



INSTITUTO
ESPAÑOL DE
OCEANOGRAFÍA



Máster en
biología
Marina

**CARACTERIZACIÓN
MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE
LA ESPECIE *DEANIA CALCEA*
(LOWE, 1839)**

Trabajo Final del Máster de Biología
Marina



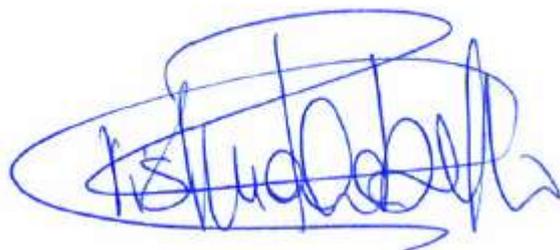
Irene Grasa Vázquez

Universidade da Coruña

Tutor Académico: Ignacio Bárbara (UDC)

Tutor Profesional: Cristina Rodríguez-Cabello (IEO)

La Dra. Cristina Rodríguez-Cabello, científica titular del Instituto Español de Oceanografía (IEO) de Santander, manifiesta que la alumna Irene Grasa Vázquez ha realizado el trabajo titulado **“Caracterización morfológica y molecular de la especie *Deania calcea* (Lowe, 1839)”** bajo su supervisión y autoriza su defensa ante el tribunal calificador con el fin de obtener el título de Máster de Biología Marina.



Fdo. Cristina Rodríguez-Cabello Ródenas

Investigadora Titular IEO

En Santander, a 7 de Septiembre de 2018.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. OBJETIVOS	5
3.1. Objetivo principal	5
3.2. Objetivos específicos	5
4. MATERIAL Y MÉTODOS	5
4.1. Área de estudio	5
4.2. Muestreo	7
4.3. Muestreo biológico	8
4.3.1. Medidas morfométricas	8
4.3.2. Análisis del contenido estomacal	8
4.3.3. Dentículos dérmicos	9
4.4. Barcoding: Extracción de ADN, amplificación y secuenciación.	10
4.5. Análisis estadístico	12
5. RESULTADOS	13
5.1. Medidas morfométricas	13
5.2. Análisis contenido estomacal	16
5.3. Dentículos dérmicos	17
5.4. Barcoding de ADN	19
6. DISCUSIÓN	21
6.1. Medidas morfométricas	21
6.2. Dentículos dérmicos	22
6.3. Análisis del contenido estomacal	23
6.4. Barcoding de ADN	24
7. CONCLUSIONES	25
8. BIBLIOGRAFÍA	26
9. ANEXOS	30

1. RESUMEN

Tradicionalmente, la identificación de los tiburones se ha realizado a partir de la comparación de sus características morfológicas y merísticas (número y tipo de dientes, vértebras y dentículos dérmicos). Sin embargo, para las familias de tiburones más estrechamente relacionadas, esto supone un reto incluso para los taxónomos más experimentados. Actualmente, aún existe una gran incertidumbre con respecto a la taxonomía de algunas especies de la familia Centrophoridae debido a la alta similitud morfológica entre ellas, la escasez de registros, descripciones originales insuficientes y pocos análisis taxonómicos realizados en el género *Deania* que actualmente incluye 4 especies. El siguiente trabajo tiene como objetivo caracterizar la especie de tiburón de profundidad *Deania calcea* desde una perspectiva multidisciplinar combinando las técnicas clásicas de taxonomía como es el estudio morfológico junto con las más avanzadas, como la herramienta de genética molecular barcoding. Los resultados de este estudio ponen de manifiesto que a nivel molecular no existe una clara diferenciación entre las especies del género *Deania* concretamente *D. calcea* y *D. hystricosa* aunque sí entre las otras dos especies *D. profundorum* y *D. quadrispinosa*. Desde el punto de vista morfológico sí existe una clara identificación de la especie analizada en este estudio *D. calcea* y *D. profundorum*. Los principales caracteres que discriminan ambas especies se basan en la longitud de las aletas dorsales, el espacio interdorsal así como distancia al origen de las mismas. El examen de los dentículos dérmicos pone de manifiesto que existe una gran variabilidad tanto en la forma y tamaño según la zona del cuerpo así como una correlación positiva con la talla de los ejemplares. Esto indica que este criterio taxonómico utilizado para identificar las especies *D. calcea* y *D. hystricosa* no es muy válido y deberían tenerse en cuenta otros caracteres como los mencionados anteriormente. Adicionalmente, se ha llevado a cabo un análisis de los contenidos estomacales para conocer la dieta y hábitos tróficos de esta especie en aguas del Cantábrico. La identificación correcta de las especies del género *Deania* así como otros tiburones de profundidad es esencial para la gestión y conservación de estos elasmobranquios de aguas profundas que son regularmente capturados de forma fortuita en las pesquerías de aguas profundas.

