGGAAAGTTGGGAG			
Mh25	F	TGCAATAACCGTTCTGCGTC	(CT) _n	156–170	58
	R	TCACACCCGCAGTTAGATCC			
Mh29	F	ATCAGCCCAGATTGTCCGC	(CT) _n	196–204	59
	R	AGACATTCCGCCTTCCAGC			
Mh34	F	CCCTTTCTAGGCTTGGCAC	(AG) _n	221–225	58
	R	CCCTCTCTCTGGAGTTGGAAG			

Análisis Genéticos

Para evaluar la identidad de las hembras recolectadas, las secuencias obtenidas del gen mitocondrial NADH2 fueron verificadas en el software Codon Code Aligner (Codon Code Corporation, Dedham, MA, USA). Posteriormente, estas fueron comparadas con secuencias del locus NADH2 disponibles en la base de datos de GenBank mediante el uso del algoritmo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, NCBI), el cual mostró el porcentaje de similitud entre las muestras de este estudio y las almacenadas en la plataforma de datos públicos (95-100 %). Las secuencias obtenidas del GenBank fueron las siguientes: MN253073.1, DQ422125.1, MN253076.1, JQ518701.1, MN253077.1, OM165118.1 y OM165135.1 de *M. henlei*; KY909695.1 y KY909705.1 de *M. mustelus*; OM165136.1 y OM165166.1 de *M. lunulatus*; MN253061.1 y MN253070.1 de *M. californicus*. Las secuencias fueron alineadas con el programa MEGA v.5.05 (Tamura *et al.*, 2011). Se construyó un árbol filogenético utilizando el algoritmo Neighbor Joining y como grupo externo se utilizó la secuencia MT881536.1 de *Sphyrna mokarran*. Este análisis demostró que 13 de 14 hembras recolectadas originalmente pertenecen a la especie *M. henlei*, mientras que la hembra restante se identificó como *M. californicus* (Anexo I). Por lo tanto, esta última se descartó de los análisis.

Para evaluar la paternidad de las camadas se generó una base de datos con los genotipos multilocus de cada individuo (tamaños alélicos de cada microsatélite) con el programa Microsatellite Toolkit, un *add-in* de Microsoft Excel. Se utilizó el programa MicroChecker v2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004) para detectar posibles errores de genotipificación que no permitan la amplificación de alelos debido a la degradación y/o baja concentración del ADN, a mutaciones en los sitios de hibridación en los cebadores (alelos nulos) o ‘tartamudeos’ de la polimerasa (*stutters*) (Wandeler *et al.*, 2003). Se utilizó el programa GeneAIEX 6.5 (Peakall y Smouse, 2006, 2012) para obtener la heterocigosidad observada (*Ho*), heterocigosidad esperada (*He*), número de alelos por locus (*A*) y la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg para cada uno de los loci microsatelitales en el conjunto de datos.

Se empleó el programa PrDM (Neff y Pitcher, 2002) para calcular la probabilidad de detectar PM mediante simulaciones que muestran la proporción de machos por camada y el tamaño de camada. Este análisis permite evaluar la utilidad de los marcadores empleados en la detección de PM y para ello se utilizaron las frecuencias alélicas correspondientes a los genotipos multilocus de las hembras capturadas en el presente estudio, así como las frecuencias alélicas de la población, obtenidas a partir de los estudios de Chabot *et al.* (2015) y Rendón-Herrera *et al.* (2022). Los alelos presentes en el genotipo de los embriones, pero ausentes en la base de frecuencias alélicas de la población fueron fijados a una frecuencia de 0.01 y el resto de las frecuencias alélicas fueron ajustadas en congruencia.

Para detectar el número de posibles machos en cada camada y posteriormente evaluar la proporción de embriones engendrados por cada uno, se utilizó el programa GERUD v2.0 (Jones, 2005), el cual arroja los genotipos posibles de cada padre dentro de las camadas. Para estimar las relaciones de hermanos se usó COLONY v1.2 (Wang, 2004), el cual asigna individuos en grupos de hermanos completos y grupos de medios hermanos tomando como referencia los genotipos de una muestra de individuos adultos de la misma población. Generalmente se consideran ambos enfoques como una forma de evaluar la congruencia entre las metodologías, ya que COLONY tiende a sobreestimar el número de padres para cada camada (Sefc y Koblmüller, 2009), mientras que GERUD estima el mínimo número de padres; se ha propuesto que una congruencia alta entre resultados refleja el número de padres más probable para cada camada, mientras que la falta de congruencia permite al menos reducir el número de posibles padres a una cantidad entre ambas estimaciones (Lyons *et al.*, 2017).

Análisis Estadísticos

Dado que para la hembra MHEPL45 no fue posible obtener la LT, en este caso fue necesario estimarla a partir del modelo linear $LT = 2.2957 (DFD) + 14.3467$ (Figura 5).

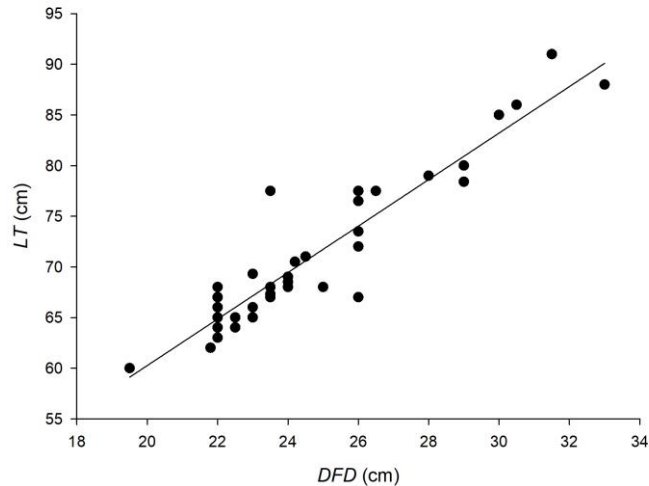


Figura 5. Relación entre longitud total (LT) y distancia entre aletas dorsales (DFD) en hembras de *Mustelus henlei*. La recta se ajustó por $LT = 2.2957 (DFD) + 14.3467$ ($r^2 = 0.8741$, $F = 270.8$, $P\text{-valor} < 0.001$, $n = 41$).

Se realizó una comparación de las relaciones longitud-peso de los embriones entre los úteros izquierdo y derecho para evaluar las posibles diferencias en el crecimiento de acuerdo con lo propuesto por Lyons *et al.* (2017). Se establecen dos escenarios posibles: 1) las relaciones longitud-peso de los embriones entre úteros son iguales, por lo tanto, cualquier diferencia en el crecimiento de los embriones dentro de cada útero puede atribuirse a procesos de selección de parte de la hembra; 2) las relaciones longitud-peso entre úteros son diferentes, lo que podría atribuirse a distintos factores externos no relacionados con procesos de selección sexual femenina. Dichas relaciones fueron además comparadas mediante el análisis de curvas coincidentes de crecimiento propuesto por Chen *et al.* (1992) para evaluar si existen diferencias significativas entre estas. Aunado a esto, se evaluó el tipo de crecimiento de los embriones mediante la prueba de isometría de Pauly

(1984) con la finalidad de determinar si el crecimiento de los embriones es del tipo isométrico o alométrico. Una vez comprobado el tipo de crecimiento de los embriones, se utilizó el factor de condición propuesto por LeCreen (1951) para comparar el desarrollo de los embriones entre úteros:

$$K = 100 \frac{PT}{LT^b}$$

Donde PT es el peso de los embriones en gramos, LT es la longitud total de los embriones en centímetros, el valor de b viene dado por las relaciones longitud-peso de los embriones de cada útero y el factor 100 cumple la función de escalar el resultado de K . Además, para probar si existen diferencias en el desarrollo de los embriones de los úteros izquierdo y derecho se realizó la prueba no paramétrica U de Mann Whitney para las variables LT , peso y factor de condición de los embriones, esto debido a que los datos de LT y peso cumplieron con los supuestos de homoscedasticidad mas no con los de normalidad.

Posteriormente, se inspeccionó la posición de los embriones dentro de los úteros para detectar patrones de posición que puedan indicar un control en la ovulación y/o desarrollo diferencial de las crías, en la literatura se han observado dos patrones principales: 1) Alternado: si los embriones más grandes de la camada se encuentran en ambos úteros y 2) Sesgado: si los embriones más grandes se encuentran en un solo útero (Lyons *et al.*, 2017).

Una vez determinadas las diferencias en longitud y peso de los embriones entre úteros y los patrones de posición, se procedió a evaluar los posibles procesos de selección críptica post-copulatoria femenina. Dado la naturaleza de los datos obtenidos, se evaluaron dos posibles procesos: nutrición controlada y ovulación diferencial. La nutrición controlada se evaluó en términos de la relación entre el factor de condición de los embriones (variable compuesta que considera tanto la LT como el peso de los embriones) con la identidad de los padres. Por otro lado, la ovulación diferencial se evaluó en términos de la relación entre la posición de los embriones dentro del útero con la identidad de los padres. En el primer

caso, al ser el factor de condición una variable de respuesta continua, la relación entre esta y la identidad de los padres se evaluó mediante un Modelo Linear General (GLM); en el segundo caso, al ser la posición de los embriones una variable categórica, la relación entre esta y la identidad de los padres se evaluó mediante un Modelo Linear Generalizado (GLZ).

Para realizar tanto un GLM como un GLZ se consideran los siguientes componentes: al menos una variable de respuesta, una distribución de la familia exponencial, una función *Link* y al menos una variable predictiva (Quinn y Keough, 2002). En el caso del GLM, al utilizarse el factor de condición de los embriones como variable de respuesta, se empleó una distribución normal con una función *Link* del tipo *identidad*. Aunado a esto, la identidad de los padres se empleó como variable predictiva. Así, se espera que, de existir una nutrición controlada, el factor de condición de los embriones varíe en función de la paternidad. Por otra parte, en el caso del GLZ, al utilizarse la posición de los embriones dentro de los úteros como variable de respuesta, se empleó una distribución multinomial ordinal con una función *Link* del tipo *logit*. De este modo se espera que, de existir una ovulación diferencial, la posición de los embriones también varíe en función de la paternidad.

VII. RESULTADOS

Análisis de Morfometría

El número promedio de embriones por camada fue de 7.8 ± 4.7 (rango: 2 – 17 embriones), la LT promedio de las hembras fue de 72.9 ± 6.6 cm (rango: 66 – 85 cm, Figura 6). Se encontró una relación lineal significativa entre la LT de las hembras y el número de embriones por camada (Figura 7).

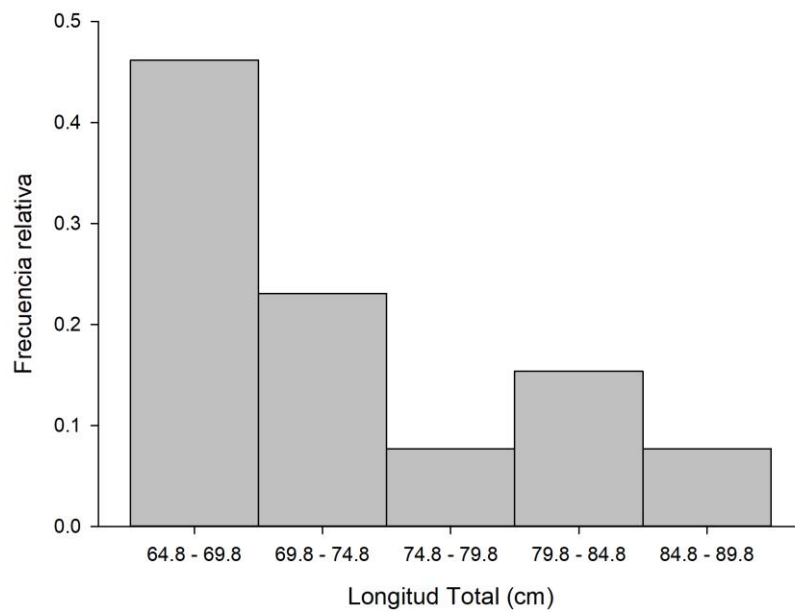


Figura 6. Distribución de tallas de las hembras de *Mustelus henlei* recolectadas ($n = 13$).

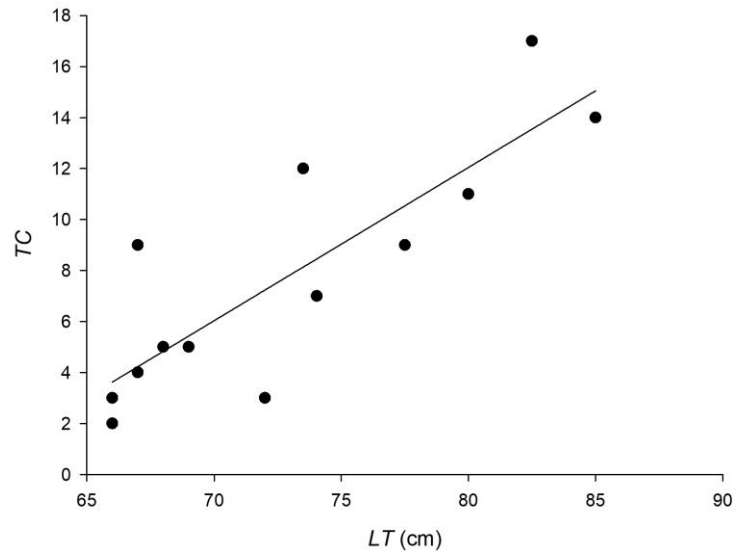


Figura 7. Relación entre la longitud total (LT) de las hembras de *Mustelus henlei* y su tamaño de camada (TC). La recta se ajustó por $TC = 0.6012 (LT) - 36.053$ ($r^2 = 0.7066$, $F = 24.49$, P -valor < 0.001 , $n = 13$).

Para los análisis morfométricos de los embriones se consideraron solo 99 organismos, ya que no se tomó el peso de un individuo y se eliminó del análisis un segundo embrión con malformaciones evidentes (carente de la segunda aleta dorsal). La LT promedio de los embriones fue de 24.16 ± 1.97 cm (rango: 17.5 – 28 cm, Figura 8) mientras que el peso promedio fue de 41.2 ± 8.61 gramos (rango: 13 – 63 gramos). Para comparar la LT y peso de los embriones entre úteros se consideraron solo 95 organismos, ya que en el caso de cuatro embriones más no fue posible registrar el útero en el que se encontraban. Los resultados de la prueba U de Mann-Whitney no indicaron diferencias significativas entre los datos de LT ($W = 1075.5$, P -valor = 0.713) y peso ($W = 1088$, P -valor = 0.785) de los embriones entre úteros izquierdo y derecho. Las relaciones longitud-peso de los embriones de ambos úteros tampoco fueron significativamente distintas (Figura 9), esto de acuerdo con el análisis de curvas coincidentes de crecimiento ($F_{Chen} = 0.02$, P -valor = 0.9). Además, los embriones de los úteros izquierdo y derecho presentaron un crecimiento de tipo hipoalométrico según lo demuestra la prueba de isometría de Pauly ($t_c = 2.91$, P -valor < 0.01 y $t_c = 2.42$, P -valor < 0.05 , respectivamente). Por otra parte, tuvieron

en su mayoría un desarrollo óptimo, como lo demuestra el factor de condición (Figura 10), sin embargo, se detectaron diferencias significativas entre úteros ($W = 1549$, $P\text{-valor} = 0.001$).

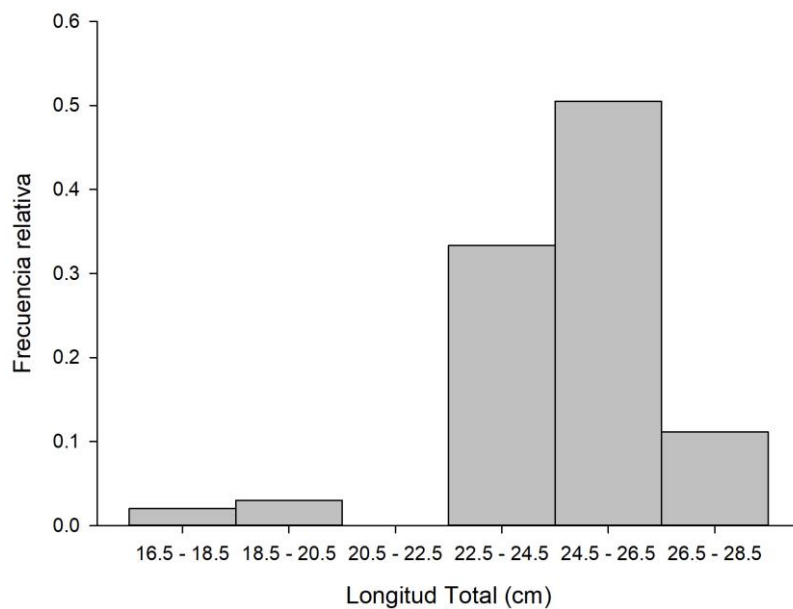


Figura 8. Distribución de tallas de los embriones de las hembras de *Mustelus henlei* recolectadas ($n = 99$).

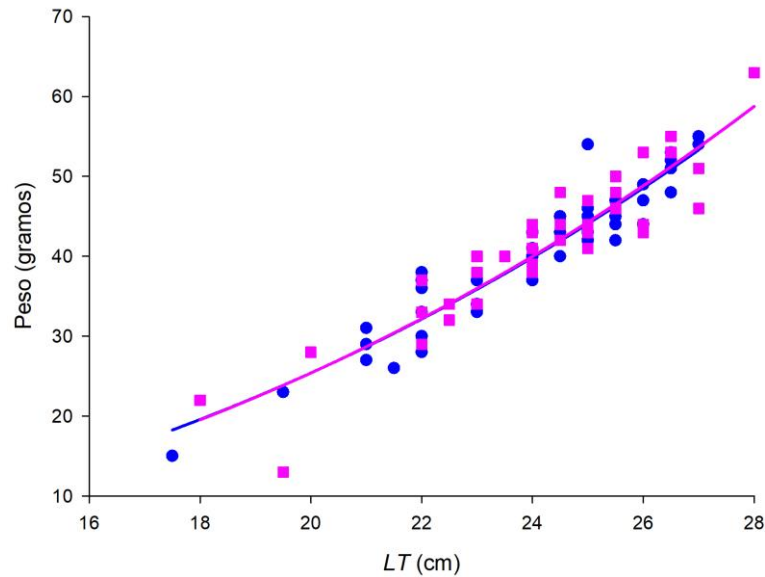


Figura 9. Comparación entre el crecimiento de los embriones de *Mustelus henlei* de los úteros izquierdo (azul) y derecho (rosa). Las relaciones longitud-peso fueron ajustadas por $\text{peso} = 0.0154 (LT)^{2.4723}$ ($r^2 = 0.909$, $F = 492.23$, $P\text{-valor} < 0.001$, $n = 50$) y $\text{peso} = 0.0145 (LT)^{2.4923}$ ($r^2 = 0.7917$, $F = 168.26$, $P\text{-valor} < 0.001$, $n = 45$), respectivamente.

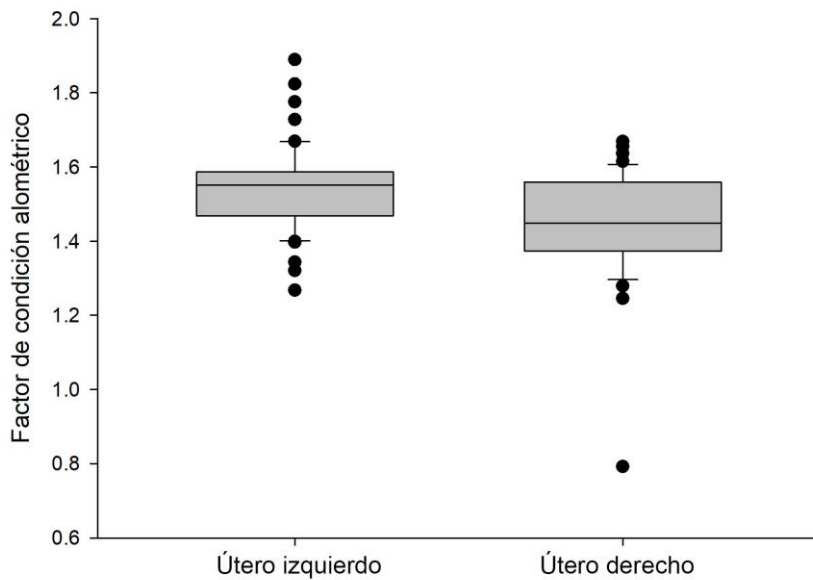


Figura 10. Comparación entre los factores de condición de los embriones de *Mustelus henlei* entre úteros. Los puntos por encima del valor de 1.0 representan embriones con un desarrollo óptimo.

En lo que respecta a la posición de los embriones dentro de los úteros, casi todas las camadas presentaron un patrón alternado, es decir, en un mismo útero hubo tanto embriones grandes como pequeños (Figura 11A), solamente se observó un patrón sesgado en tres camadas (Figura 11B), las cuales estuvieron compuestas por menos de cinco embriones cada una.

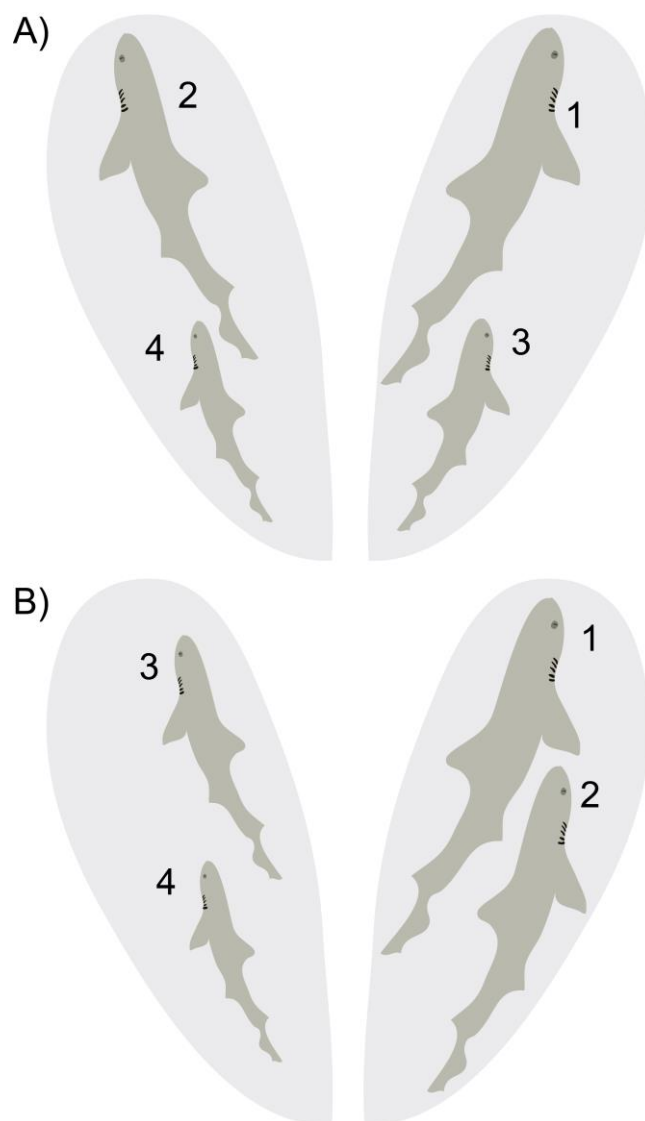


Figura 11. Representación esquemática de los patrones de distribución de los embriones de *Mustelus henlei* dentro de los úteros. Los embriones están numerados del más grande (1) al más pequeño (4). A) Patrón alternado, en un mismo útero hay embriones grandes y pequeños. B) Patrón sesgado, los embriones más grandes se encuentran en un útero y los más pequeños en otro. Modificado de Lyons *et al.* (2017).