2. INTRODUCCIÓN

El género *Deania* comprende tiburones de aguas profundas de tamaño mediano (< 125 cm) caracterizados por un hocico extremadamente largo y ancho, espinas dorsales y cuerpos cilíndricos y comprimidos con piel rugosa cubierta por dentículos dérmicos con forma de horquilla ó tridente. Actualmente se reconocen cuatro especies, tres de las cuales se encuentran en el Atlántico Norte: *D. calcea* (Lowe, 1839), *D. hystricosa* (Garman, 1906) y *D. profundorum* (Smith y Radcliffe, 1912), mientras que *D. quadrispinosa* (McCulloch, 1915), se distribuye por el Pacífico Sur (ANEXO I). Las principales diferencias entre estas especies son: (1) la coloración, (2) la presencia de una quilla subcaudal en la superficie inferior del pedúnculo caudal, en el caso de *D. profundorum*, (3) el tamaño de los dentículos dérmicos del dorsolateral, que son relativamente grandes en *D. calcea* (0.5 mm) y muy grandes en *D. hystricosa* (> 1 mm) y (4) dentículos ahorquillados con 4 espinas, en el caso de la *D. quadrispinosa* (Ebert y Stehmann, 2013).

Los dentículos dérmicos o escamas placoideas se encuentran en los peces cartilagosos: tiburones y rayas, a excepción de las quimeras. Estructuralmente, son similares a los dientes de los vertebrados y están formados por una pulpa dentaria central irrigada por vasos sanguíneos rodeada, a su vez, por una capa cónica de dentina. La capa más externa está compuesta por vitrodentina, una sustancia inorgánica semejante al esmalte de los dientes (Rodríguez, 2009).

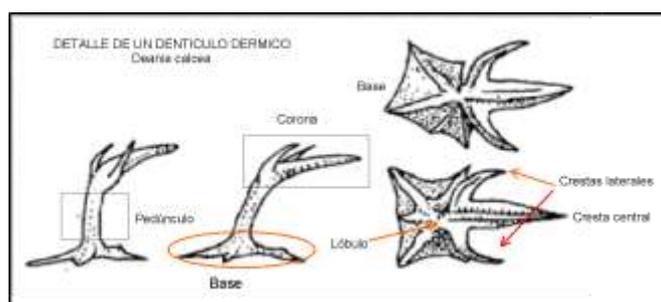


Figura 1: Partes de un dentículo dérmico de la especie *Deania calcea* (Tomado y adaptado de Compagno (1984)).

Las escamas placoideas típicamente consisten en: 1) una placa basal incrustada en la dermis, 2) un pedúnculo que se eleva desde la base y forma un cuello que se conecta con la corona y 3) la corona. En el caso del género *Deania* se caracterizan en general por tener forma de tridente con una cresta principal central y dos laterales

(Figura 1). Las escamas placoideas poseen una variedad de formas y tamaños según la especie (Rodrigues, 2009) y algunos autores las describen como “sin crecimiento” (Helfman *et al.*, 1997; Kemp, 1999) porque su capacidad de crecimiento es limitada. No obstante, durante la vida de un individuo, van creciendo hasta alcanzar un tamaño definitivo dependiendo de la talla del animal. A partir de entonces se reemplazan por escamas de mayor tamaño. Este proceso de renovación se repite continuamente pero no hay un patrón sincrónico de muda (Kemp, 1999).