Diversidad Genética de los Marcadores Moleculares

Se amplificaron con éxito siete loci microsatelitales (Mh1, Mh34, Mh29, Mh6, Mh25, Mh15 y Mh13) en 12 camadas de *M. henlei*, dado que la hembra MHEPL54 presentó solamente dos embriones, cantidad insuficiente para un análisis de paternidad, se eliminó de los análisis subsecuentes. La revisión manual de los genotipos de cada una de las crías confirmó que cada embrión comparte un alelo con su respectiva madre. Por otra parte, solamente se detectaron alelos nulos en el locus Mh25 (Tabla II).

Tabla II. Resultados de las pruebas para la detección de alelos nulos para los siete loci microsatelitales diseñados para *Mustelus henlei*. Las estimaciones se realizaron mediante los algoritmos propuestos por Chakraborty *et al.* (1992) y Brookfield (1996). Frecuencias iguales o menores a 0.1 en ambos algoritmos indican la ausencia de alelos nulos.

Locus	Alelos nulos presentes	Chakraborty	Brookfield
Mh1	No	0.132	0.100
Mh34	No	-0.333	-0.333
Mh29	No	-0.014	-0.013
Mh6	No	-0.041	-0.034
Mh25	Si	0.179	0.127
Mh15	No	-0.021	-0.003
Mh13	No	-0.043	-0.016

El conjunto de microsatélites utilizados presentó una diversidad genética de baja a moderada: 2 a 8 alelos por locus, con una H_o de 0.083 a 1.0. Uno de los siete marcadores empleados se encontró fuera del Equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla III) y no se detectó desequilibrio de ligamiento. Lo anterior sugiere que solamente este marcador (Mh34) no cumple con el supuesto de herencia mendeliana y está sujeto a la influencia de las fuerzas microevolutivas, es decir, no es un marcador neutro.

Tabla III. Diversidad genética de los siete loci microsatelitales diseñados para *Mustelus henlei*. Abreviaturas: Número de alelos (*A*), heterocigosidad esperada (*He*), heterocigosidad observada (*Ho*) y valores de significancia de la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg (*P-valor*).

Marcador	<i>A</i>	<i>He</i>	<i>Ho</i>	<i>P-valor</i>
Mh1	7	0.760	0.583	0.018
Mh34	2	0.500	1.000	0.002*
Mh29	8	0.809	0.833	0.087
Mh6	5	0.691	0.750	0.074
Mh25	7	0.719	0.500	0.013
Mh15	2	0.080	0.083	N/A
Mh13	4	0.229	0.250	0.984

* *P-valores* significativos después de la corrección de Bonferroni por pruebas múltiples.

Probabilidad de Detectar Paternidad Múltiple

Las simulaciones realizadas en el software PrDM indican una probabilidad de detección de PM moderada en tamaños de camada de cuatro embriones, la cual incrementó progresivamente conforme aumenta el número de crías por camada (Tabla IV).

Tabla IV. Probabilidad de detectar paternidad múltiple utilizando los siete loci microsatelitales diseñados para *Mustelus henlei*. La estimación se realizó mediante el uso del software PrDM. Cada probabilidad está asociada a un escenario que incluye número de padres por camada, tamaño de camada, con y sin sesgo reproductivo.

Machos	Sesgo reproductivo (proporción de fecundación)	Tamaño de camada							
		3	4	5	6	7	8	9	10
2	(0.5/0.5)	0.4243	0.6796	0.815	0.8844	0.9266	0.9475	0.9641	0.9725
	(0.75/0.25)	0.3191	0.5212	0.6498	0.7332	0.7939	0.8375	0.8715	0.8965
3	(0.333/0.333/0.333)	0.5678	0.8208	0.9221	0.9642	0.9826	0.9907	0.9945	0.9968
	(0.60/0.20/0.20)	0.5323	0.7813	0.8917	0.9423	0.9675	0.981	0.9883	0.9928
4	(0.25/0.25/0.25/0.25)	-	0.876	0.9558	0.9831	0.9929	0.9967	0.9988	0.999
	(0.70/0.10/0.10/0.10)	-	0.7162	0.8336	0.8986	0.9353	0.9577	0.9716	0.9809
5	(0.20/0.20/0.20/0.20/0.20)	-	-	0.9698	0.9897	0.9961	0.9984	0.9992	1
	(0.60/0.10/0.10/0.10/0.10)	-	-	0.8488	0.9091	0.9427	0.9635	0.976	0.9845

Análisis de Paternidad y Hermandad

El análisis de paternidad con GERUD mostró que ocho de las 12 camadas presentaron PM (66.7%), mientras que el análisis en COLONY mostró nueve (75%; Figura 12). El mínimo y máximo número de padres estimado por COLONY fue de uno y cinco respectivamente, mientras que GERUD estimó un mínimo de dos padres para las ocho camadas (Tabla V). De manera similar, COLONY estimó un mayor número de camadas con sesgo en el éxito reproductivo de los machos (77.8%; siete de las nueve camadas con PM), en comparación con GERUD (62.5%; cinco de las ocho camadas en las que se detectó PM). No se encontró una relación significativa entre el tamaño de camada y el número de padres estimado por COLONY, aunque se detectó una relación débil, pero significativa entre ambas variables al considerar la estimación de GERUD (Figuras 13 y14).

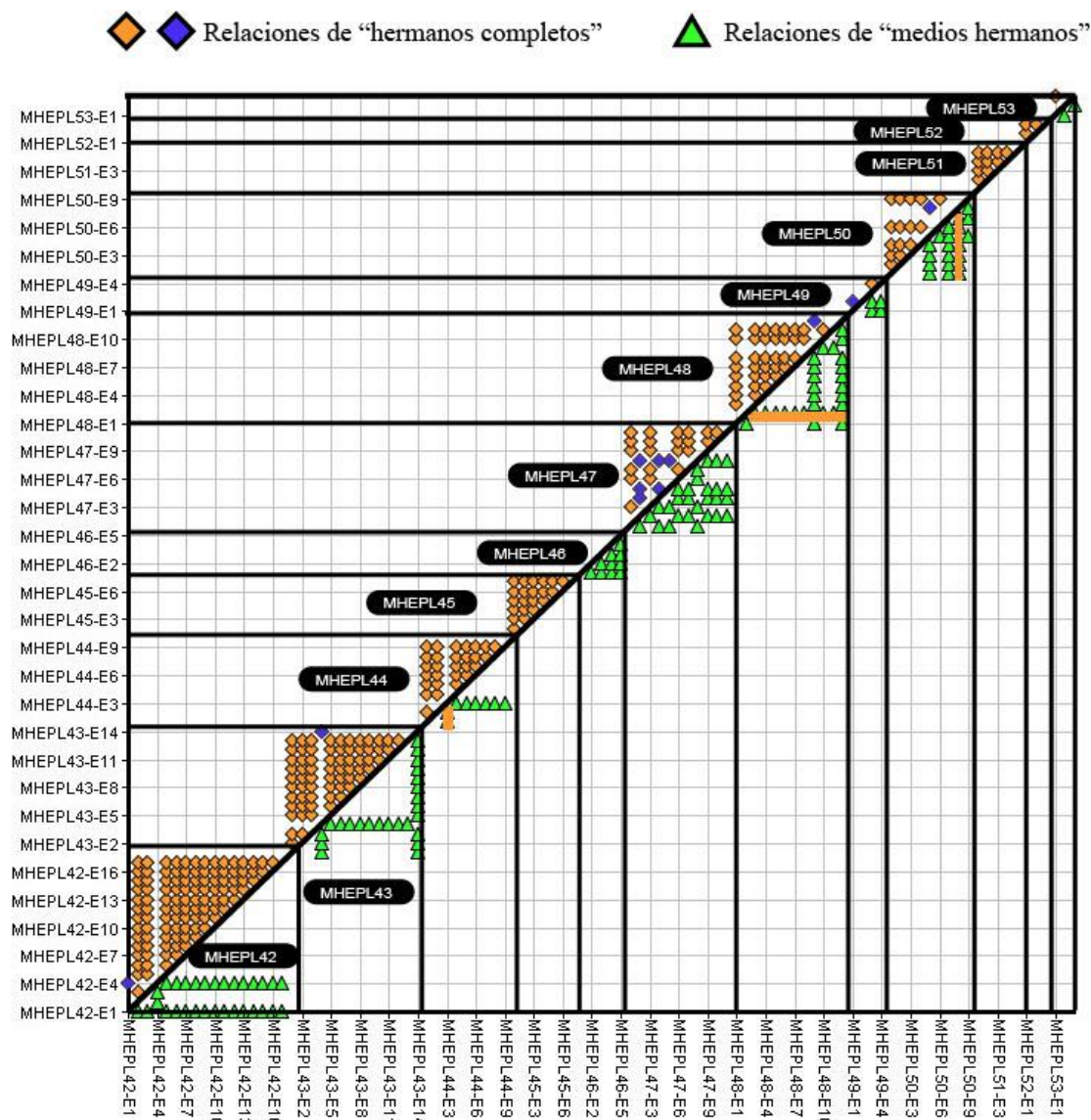


Figura 12. Relaciones de hermandad para cada una de las camadas de *Mustelus henlei* utilizando COLONY. Los rombos representan relaciones de ‘hermanos completos’ (un color para hermanos del mismo macho), los triángulos verdes debajo de la diagonal representan relaciones de medios hermanos y las líneas naranjas representan embriones únicos de padre. Las camadas se encuentran delimitadas por las líneas negras.

Tabla V. Análisis de paternidad en las camadas de *Mustelus henlei* utilizando COLONY y GERUD. NP: número de padres; ERM: éxito reproductivo masculino.