Funcionalmente, los dentículos dérmicos se clasifican en distintos grupos que se corresponden con cinco morfologías bien definidas (Reif, 1982) y fueron propuestos como un criterio taxonómico para identificar grupos de tiburones por Muñoz-Chápuli, (1985) al poder relacionarlos con las características comunes de sus medios de vida.

- Grupo 1: Dentículos no funcionales, propios de especies que viven cerca del fondo, con natación lenta.
- Grupo 2: Dentículos con forma de botón o cruz para proteger de la abrasión, propios de especies que viven en sustratos rocosos.
- Grupo 3: Dentículos espinosos con función defensiva, en tiburones de fondos arenosos o fangosos.
- Grupo 4: Dentículos planos con coronas poco separadas, cuya función es la reducción del rozamiento en tiburones pelágicos y veloces.
- Grupo 5: Dentículos en forma de delgadas espinas con facetas cóncavas con función de soporte de órganos bioluminiscentes (fotóforos).

Además de la utilización de los dentículos dérmicos, la identificación de los elasmobranquios se ha basado en la descripción y comparación de fenotipos, es decir, de los caracteres morfológicos que diferencian una especie de otra. En elasmobranquios los principales caracteres utilizados en la identificación de especies se basan en los descritos por Compagno, (1984). Sin embargo, la identificación de campo de algunas familias de tiburones muy estrechamente relacionadas, como los carcarrínidos, centrofóridos y triáquidos, a menudo supone un gran reto (Bineesh *et al.*, 2016), lo que puede conducir a confusiones taxonómicas y, por tanto, a informes erróneos de captura y diversidad de las especies (Iglesias *et al.*, 2010).

De hecho, la familia Centrophoridae es uno de los grupos de especies más taxonómicamente complejos y confusos que está en revisión actualmente. Por ejemplo, diversos estudios han demostrado que las especies *Centrophorus acus*, *C. niaukang* y *C. lusitanicus* son en realidad, sinónimos juveniles del *C. granulatus* (White *et al.*, 2017; Verissimo *et al.*, (2014). Uno de los grandes problemas de la taxonomía tradicional es que muchas descripciones originales frecuentemente no describen caracteres informativos requeridos para distinguir claramente entre congéneres además de no existir holotipos para algunas especies. Por todo ello, en ausencia de material de referencia, las comparaciones que pueden hacerse entre las especies originales y las muestras problemáticas son limitadas ya que no se dispone de información acerca de los datos morfométricos. Otro factor que limita la identificación de especies es que muchos caracteres usados como diagnóstico frecuente como la forma y el tamaño de las aletas, los dentículos dérmicos, dientes o espinas dorsales varían con la ontogenia (Verissimo *et al.*, 2014). Por lo que, es posible que distintas fases ontogénicas (juvenil y adulto) hayan sido confundidas con taxones diferentes cuando en realidad pertenecen a la misma especie.

Debido a esto, se ha hecho necesario desarrollar otras técnicas de análisis moleculares que faciliten la identificación precisa de las especies. Inicialmente, se utilizaron marcadores proteicos mediante el análisis de alozimas, aunque posteriormente se sustituyeron por métodos basados en la secuencia de ADN debido a: (1) El ADN es más resistente a la degradación que las proteínas. (2) La expresión diferencial de las proteínas según el tejido y estadio de desarrollo (Martínez y Figueras, 2012).