Hembra	COLONY		GERUD	
	NP	ERM	NP	ERM
MHEPL42	2	0.88/0.12	2	0.47/0.53
MHEPL43	2	0.86/0.14	2	0.79/0.21
MHEPL44	2	0.89/0.11	2	0.56/0.44
MHEPL45	1	-	1	-
MHEPL46	5	0.20/0.20/0.20/0.20/0.20	2	0.60/0.40
MHEPL47	2	0.64/0.36	2	0.64/0.36
MHEPL48	3	0.75/0.17/0.08	2	0.75/0.25
MHEPL49	2	0.50/0.50	2	0.50/0.50
MHEPL50	3	0.67/0.22/0.11	2	0.67/0.33
MHEPL51	1	-	1	-
MHEPL52	1	-	1	-
MHEPL53	2	0.67/0.33	1	-

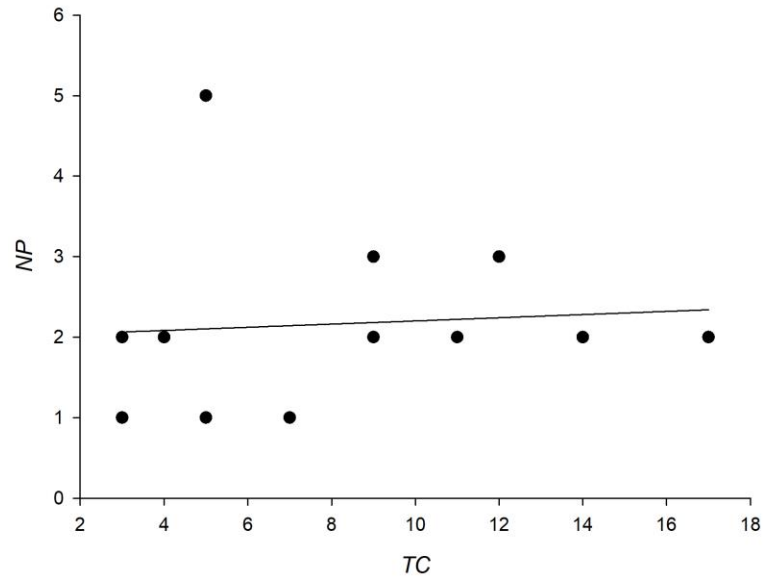


Figura 13. Relación entre el tamaño de camada de las hembras de *Mustelus henlei* (TC) y el número de padres (NP) estimado por COLONY. La recta se ajustó por $NP = 0.0197 (TC) + 2.004$ ($r^2 = 0.0065$, $F = 0.065$, $P\text{-valor} = 0.8034$, $n = 12$).

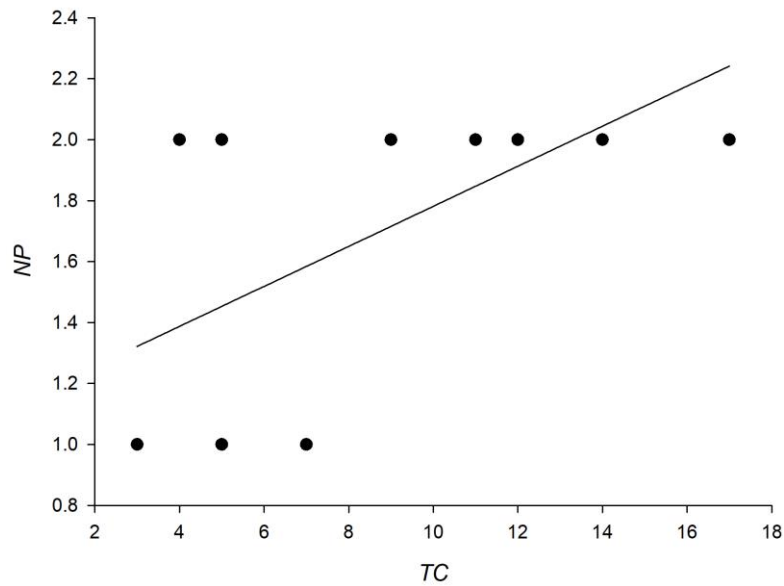


Figura 14. Relación entre el tamaño de camada de las hembras de *Mustelus henlei* (TC) y el número de padres estimado por GERUD (NP). La recta se ajustó por $NP = 0.0657 (TC) + 1.1245$ ($r^2 = 0.3697$, $F = 5.864$, $P\text{-valor} = 0.036$, $n = 12$).

Análisis de Selección Sexual Femenina

El GLM reveló una variación significativa entre el factor de condición de los embriones en función de la paternidad. En contra parte, el GLZ no mostró diferencias, por lo que la posición de los embriones dentro de los úteros no mostró relación con la identidad de los padres (Tabla VI).

Tabla VI. Resultados de las relaciones del factor de condición y posición de los embriones de *Mustelus henlei* con la identidad de los padres.

Estadístico	Variable de respuesta	Estadístico de Wald	Grados de libertad	P-valor
GLM	Factor de condición	64.52	24	>0.001
GLZ	Posición dentro del útero	31.38	24	0.14

VIII. DISCUSIÓN

Estimación de la Frecuencia de Paternidad Múltiple y Sesgo de Paternidad

En el presente estudio, la frecuencia de PM en *M. henlei* estuvo entre 66.7 y 75% de acuerdo con las estimaciones realizadas en GERUD y COLONY, respectivamente. Estos resultados indican congruencia entre los métodos, si bien COLONY estimó mayor PM, la diferencia es de tan solo 8.3%. Se ha sugerido que la comparación entre las estimaciones de COLONY y GERUD permite identificar el número de padres más probable dentro de las camadas (Lyons *et al.*, 2017). Por ejemplo, si hay una alta congruencia entre las estimaciones de ambos programas, entonces se espera que el número de padres estimado se encuentre dentro del rango que indican ambos enfoques. Esta concordancia entre estimaciones es similar a la observada en otros estudios en donde se han empleado microsatélites específicos para las especies, como en *C. plumbeus* (cinco loci utilizados en 20 camadas, 13 con las mismas estimaciones por parte de GERUD y COLONY; Portnoy *et al.*, 2007) y *Carcharhinus amblyrhynchos* (14 loci utilizados en seis camadas, cinco con las mismas estimaciones por parte de GERUD y COLONY; Green *et al.*, 2017).

La frecuencia de PM en *M. henlei* es elevada en comparación con las estimaciones que se han realizado en otras especies de la familia Triakidae, como en el caso de *Mustelus antarcticus* (31% de PM en 29 camadas; Boomer *et al.*, 2013), *M. mustelus* (47 - 67% de PM en seis y 19 camadas, respectivamente; Marino *et al.*, 2015; Rossouw *et al.*, 2016), *Mustelus punctulatus* (54% de PM en 13 camadas; Marino *et al.*, 2015) y *Mustelus californicus* (Monogamia genética en dos camadas; Tárula-Marín y Saavedra-Sotelo, 2021). Comparando estos resultados con estudios previos en *M. henlei*, la estimación del presente estudio es similar a un registro previo en la misma localidad (86% en 15 camadas; Rendón-Herrera *et al.*, 2022), e intermedia a lo reportado entre Las Barrancas, Baja California Sur (93% en 14 camadas; Byrne y Avise, 2012) y Santa Catalina, California (22% en 18 camadas; Chabot y Haggin, 2014).

Los resultados de este estudio indican un sesgo de PM en al menos 62.5% de las camadas analizadas. Este resultado es similar a lo que se ha observado anteriormente para esta especie en esta misma localidad (69.2%, nueve de 13 camadas con PM; Rendón-Herrera *et al.*, 2022), así como a lo observado en otra población de *M. henlei* (75%, tres de las cuatro camadas con PM en Santa Catalina, California; Chabot y Haggin, 2014). Por otra parte, esta predominancia de sesgo en el éxito reproductivo de los machos también se ha observado en otras especies de la familia Triakidae como *M. lenticulatus* (87.5%, siete de ocho camadas con PM), *M. antarcticus* (88.89%, ocho de nueve camadas con PM; Boomer *et al.*, 2013), *M. mustelus* (88.89%, ocho de nueve camadas con PM) y *M. punctulatus* (100%, siete camadas con PM; Marino *et al.*, 2015). Este sesgo en el éxito reproductivo de los machos suele tomarse como indicio de la ocurrencia de procesos crípticos post-copulatorios (Fitzpatrick *et al.*, 2012; Lyons *et al.*, 2021), los cuales pueden provenir de ambos sexos. De acuerdo con la metodología utilizada en este estudio, en *M. henlei* se evaluaron dos procesos crípticos post-copulatorios femeninos: nutrición controlada y ovulación diferencial.

Desarrollo Embrionario Diferencial como Mecanismo de Selección Sexual Femenina

La comparación entre las relaciones longitud-peso de los úteros izquierdo y derecho es un punto de partida para establecer si las hembras presentan alguna preferencia en el desarrollo de los embriones o existen factores externos que afectan el desarrollo. En este sentido, de encontrarse diferencias en las relaciones longitud-peso entre úteros, es posible que algún proceso ajeno a la hembra esté sesgando los recursos destinados al desarrollo embrionario hacia un solo útero, proceso en el que no influiría la paternidad de las crías (Lyons *et al.*, 2017). Los resultados de estos análisis no mostraron diferencias significativas entre los embriones de ambos úteros (Figura 9), lo que además es corroborado por una comparación de medias de las LT y pesos de los embriones entre úteros ($W = 1075.5^{ns}$ y $W = 1088^{ns}$, respectivamente). Esto sugiere que no existe una influencia externa en el desarrollo de los embriones y que, por lo tanto, es posible que de encontrarse algún patrón en la longitud y/o peso de los embriones dentro de cada útero, estos estén relacionados con la selección sexual femenina.

Por otra parte, la comparación de medias entre los factores de condición de los embriones entre úteros reveló diferencias significativas, incluso después de eliminar datos extremos (Figura 10; $W = 1499^{***}$). Se ha señalado que en general, en las especies placentotróficas, las hembras tienen la oportunidad de asignar recursos al desarrollo de los embriones de forma diferencial (Hertig y Rock, 1949; Gosling, 1986; Zeh y Zeh, 1996); esto puede lograrse a través de la interrupción del desarrollo de los embriones engendrados por machos genéticamente incompatibles, es decir, machos emparentados con las hembras. La interrupción del desarrollo embrionario es modulada por una respuesta inmune, ya que los embriones con un genoma lo suficientemente distinto a los de sus madres, suelen presentar una menor probabilidad de desencadenar la respuesta de anticuerpos de bloqueo que está relacionada con el aborto (Zeh y Zeh, 1997). Es esta misma respuesta inmune la que permite a las hembras de especies placentotróficas desviar recursos de las crías inviábiles, que generan esta respuesta, a las crías engendradas por machos compatibles (Zeh y Zeh, 1997). *Mustelus henlei* es una especie placentotrófica, por lo que es de esperar esta capacidad de controlar la nutrición de los embriones, de acuerdo con los resultados del GLM, el factor de condición está relacionado con la paternidad ($Wald\chi^2 = 64.52^{***}$); por lo tanto, la nutrición controlada puede ser un proceso de selección críptica post-copulatoria femenina en la especie.

Aunado a lo anterior, cabe mencionar que una hembra (MHEPL53) presentó un embrión con malformaciones evidentes, carente de la segunda aleta dorsal y con peso significativamente menor al del resto de sus hermanos (3 g vs 29 y 34 g). Es posible que las malformaciones observadas sean ocasionadas por mecanismos que frenan el desarrollo de los embriones engendrados por machos genéticamente incompatibles (Zeh y Zeh, 1997). Sin embargo, esta propuesta debe ser tomada con cautela, ya que este fue un caso aislado en los 101 embriones analizados. Además, este embrión fue engendrado por el macho dominante de su camada, sin embargo, la camada estuvo conformada por solo tres embriones, escenario en donde el poder de resolución de los marcadores empleados para la detección de PM es limitado (Tabla IV).

La relación del factor de condición con la paternidad en *M. henlei* difiere de lo que se ha observado en otras especies de la familia Triakidae, como *Mustelus asterias* en donde se evaluó la variación en el peso de los embriones con respecto a la paternidad ($Wald\chi^2 = 7.313$ ^{ns}; Farrell *et al.*, 2014); y *M. mustelus* en donde se evaluó la variación en la LT de los embriones con respecto a la paternidad ($Wald\chi^2 = 24.09$ ^{ns}; Marino *et al.*, 2015). Es posible que esta diferencia entre estudios se deba principalmente a las variables utilizadas, en este estudio se consideró el factor de condición, una variable compuesta por la LT y peso de los embriones. Por otro lado, es importante considerar factores como el modo de reproducción, en el caso de *M. asterias*, se trata de una especie vivípara aplacentaria, donde los embriones presentan un saco vitelino durante gran parte de su desarrollo (Compagno, 1984). Por lo tanto, un control de la nutrición como el que ocurre en especies placentotróficas (Zeh y Zeh, 1997) podría no ser posible en *M. asterias*. Por otro lado, en *M. mustelus* el análisis tenía el propósito de investigar si el tamaño de los embriones sería un buen indicador del orden de inseminación (Marino *et al.*, 2015). Esta idea podría ser cierta si se tratara de una especie aplacentada, sin embargo, dado que *M. mustelus* es una especie vivípara placentaria (De Maddalena *et al.*, 2001), la LT de los embriones podría estar más relacionada con procesos de nutrición diferencial que con el orden de inseminación, por lo tanto no se logró observar un patrón (Marino *et al.*, 2015).

Aunado a lo anterior, en al menos seis de las 12 camadas en donde se evaluó la paternidad, se encontró un patrón en donde el embrión más grande (en peso) usualmente fue engendrado por el macho dominante (ver Anexo II). Sin embargo, al considerar estos resultados es importante tener en cuenta la influencia de factores como el aborto espontáneo ocasionado por el estrés al que se someten las hembras capturadas (Lyons *et al.*, 2021), por lo que es posible que se perdieran embriones.

La Ovulación Diferencial como Mecanismo de Selección Sexual Femenina

Se observaron dos patrones de posición de los embriones dentro los úteros, previamente descritos en la especie *U. halleri* (Lyons *et al.*, 2017). Estos patrones han sido atribuidos a la existencia de un control en la ovulación por parte de las hembras, un mecanismo que podría limitar el acceso de los machos hacia los ovocitos. De acuerdo con esto, la variación en la posición de los embriones reflejaría el orden de inseminación de los ovocitos, los cuales serían liberados al estar presente el esperma de un candidato óptimo (Heist *et al.*, 2011; Marino *et al.*, 2015). Sin embargo, el resultado del GLZ mostró que la variación en la posición de los embriones dentro del útero no está relacionada con la identidad del padre ($Wald\chi^2=31.38^{ns}$), por lo tanto, se sugiere que al menos en *M. henlei* no existe este control.

Por otra parte, es posible que los resultados obtenidos con el GLZ se deban en gran medida a las dificultades para evaluar la variable posición en una especie como *M. henlei*. Contrario a lo que se esperaría en una especie vivípara placentaria, en donde los compartimientos uterinos limitarían el movimiento de los embriones (Conrath y Musick, 2012), en el caso de las hembras de *M. henlei* los compartimientos uterinos fueron frágiles y no evitaron el movimiento de los embriones una vez retirado el aparato reproductor. Además, el uso del cordón umbilical como guía para asignar posiciones resultó complicado en la mayoría de los casos, debido al escaso grosor y fragilidad de los mismos. Por otra parte, la manipulación de los úteros en campo pudo influir en el mapeo de posiciones de los embriones, en algunas ocasiones no fue posible obtener la ubicación exacta o algunos embriones se perdieron en el traslado de la pesca a tierra (ver Anexo II, camadas MHEPL44, MHEPL46 y MHEPL48).

En comparación, durante la recolección de los tejidos se inspeccionó la camada de una hembra de la especie *Rhizoprionodon longurio*, en la cual se observó un mayor grosor tanto de los compartimientos uterinos como de los cordones umbilicales, lo que permitió una asignación rápida y confiable de las posiciones de los embriones. Es posible que estas diferencias en el grosor de los cordones estén moduladas por factores endócrinos durante el desarrollo embrionario de las especies placentotróficas (Hamlett, 1993) y deben ser

consideradas en estudios futuros que busquen evaluar la variación de las posiciones de los embriones dentro de los úteros.

De acuerdo con los antecedentes, existe un solo registro de relación entre la posición y la paternidad de los embriones en *U. halleri*, como un indicador de los patrones de ovulación diferencial (Lyons *et al.*, 2017). A diferencia de lo observado en este estudio, evaluar la posición de los embriones en las rayas puede ser factible, si bien no existe un cordón umbilical o compartimientos uterinos que permitan servir de guía para asignar posiciones, los embriones mantienen sus posiciones al encontrarse compactados en el útero (Lara-Alcantara *et al.*, 2023). La compactación de los embriones formando hileras en cada útero permite un mapeo exacto de las posiciones.

Los resultados obtenidos en este estudio no implican la falta de acción de otros procesos críticos post-copulatorios, además del uso no azaroso del esperma por parte de las hembras, como pueden ser: mezcla y estratificación del esperma y competencia espermática, procesos que suelen ocurrir en especies con glándula oviducal (Firman *et al.*, 2017). Particularmente, la competencia espermática entre machos de *M. henlei* podría ser posible, ya que se han observado diferentes fases de la espermatogénesis al mismo tiempo dentro del epitelio germinativo (Soto-López *et al.*, 2018), lo que sugiere que los machos pierden intensidad de eyaculación en cada apareamiento; por lo tanto, existe la posibilidad de que la especie presente adaptaciones fisiológicas que hagan más competentes a sus gametos en el proceso de fertilización (Fitzpatrick *et al.*, 2012). Sin embargo, dichos mecanismos de control no pueden ser evaluados con la metodología utilizada. Aunado a esto, es posible que exista una sinergia entre los procesos de selección críticos de ambos sexos que ocurren en las glándulas oviducal, lo que dificulta atribuir un patrón observado a un solo mecanismo de selección crítica.

Relevancia del Comportamiento Reproductivo en el Manejo Pesquero

La evaluación del comportamiento reproductivo de las especies de importancia comercial tiene potencial para la elaboración de estrategias de manejo de recursos pesqueros.

Anteriormente se ha sugerido la relevancia de entender estos procesos en las poblaciones sujetas a extracción pesquera, debido a que los sistemas de apareamiento constituyen un marco dentro del cual operan todos los parámetros reproductivos de una especie (Rowe y Hutchings, 2003). Un sistema monógamo o polígamo tendrán efectos diferentes en las tasas de recuperación poblacional de las especies. Por lo tanto, el sistema de apareamiento impacta directamente en la densidad y en la permanencia de una población, modificando su N_e y su diversidad genética (Karl, 2008).

En lo que respecta a las evaluaciones de PM, éstas podrían resultar de utilidad para establecer una talla de captura con base en la capacidad de las hembras para generar camadas con múltiples padres. Por ejemplo, en *M. henlei*, se ha detectado que las hembras con una LT menor a 62 cm tienen una alta probabilidad de generar camadas con solo un padre, mientras que aquellas con una LT entre 90 y 95 cm pueden tener camadas engendradas hasta por cuatro padres (Rendón-Herrera *et al.*, 2022). Con base en esto, podría promoverse la protección de las hembras con una LT igual o menor a 90 cm, ya que teóricamente, dentro de este rango se encuentran tanto hembras monógamas como hembras poliándricas que asegurarían los beneficios derivados de ambos comportamientos para la población (mayor diversidad genética dentro de las camadas en el caso de la poliandria, menor sesgo en el éxito reproductivo de los machos en el caso de la monogamia; Karl, 2008). Además, restringir la captura de hembras menores a 90 cm, aseguraría que las hembras jóvenes sean parte de la dinámica poblacional durante más ciclos reproductivos. Sin embargo, este enfoque es solamente complementario a la evaluación del resto de parámetros que dan un indicio del potencial reproductivo femenino.

Por otro lado, se ha resaltado la importancia de monitorear el comportamiento reproductivo de las hembras en diferentes poblaciones, debido a que se ha observado una variación geográfica del sistema de apareamiento (Chabot y Haggin, 2014; Rendón-Herrera *et al.*, 2022). Esto significa que cada población tiene un comportamiento demográfico diferente, por lo que, la estrategia mencionada debería ser revisada para cada stock.

Finalmente, hasta el momento son pocos los estudios que han evaluado los mecanismos de selección críptica post-copulatoria que promueven el sesgo de paternidad

en elasmobranquios (Farrell *et al.*, 2014; Marino *et al.*, 2015; Lyons *et al.*, 2017). Estos mecanismos son relevantes para entender la frecuencia de PM en las poblaciones y evaluar la capacidad de una población para recuperarse de declives poblacionales. De acuerdo con los registros más recientes, *M. henlei* es una especie abundante en las capturas de elasmobranquios en el Golfo de California (Saldaña-Ruiz *et al.*, 2017), lo que puede atribuirse a su potencial reproductivo (Yudin y Cailliet, 1990; Pérez-Jiménez y Sosa-Nishizaki, 2008; Soto-López *et al.*, 2018), así como a la presencia de poliandria y monogamia en diferentes proporciones en la misma localidad (Rendón-Herrera *et al.*, 2022). Esto último puede ser relevante para explicar las altas abundancias de la especie, ya que la presencia de ambos comportamientos reproductivos puede estar influyendo positivamente en la población del Golfo de California. Aunado a esto, los resultados del presente estudio sugieren que las hembras presentan mecanismos de selección sexual como la nutrición diferencial, lo que podría sumarse a la capacidad de recuperación de la población del Golfo de California.

IX. CONCLUSIONES

Los análisis de paternidad en embriones de *M. henlei* mostraron evidencia de sesgo en el éxito reproductivo masculino, influenciado por mecanismos de selección sexual críptica femenina como la nutrición controlada. El factor de condición de los embriones está relacionado con la identidad del padre, esto significa que las hembras pueden desviar nutrientes a embriones engendrados por machos con mejor aptitud.

La relación entre el factor de condición y la paternidad de las crías podría tener implicaciones en la capacidad de recuperación de una población, ya que esta sugiere que las hembras priorizan el desarrollo de los embriones engendrados por ciertos machos cuyos rasgos podrían incidir en la supervivencia y éxito reproductivo de la progenie. Aunado a esto, ya que el sesgo en el éxito reproductivo de los machos no es promovido exclusivamente por las hembras, es necesario diseñar estrategias de muestreo que permitan evaluar mecanismos de competencia espermática, debido a que ambos actúan de manera sinérgica.