Una de las técnicas más reconocidas actualmente es el código de barras de ADN o “barcoding”. El “barcoding” es una herramienta de taxonomía que se basa en el uso de una secuencia del gen mitocondrial de la citocromo c oxidasa I (COI) como identificador universal de forma análoga a los códigos de barras de uso comercial. Esta secuencia se escogió debido a que reunía dos importantes requisitos: 1) El código de barras ideal debía presentar regiones de unión a cebadores muy conservadas y así, podría usarse la misma pareja de cebadores en un amplio rango de organismos, es decir, como cebadores universales. 2) La elevada tasa de sustitución de bases hace que la tasa de evolución de esta secuencia sea lo suficientemente rápida (hasta tres veces mayor que otras secuencias como 12S o 16S) como para permitir la discriminación no solo de

especies estrechamente relacionadas, sino también entre morfotipos una misma especie (Hebert, *et al.*, 2003).

Actualmente se están llevando a cabo campañas internacionales de barcoding, como la FISH-BOL (Fish Barcode of Life) que trata de elaborar una librería con las secuencias COI de todas las especies de peces (Ward *et al.*, 2009). Estas secuencias se almacenan en la base de datos BOLD (the Barcode of Life Data System) (FISH-BOL, www.fishbol.org). Sin embargo, esta técnica tiene sus limitaciones, ya que se ha calculado que la proporción de especies que no pueden ser identificadas por este marcador es de un 6,4% en pájaros y 2,1-2,5% para peces (Ward, 2009). Por tanto, es conveniente la integración tanto de las técnicas de genética más avanzadas como los estudios morfológicos tradicionales para la identificación precisa de las especies (White y Last, 2012).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo principal

Verificar la consistencia de los dentículos dérmicos como criterio discriminante para la identificación de especies del género *Deania*. Asimismo, validar la utilización conjunta del estudio de la morfología y las técnicas moleculares para identificar y caracterizar la especie *Deania calcea*.

3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar morfométricamente la especie *Deania calcea* y comparar las medidas con su congénere, *Deania profundorum*.
- Estudiar la composición de la dieta de la especie *Deania calcea*.
- Analizar las dimensiones y la estructura de los dentículos dérmicos a lo largo de la especie.
- Identificar molecularmente la especie *Deania calcea* usando el gen de ADN mitocondrial COI mediante el Barcoding.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Área de estudio

Los muestreos se han realizado en dos zonas localizadas en la plataforma continental del Mar Cantábrico que representan ecosistemas profundos aunque de diferente naturaleza: un sistema de cañones submarinos conocido como el *Cañón de Avilés* y una plataforma marginal conocida comúnmente como *El Cachucho* (**Figura 2**).

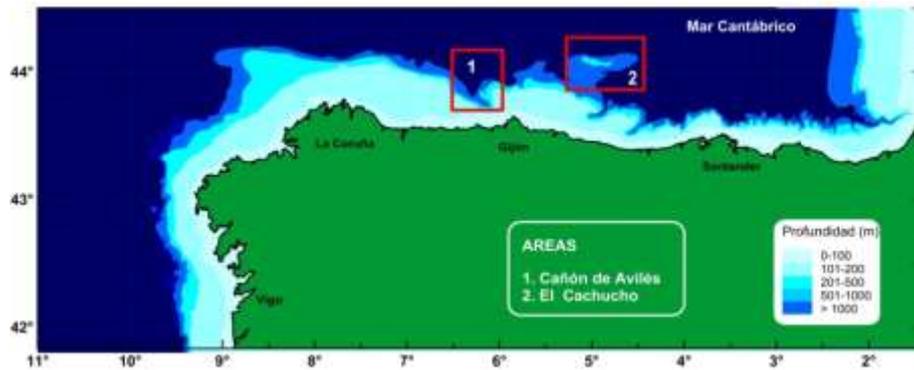


Figura 2: Localización de las áreas de muestreo (1) Cañón de Avilés y (2) El Cachucho en el Norte de la Península Ibérica, España.

El Sistema de cañones submarinos de Avilés se ubica en el margen continental del Norte de la Península Ibérica a 7 millas de la costa occidental de Asturias, en posición 6°W. Es una zona estructuralmente compleja y se divide en tres grandes cañones (Avilés, El Corbiro y La Gabiera), una plataforma marginal (Canto nuevo) y un alto estructural rocoso masivo (Agudo de Fuera). La cabecera del Cañón de Avilés se localiza a una profundidad de 140 m sobre la plataforma y desemboca sobre los 4750 m en la llanura abisal del Golfo de Vizcaya (Sánchez, *et al.*, 2014).