X. LITERATURA CITADA

- Aljanabi S. M. y I. Martinez. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR- based techniques. *Nucleic Acids Res.*, 25: 4692–4693.
- Armada-Tapia S., J. L. Castillo-Géniz, N. Victoria-Cota., L. R. Arce-Valdés y L. M. Enríquez-Paredes. 2022. First evidence of multiple paternity in the blue shark (*Prionace glauca*). *J. Fish Biol.*, 102: 528–531.
- De Arruda M. P., E. C. Gonçalves, M. P. C. Schneider, A. L. Da Costa Da Silva y E. Morielle-Versute. 2010. An alternative genotyping method using dye-labeled universal primer to reduce unspecific amplifications. *Mol. Biol. Rep.*, 37: 2031–2036.
- Bateman A. J. 1948. Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity (Edinb.)*, 2: 349–368.
- Bizzarro, J.J., W. D. Smith, R. E. Hueter, J. Tyminski, J. F. Márquez-Farías, J. L. Castillo-Géniz, G. M. Cailliet, C. J. Villavicencio-Garayzar. 2007. The status of shark and ray fishery resources in the Gulf of California: applied research to improve management and conservation. Moss Landing Marine Laboratories Tech. Pub. 2009–01.
- Boomer J. J., R. G. Harcourt, M. P. Francis, T. I. Walker, J. M. Braccini y A. J. Stow. 2013. Frequency of multiple paternity in gummy shark, *Mustelus antarcticus*, and rig, *Mustelus lenticulatus*, and the implications of mate encounter rate, postcopulatory influences, and reproductive mode. *J. Hered.*, 104: 371–379.
- Brookfield J. F. Y. 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Mol. Ecol.*, 5: 453–455.
- Brown J. L. 1997. A theory of mate choice based on heterozygosity. *Behav. Ecol.*, 8: 60–65.
- Byrne R. J., y J. C. Avise. 2012. Genetic mating system of the brown smoothhound shark (*Mustelus henlei*), including a literature review of multiple paternity in other elasmobranch species. *Mar. Biol.*, 159: 749–756.
- Carrier J. C., H. L. Pratt y J. I. Castro. 2004. Reproductive biology of elasmobranchs. p. 269-284. En J. C. Carrier, J. A. Musick, y M. R. Heithaus (eds.). *Biology of sharks and their relatives*. Boca Raton, Florida, EEUU: CRC Press. Taylor & Francis Group. 608p.
- Castro J. I. 2000. The biology of the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*, off the Florida east coast and the Bahama Islands. *Environ. Biol. Fishes*, 58: 1–22.
- Chabot C. L. 2012. Characterization of 11 microsatellite loci for the brown smooth-hound shark, *Mustelus henlei* (Triakidae), discovered with next-generation sequencing. *Conserv. Genet. Resour.*, 4: 23–25.
- Chabot C. L. y B. M. Haggin. 2014. Frequency of multiple paternity varies between two

- populations of brown smoothhound shark, *Mustelus henlei*. *Mar. Biol.*, 161: 797–804.
- Chabot C. L., M. Espinoza, I. Mascareñas-Osorio y A. Rocha-Olivares. 2015. The effect of biogeographic and phylogeographic barriers on gene flow in the brown smoothhound shark, *Mustelus henlei*, in the northeastern Pacific. *Ecol. Evol.*, 5: 1585–1600.
- Chakraborty R., M. Andrade, S.P. Daiger y B. Budowle. 1992. Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications. *Ann. Hum. Genet.*, 56: 45–57.
- Chapman D. D., S. P. Wintner, D. L. Abercrombie, J. Ashe, A. M. Bernard, M. S. Shivji y K. A. Feldheim. 2013. The behavioural and genetic mating system of the sand tiger shark, *Carcharias taurus*, an intrauterine cannibal. *Biol. Lett.*, 9: 20130003–20130003.
- Chapman D. D., P. A. Prodöhl, J. Gelsleichter, C. A. Manire y M. S. Shivji. 2004. Predominance of genetic monogamy by females in a hammerhead shark, *Sphyrna tiburo*: implications for shark conservation. *Mol. Ecol.*, 13: 1965–1974.
- Chapman T., G. Arnqvist, J. Bangham y L. Rowe. 2003. Sexual conflict. *Trends Ecol. Evol.*, 18: 41–47.
- Chen Y., D. A. Jackson y H. H. Harvey. 1992. A comparison of von Bertalanffy and polynomial functions in modelling fish growth data. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 49: 1228–1235.
- Compagno L. J. V. 1984. Sharks of the world. An annotated and illustrated catalogue of shark species to date. Part II (Carcharhiniformes). *FAO Fish. Synopsis*, 4, 250–655.
- Conrath C. y J. A. Musick. 2012. Reproductive biology of elasmobranchs. p. 291–306. *En* J. C. Carrier, H. L. Pratt, y J. I. Castro (eds.). *Biology of sharks and their relatives*. Boca Raton, Florida, EEUU: CRC Press. Taylor & Francis Group. 666p.
- Culina A., R. Radersma y B. C. Sheldon. 2015. Trading up: the fitness consequences of divorce in monogamous birds. *Biol. Rev.*, 90; 1015–1034.
- Daly-Engel T. S., R. D. Grubbs, B. W. Bowen y R. J. Toonen. 2007. Frequency of multiple paternity in an unexploited tropical population of sandbar sharks (*Carcharhinus plumbeus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 64: 198–204.
- Daly-Engel T. S., R. D. Grubbs, K. A. Feldheim, B. W. Bowen y R. J. Toonen. 2010. Is multiple mating beneficial or unavoidable? low multiple paternity and genetic diversity in the shortspine spurdog *Squalus mitsukurii*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 403: 255–267.
- Dawkins, R. 1976. La batalla de los sexos. p. 186–224. *En* R. Dawkins (ed). *El gen egoísta: Las bases biológicas de nuestra conducta*. Barcelona, España: Salvat Editores. 335p.
- DeWoody J. A. y J. C. Avise. 2001. Genetic perspectives on the natural history of fish mating systems. *J. Hered.*, 92: 167–172.

- DiBattista J. D., K. A. Feldheim, X. Thibert-Plante, S. H. Gruber y A. P. Hendry. 2008a. A genetic assessment of polyandry and breeding-site fidelity in lemon sharks. *Mol. Ecol.*, *17*: 3337–3351.
- DiBattista J. D., K. A. Feldheim, S. H. Gruber y A. P. Hendry. 2008b. Are indirect genetic benefits associated with polyandry? testing predictions in a natural population of lemon sharks. *Mol. Ecol.*: *17*, 783–795.
- Domingues R. R., A. W. S. Hilsdorf y O. B. F. Gadig. 2017. The importance of considering genetic diversity in shark and ray conservation policies. *Conserv. Genet.*, *19*: 501–525.
- Ebert D. A. 2003. Ground sharks (Carcharhiniformes). p. 125-179. En D. A. Ebert (ed.), *Sharks, rays and chimaeras of California*. Berkeley, CA. EEUU: University of California Press. 304p.
- Ellegren H. y N. Galtier. 2016. Determinants of genetic diversity. *Nat. Rev. Genet.*, *17*: 422–433.
- Farrell E. D., N. O’Sullivan, C. Sacchi y S. Mariani. 2014. Multiple paternity in the starry smooth-hound shark *Mustelus asterias* (Carcharhiniformes: Triakidae). *Biol. J. Linn. Soc.*, *111*: 119–125.
- Feldheim K. A., S. H. Gruber y M. V. Ashley. 2001. Multiple paternity of a lemon shark litter (Chondrichthyes: Carcharhinidae). *Copeia*, *2001*: 781–786.
- Feldheim K. A., S. H. Gruber y M. V. Ashley. 2004. Reconstruction of parental microsatellite genotypes reveals female polyandry and philopatry in the lemon shark, *Negaprion brevirostris*. *Evolution (N. Y.)*, *58*: 2332–2342.
- Firman R. C., C. Gasparini, M. K. Manier y T. Pizzari. 2017. Postmating female control: 20 years of cryptic female choice. *Trends Ecol. Evol.*, *32*: 368–382.
- Fitzpatrick J. L., R. M. Kempster, T. S. Daly-Engel, S. P. Collin y J. P. Evans. 2012. Assessing the potential for post-copulatory sexual selection in elasmobranchs. *J. Fish Biol.*, *80*: 1141–1158.
- García-González F. y L. W. Simmons. 2005. The evolution of polyandry: intrinsic sire effects contribute to embryo viability. *J. Evol. Biol.*, *18*: 1097–1103.
- Gilbert P. W. y G. W. Heath. 1972. The clasper-siphon sac mechanism in *Squalus acanthias* and *Mustelus canis*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.*, *42*: 97–119.
- Gosling L. M. 1986. Selective abortion of entire litters in the coypu: adaptive control of offspring production in relation to quality and sex. *Am. Nat.*, *127*: 772–795.
- Green M. E., S. A. Appleyard, W. White, S. Tracey y J. Ovenden. 2017. Variability in multiple paternity rates for grey reef sharks (*Carcharhinus amblyrhynchos*) and scalloped hammerheads (*Sphyrna lewini*). *Sci. Rep.*, *7*: 1–8.
- Griffiths A. M., D. M. P. Jacoby, D. Casane, M. McHugh, D. P. Croft, M. J. Genner y D.

- W. Sims. 2012. First analysis of multiple paternity in an oviparous shark, the small-spotted catshark (*Scyliorhinus canicula* L.). *J. Hered.*, 103: 166–173.
- Hamlett W. C. 1993. Ontogeny of the umbilical cord and placenta in the Atlantic sharpnose shark, *Rhizoprionodon terraenovae*. *Environ. Biol. Fishes*, 38: 253–267.
- Hamlett W. C. 1999. Male reproductive system. p. 444-471. *En* W. C. Hamlett (ed.). *Sharks, skates, and rays: the biology of elasmobranch fishes*. Baltimore, MD, EEUU: John Hopkins university press. 528p.
- Hasson O. y L. Stone. 2009. Male infertility, female fertility and extrapair copulations. *Biol. Rev.*, 84: 225–244.
- Heideman P. D. 1988. The timing of reproduction in the fruit bat *Haplonycteris fischeri* (Pteropodidae): geographic variation and delayed development. *J. Zool.*, 215: 577–595.
- Heist E. J., J. C. Carrier, H. L. Pratt y T. C. Pratt. 2011. Exact enumeration of sires in the polyandrous nurse shark (*Ginglymostoma cirratum*). *Copeia*, 2011: 539–544.
- Hertig A. T. y J. Rock. 1949. A series of potentially abortive ova recovered from fertile women prior to the first missed menstrual period. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 58: 968–993.
- Holmes B. J., L. C. Pope, S. M. Williams, I. R. Tibbetts, M. B. Bennett y J. R. Ovenden. 2018. Lack of multiple paternity in the oceanodromous tiger shark (*Galeocerdo cuvier*). *R. Soc. Open Sci.*, 5: 1–9.
- Jennions M. D. y M. Petrie. 2000. Why do females mate multiply? a review of the genetic benefits. *Biol. Rev.*, 75: 21–64.
- Jones A. G. 2005. GERUD 2.0: A computer program for the reconstruction of parental genotypes from half-sib progeny arrays with known or unknown parents. *Mol. Ecol. Notes*, 5: 708–711.
- Kajiura S. M. y T. C. Tricas. 1996. Seasonal dynamics of dental dexual dimorphism in the Atlantic stingray *Dasyatis sabina*. *J. Exp. Biol.*, 199: 2297–2306.
- Kajiura S. M., A. P. Sebastian y T. C. Tricas. 2000. Dermal bite wounds as indicators of reproductive seasonality and behaviour in the Atlantic stingray, *Dasyatis sabina*. *Environ. Biol. Fishes*, 58: 23–31.
- Karl S. A. 2008. The effect of multiple paternity on the genetically effective size of a population. *Mol. Ecol.*, 17: 3973–3977.
- Kirkpatrick M. 1987. Sexual selection by female choice in polygynous animals. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 18: 43–70.
- Klimley A. P. 1985. Schooling in *Sphyrna lewini*, a species with low risk of predation: a non-egalitarian state. *Z. Tierpsychol.*, 70: 297–319.

- Kozłowski J. y S. Stearns. 1989. Hypotheses for the production of excess zygotes: models of bet-hedging and selective abortion. *Evolution (N. Y.)*, 43: 1369–1377.
- Kvarnemo C. 2018. Why do some animals mate with one partner rather than many? a review of causes and consequences of monogamy. *Biol. Rev.*, 93: 1795–1812.
- Lage C. R., C. W. Petersen, D. Forest, D. Barnes, I. Kornfield y C. Wray. 2008. Evidence of multiple paternity in spiny dogfish (*Squalus acanthias*) broods based on microsatellite analysis. *J. Fish Biol.*, 73: 2068–2074.
- Lamarca F., P. H. Carvalho, A. Vilasboa, A. L. Netto-Ferreira, y M. Vianna. 2020. Is multiple paternity in elasmobranchs a plesiomorphic characteristic? *Environ. Biol. Fishes*, 103: 1463–1470.
- Lara-Alcantara A. A., O. Mendez y L. F. Del Moral-Flores. 2023. Evidencia del máximo número de crías en la raya mariposa, *Gymnura lessae* (Myliobatiformes: Gymnuridae), en el Golfo de México. *Acta Zoológica Lilloana*, 1: 137–142.
- LeCreen E. D. 1951. The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). *J. Anim. Ecol.*, 20: 201–219.
- Liu S. Y. V., W. P. Tsai, M. Lee y H. W. Chien. 2020. Assessing multiple paternity in the shortfin mako shark (*Isurus oxyrinchus*). *Zool. Stud.*, 59: 1–13.
- Lotterhos K. E. 2011. The context-dependent effect of multiple paternity on effective population size. *Evolution (N. Y.)*, 65: 1693–1706.
- Lyons K., C. L. Chabot, C. G. Mull, C. N. Paterson-Holder y C. G. Lowe. 2017. Who's my daddy? Considerations for the influence of sexual selection on multiple paternity in elasmobranch mating systems. *Ecol. Evol.*, 7: 5603–5612.
- Lyons K., D. Kacev y C. G. Mull. 2021. An inconvenient tooth: evaluating female choice in multiple paternity using an evolutionarily and ecologically important vertebrate clade. *Mol. Ecol.*, 30: 1574–1593.
- De Maddalena A., L. Piscitelli y R. Malandra. 2001. The largest specimen of smooth-hound, *Mustelus mustelus* (Linnaeus, 1758), recorded from the Mediterranean sea. *Biljeske-Notes*, 2001: 1–6.
- Marino I. A. M., E. Riginella, M. Gristina, M. B. Rasotto, L. Zane y C. Mazzoldi. 2015. Multiple paternity and hybridization in two smooth-hound sharks. *Sci. Rep.*, 5: 12919.
- Musick J. A., G. Burgess, G. Cailliet, M. Camhi y S. Fordham. 2000. Management of sharks and their relatives (Elasmobranchii). *Fisheries*, 25: 9–13.
- Nash C. S., P. C. Darby, B. S. Frazier, J. M. Hendon, J. M. Higgs, E. R. Hoffmayer y T. S. Daly-Engel. 2021. Multiple paternity in two populations of finetooth sharks (*Carcharhinus isodon*) with varying reproductive periodicity. *Ecol. Evol.*, 11: 11799–11807.

- Naylor G. J. P., J. A. Ryburn, O. Fedrigo y A. Lopez. 2005. p. 1-25. Phylogenetic relationships among the major lineages of modern elasmobranchs. En W. C. Hamlett (ed.). *Reproductive biology and phylogeny of chondrichthyes: sharks, batoids and chimaeras*. Enfield, NH, EEUU: Science publishers. 576p.
- Neff B. D. y T. E. Pitcher. 2002. Assessing the statistical power of genetic analyses to detect multiple mating in fishes. *J. Fish Biol.*, 61: 739–750.
- Neff B. D. y T. E. Pitcher. 2005. Genetic quality and sexual selection: an integrated framework for good genes and compatible genes. *Mol. Ecol.*, 14: 19–38.
- Nevatte R. J., J. E. Williamson y M. R. Gillings. 2023. First evidence of multiple paternity and hybridisation in Australian sawsharks. *Mar. Freshw. Res.*, 74: 586–600.
- Newcomer S. D., J. A. Zeh y D. W. Zeh. 1999. Genetic benefits enhance the reproductive success of polyandrous females. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96: 10236–10241.
- Nosal A. P., E. A. Lewallen y R. S. Burton. 2013. Multiple paternity in leopard shark (*Triakis semifasciata*) litters sampled from a predominantly female aggregation in La Jolla, California, USA. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, 446: 110–114.
- Nunney L. 1993. The influence of mating system and overlapping generations on effective population size. *Evolution (N. Y.)*, 47: 1329.
- Olsson M., R. Shine, T. Madsen, A. Gullberg y H. Tegelstrom. 1996. Sperm selection by females. *Nature*, 383: 585.
- Van Oosterhout C., W. F. Hutchinson, D. P. M. Wills y P. Shipley. 2004. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes*, 4: 535–538.
- Parreira B. R. y L. Chikhi. 2015. On some genetic consequences of social structure, mating systems, dispersal, and sampling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 112: E3318–E3326.
- Pauly D. 1984. Fish growth. p. 23-41. En D. Pauly (ed.). *Fish population dynamics in tropical waters: a manual for use with programmable calculators*. Manila, Filipinas: International center for living aquatic resources management. 289p.
- Peakall R. y P. E. Smouse. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes*, 6:288–295.
- Peakall R., y P. E. Smouse. 2012. GENALEX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28: 2537–2539.
- Pérez-Jiménez J. C., A. B. Carlisle, C. L. Chabot, V. E. Vásquez y D. A. Ebert. 2016. *Mustelus henlei*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T161648A80672263.<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20162.RLTS.T161648A80672263.en>. Accessed on 18 August 2023.

- Pérez-Jiménez J. C y O. Sosa-Nishizaki. 2008. Reproductive biology of the brown smoothhound shark *Mustelus henlei*, in the northern Gulf of California, México. *J. Fish Biol.*, 73: 782–792.
- Pirog A., S. Jaquemet, M. Soria y H. Magalon. 2015. First evidence of multiple paternity in the bull shark (*Carcharhinus leucas*). *Mar. Freshw. Res.*, 68: 195–201.
- Portnoy D. S., A. N. Piercy, J. A. Musick, G. H. Burgess y J. E. Graves. 2007. Genetic polyandry and sexual conflict in the sandbar shark, *Carcharhinus plumbeus*, in the western North Atlantic and Gulf of Mexico. *Mol. Ecol.*, 16: 187–197.
- Portnoy D. S. y E. J. Heist. 2012. Molecular markers: progress and prospects for understanding reproductive ecology in elasmobranchs. *J. Fish Biol.*, 80: 1120–1140.
- Pratt H. L. 1979. Reproduction in the blue shark, *Prionace glauca*. *United States Fish. Bull.*, 77: 445–470.
- Pratt H. L. y J. C. Carrier. 2001. A review of elasmobranch reproductive behavior with a case study on the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*. *Environ. Biol. Fishes*, 60: 157–188.
- Quinn G. P. y M. J. Keough. 2002. Generalized linear models and logistic regression. p. 359-379. En G. P. Quinn y M. J. Keough (eds.). *Experimental design and data analysis for biologists*. Edinburgh, Reino Unido: Cambridge university press. 557p.
- Radwan J. 2003. Male age, germline mutations and the benefits of polyandry. *Ecol. Lett.*, 6: 581–586.
- Rendón-Herrera J. J., J. C. Pérez-Jiménez y N. C. Saavedra-Sotelo. 2022. Regional variation in multiple paternity in the brown smooth-hound shark *Mustelus henlei* from the northeastern Pacific. *J. Fish Biol.*, 100: 1399–1406.
- Rosenthal G. G. y M. J. Ryan. 2022. Sexual selection and the ascent of women: Mate choice research since Darwin. *Science*, 375: 1–10.
- Rossouw C., S. P. Wintner y A. E. Bester-Van Der Merwe. 2016. Assessing multiple paternity in three commercially exploited shark species: *Mustelus mustelus*, *Carcharhinus obscurus* and *Sphyrna lewini*. *J. Fish Biol.*, 89: 1125–1141.
- Rowe S. y J. A. Hutchings. 2003. Mating systems and the conservation of commercially exploited marine fish. *Trends Ecol. Evol.*, 18: 567–572.
- Saldaña-Ruiz L. E., O. Sosa-Nishizaki y D. Cartamil. 2017. Historical reconstruction of Gulf of California shark fishery landings and species composition, 1939–2014, in a data-poor fishery context. *Fish. Res.*, 195: 116–129.
- Sefc K. M. y S. Koblmüller. 2009. Assessing parent numbers from offspring genotypes: the importance of marker polymorphism. *J. Hered.*, 100: 197–205.
- Slatyer R. A., B. S. Mautz, P. R. Y. Backwell y M. D. Jennions. 2012. Estimating genetic

- benefits of polyandry from experimental studies: a meta-analysis. *Biol. Rev.*, 87: 1–33.
- Smith S. E, D. W. Au y C. Show. 1998. Intrinsic rebound potentials of 26 species of Pacific sharks. *Mar. Freshw. Res.*, 49: 663–678.
- Soto-López K., R. I. Ochoa-Báez, J. Tovar-Ávila y F. Galván-Magaña. 2018. Reproductive biology of the brown smooth-hound shark, *Mustelus henlei* (Chondrichthyes: Triakidae), off northwestern Mexico based on macroscopic and histological analyses. *Ciencias Mar.*, 44: 125–139.
- Stephens P. A., W. J. Sutherland y R. P. Freckleton. 1999. What is the allee effect? *Oikos*, 87: 185–190.
- Stephens P. A. y W. J. Sutherland. 2000. Vertebrate mating systems, Allee effects and conservation. p. 156-213. En M. Apollonio, M. Festa-Bianchet, y D. Mardini (eds.). *Vertebrate mating systems*. World Scientific Publishing Co. 340p.
- Tamura K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei y S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28: 2731–2739.
- Tárula-Marín A. O. y N. C. Saavedra-Sotelo. 2021. First record of the mating system in the grey smoothhound shark (*Mustelus californicus*). *Mar. Biol. Res.*, 17: 362–368.
- Torres Y., P. Charvet, V. V. Faria, y A. L. F De Castro. 2022. Evidence of multiple paternity for the endemic Xingu River stingray. *J. Fish Biol.*, 100: 1315–1318.
- Tregenza T. y N. Wedell. 2000. Genetic compatibility, mate choice and patterns of parentage: invited review. *Mol. Ecol.*, 9: 1013–1027.
- Veríssimo A., D. Grubbs, J. McDowell, J. Musick y D. Portnoy. 2011. Frequency of multiple paternity in the spiny dogfish *Squalus acanthias* in the Western North Atlantic. *J. Hered.*, 102: 88–93.
- Wandeler P., S. Smith, P. A. Morin, R. A. Pettifor y S. M. Funk. 2003. Patterns of nuclear DNA degeneration over time - A case study in historic teeth samples. *Mol. Ecol.*, 12: 1087–1093.
- Wang J. 2004. Sibship Reconstruction from Genetic Data with typing errors. *Genetics*, 166: 1963–1979.
- Webster M. S., S. Pruett-Jones, D. F. Westneat, y S. J. Arnold. 1995. Measuring the effects of pairing success, extra-pair copulations and mate quality on the opportunity for sexual selection. *Evolution (N. Y.)*, 49: 1147–1157.
- Yamaguchi A., T. Taniuchi y M. Shimizu. 2000. Geographic variations in reproductive parameters of the starspotted dogfish, *Mustelus manazo*, from five localities in Japan and in Taiwan. *Environ. Biol. Fishes*, 57: 221–233.
- Yudin K. G. y G. M. Cailliet. 1990. Age and growth of the gray smoothhound, *Mustelus*

californicus, and the brown smoothhound, *M. henlei*, sharks from Central California. *Copeia*, 1990: 191.

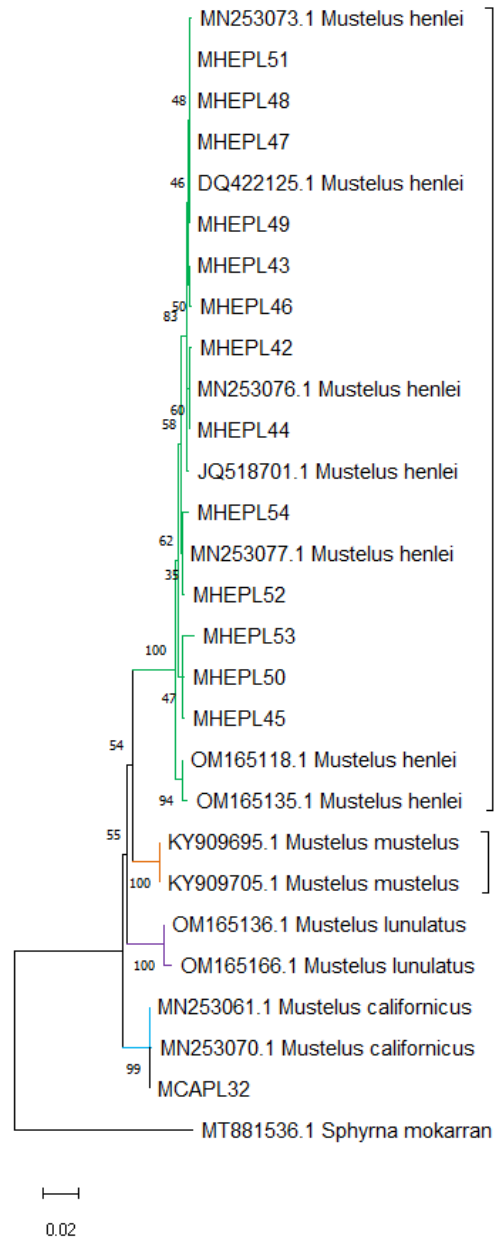
Zeh J. A. y D. W. Zeh. 1996. The evolution of polyandry I: intragenomic conflict and genetic incompatibility. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, 263: 1711–1717.

Zeh, J. A. y D. W. Zeh. 1997. The evolution of polyandry II: post-copulatory defenses against genetic incompatibility. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, 264: 69–75.

Zeh, J. A. y D. W. Zeh. 2003. Toward a new sexual selection paradigm: polyandry, conflict and incompatibility. *Ethology*, 109: 929–950.

Zeh, J. A. y D. W. Zeh. 2006. Outbred embryos rescue inbred half-siblings in mixed-paternity broods of live-bearing females. *Nature*, 439: 201–203.

XI. ANEXOS



I. Árbol filogenético del gen mitocondrial NADH2 en donde se comparan las secuencias de las hembras recolectadas en este estudio con la base de datos disponible en NCBI. La mayoría de las muestras se agruparon con el clado de *M. helei*, solo una de ellas con el clado *M. californicus*.

II. Ubicación de cada uno de los embriones en los úteros de sus respectivas madres. El número de padres corresponde a la estimación con COLONY. Cada tabla corresponde a la camada de una hembra.

Orden dentro del útero	ID DEL EMBRIÓN	Útero	LT	Peso	Padre
1	MHEPL42-E1	Derecho	19.5	13	1
2	MHEPL42-E2	Derecho	24	38	2
3	MHEPL42-E3	Derecho	25	41	2
4	MHEPL42-E4	Derecho	25	47	1
5	MHEPL42-E5	Derecho	24.5	42	2
6	MHEPL42-E6	Derecho	24	38	2
7	MHEPL42-E7	Derecho	25	44	2
8	MHEPL42-E8	Izquierdo	23	38	2
9	MHEPL42-E9	Izquierdo	21	29	2
10	MHEPL42-E10	Izquierdo	21	27	2
11	MHEPL42-E11	Izquierdo	26	49	2
12	MHEPL42-E12	Izquierdo	25	43	2
13	MHEPL42-E13	Izquierdo	24.5	40	2
14	MHEPL42-E14	Izquierdo	24	40	2
15	MHEPL42-E15	Izquierdo	25.5	47	2
16	MHEPL42-E16	Izquierdo	25	43	2
17	MHEPL42-E17	Izquierdo	24	37	2

Orden dentro del útero	ID DEL EMBRIÓN	Útero	LT	Peso	Padre
1	MHEPL43-E1	Derecho	27	46	1
2	MHEPL43-E2	Derecho	27	51	1
3	MHEPL43-E3	Derecho	26	43	1
4	MHEPL43-E4	Derecho	24	39	2
5	MHEPL43-E5	Derecho	24	43	1
6	MHEPL43-E6	Derecho	26.5	55	1
7	MHEPL43-E7	Derecho	26	43	1
8	MHEPL43-E8	Izquierdo	25	43	1
9	MHEPL43-E9	Izquierdo	25.5	47	1
10	MHEPL43-E10	Izquierdo	23	34	1
11	MHEPL43-E11	Izquierdo	26.5	53	1
12	MHEPL43-E12	Izquierdo	25.5	42	1
13	MHEPL43-E13	Izquierdo	25	42	1
14	MHEPL43-E14	Izquierdo	25.5	45	2

Orden dentro del útero	ID DEL EMBRIÓN	Útero	LT	Peso	Padre
1	MHEPL44-E1	Derecho	25	114	1
2	MHEPL44-E2	Derecho	25.5	50	1
3	MHEPL44-E3	Derecho	25.5	48	2
4	MHEPL44-E4	Izquierdo	26	44	1
5	MHEPL44-E5	Izquierdo	25.5	45	1
6	MHEPL44-E6	Izquierdo	25	54	1
7	MHEPL44-E7	Izquierdo	27	54	1
8	MHEPL44-E8	Izquierdo	22	36	1
9	MHEPL44-E9	N/A	24	57	1

Orden dentro del útero	ID DEL EMBRIÓN	Útero	LT	Peso	Padre
1	MHEPL45-E1	Derecho	25.5	46	1
2	MHEPL45-E2	Derecho	24	44	1
3	MHEPL45-E3	Derecho	26	53	1
4	MHEPL45-E4	Derecho	24	41	1
5	MHEPL45-E5	Izquierdo	24.5	43	1
6	MHEPL45-E6	Izquierdo	24.5	45	1
7	MHEPL45-E7	Izquierdo	25	45	1

Orden dentro del útero	ID DEL EMBRIÓN	Útero	LT	Peso	Padre
1	MHEPL46-E1	Derecho	28	63	1
2	MHEPL46-E2	Izquierdo	26.5	52	2
3	MHEPL46-E3	Izquierdo	26.5	48	3
4	MHEPL46-E4	Izquierdo	26	47	4
5	MHEPL46-E5	N/A	25.5	46	5

Orden dentro del útero	ID DEL EMBRIÓN	Útero	LT	Peso	Padre
1	MHEPL47-E1	Derecho	25	43	1
2	MHEPL47-E2	Derecho	25	44	2
3	MHEPL47-E3	Derecho	25	47	1
4	MHEPL47-E4	Derecho	24.5	44	2
5	MHEPL47-E5	Derecho	22.5	32	2
6	MHEPL47-E6	Izquierdo	25	46	1
7	MHEPL47-E7	Izquierdo	23	37	1
8	MHEPL47-E8	Izquierdo	25	43	2
9	MHEPL47-E9	Izquierdo	25.5	47	1
10	MHEPL47-E10	Izquierdo	25.5	44	1
11	MHEPL47-E11	Izquierdo	25.5	45	1

Orden dentro del útero	ID DEL EMBRIÓN	Útero	LT	Peso	Padre
1	MHEPL48-E1	Derecho	24	43	1
2	MHEPL48-E2	Derecho	23	40	2
3	MHEPL48-E3	Derecho	23.5	40	1
4	MHEPL48-E4	Derecho	24.5	48	1
5	MHEPL48-E5	Derecho	24.5	42	1
6	MHEPL48-E6	Derecho	22	37	1
7	MHEPL48-E7	Izquierdo	25	45	1
8	MHEPL48-E8	Izquierdo	24	43	1
9	MHEPL48-E9	Izquierdo	24	41	3
10	MHEPL48-E10	Izquierdo	22	38	1
11	MHEPL48-E11	Izquierdo	25	45	1
12	MHEPL48-E12	N/A	25	44	3

Orden dentro del útero	ID DEL EMBRIÓN	Útero	LT	Peso	Padre
1	MHEPL49-E1	Derecho	22.5	34	1
2	MHEPL49-E2	Izquierdo	21.5	26	1
3	MHEPL49-E3	Izquierdo	23	33	2
4	MHEPL49-E4	Izquierdo	22	37	2

Orden dentro del útero	ID DEL EMBRIÓN	Útero	LT	Peso	Padre
1	MHEPL50-E1	Derecho	22	29	1
2	MHEPL50-E2	Derecho	23	34	1
3	MHEPL50-E3	Derecho	20	28	1
4	MHEPL50-E4	Derecho	23	34	1
5	MHEPL50-E5	Izquierdo	21	31	2
6	MHEPL50-E6	Izquierdo	22	28	1
7	MHEPL50-E7	Izquierdo	22	33	3
8	MHEPL50-E8	Izquierdo	19.5	23	2
9	MHEPL50-E9	Izquierdo	23	34	1

Orden dentro del útero	ID DEL EMBRIÓN	Útero	LT	Peso	Padre
1	MHEPL51-E1	Derecho	25	44	1
2	MHEPL51-E2	Derecho	26.5	53	1
3	MHEPL51-E3	Izquierdo	27	55	1
4	MHEPL51-E4	Izquierdo	26.5	51	1
5	MHEPL51-E5	Izquierdo	24	41	1

Orden dentro del útero	ID DEL EMBRIÓN	Útero	LT	Peso	Padre
1	MHEPL52-E1	Derecho	22.5	32	1
2	MHEPL52-E2	Derecho	22	33	1
3	MHEPL52-E3	Derecho	23	34	1

Orden dentro del útero	ID DEL EMBRIÓN	Útero	LT	Peso	Padre
1	MHEPL53-E1	Derecho	26	44	1
2	MHEPL53-E2	Izquierdo	22	30	2
3	MHEPL53-E3	Izquierdo	14.5	3	1