El *Cachucho* (Banco Le Danois) es una plataforma marginal situada a 65 km de la costa asturiana, frente a la localidad de Ribadesella. Esta se eleva desde los más de 4000 m desde la llanura abisal del Golfo de Vizcaya hasta alcanzar la cumbre a los 500 m bajo el nivel del mar. Sus fondos presentan una estructura rocosa, en el techo del banco, lo que permite el asentamiento de organismos fijos al fondo como corales, esponjas y gorgonias que determinan un hábitat complejo muy favorable como refugio para multitud de especies, entre ellas elasmobranquios de profundidad. Estudios llevados a cabo en el Cachucho han confirmado la presencia de adultos reproductores de varias especies de interés comercial como la locha, el lirio, la cabra de altura y el cabracho de profundidad, lo que hizo que estuviese sujeta a una fuerte presión pesquera en el pasado. En el año 2008, debido a su elevada riqueza y biodiversidad, fue declarada como la primera Área Marina Protegida (AMP) fuera de costa de España e integrada en

la Red Natura 2000 como Zona de Especial Conservación (ZEC). Más información sobre las características del AMP de “El Cachucho” puede encontrarse en Sánchez *et al.* (2008).

4.2. Muestreo

Los tiburones de profundidad fueron recogidos en diferentes campañas multidisciplinarias a lo largo de los años 2010-2015 dentro del marco de los proyectos ECOMARG, INDEMARES y DEEPCON (**Tabla 1**). Se emplearon dos tipos diferentes de arte de pesca: Arrastre y palangre. El sistema de arrastre usado es de tipo *baca* 44/60, suficientemente descrito en informes y publicaciones anteriores (Sánchez, 1993; Sánchez *et al.*, 1993; Sánchez *et al.*, 2002) con una luz de malla en la red de 60 mm y 20 mm en el copo. Este sistema es eficaz para la captura de especies demersales y poco nadadoras, ya que su diseño tiene la capacidad de pegarse al fondo. Por el contrario, las debilidades de este sistema es que es bastante sensible a los sustratos duros, debido a su facilidad para engancharse pudiendo llegar a romperse o incluso perderse (De la Cueva, 1978). Por otra parte, el palangre de fondo consiste en una serie de anzuelos con cebo que provienen de una línea madre lastrada, que se sitúa cerca del fondo marino. El número medio de anzuelos calados en cada uno de los lances fue de 1000, y la profundidad de pesca varió entre los 900 y 1200 metros. El cebo principal empleado fue caballa (*Scomber scombrus*) aunque ocasionalmente se usó boga (*Boops boops*). Cada uno de los ejemplares recogidos fue debidamente registrado con un código y congelado a -20 °C para su posterior análisis en el laboratorio.

Tabla 1: Características de los lances (arrastre y palangre) efectuados en las campañas de procedencia de los ejemplares.

Campaña	Área	COD Área	Fecha	Arte	CÓDIGO LANCE	Latitud	Longitud	Profundidad media (m)	Nº <i>D. calcea</i> muestreados
2011	CACHUCHO	BLD	23/07/2011	Palangre	L2	44°00.012' N	4°40.208' W	1098	5
2012	CACHUCHO	BLD	10/12/2012	Palangre	L3	43°55.936' N	4°52.532' W	1024	1
2013	CACHUCHO	BLD	13/06/2013	Palangre	L1	44°00.007' N	4°40.266' W	1100	2
			01/07/2013		L2	44°03.893' N	4°31.241' W	988	1
			20/09/2013		L3	43°56.705' N	4°48.917' W	1100	2
2014	CACHUCHO	BLD	01/06/2014	Palangre	L1	44°00.509' N	4°46.894' W	1150	2
2015	CACHUCHO	BLD	08/07/2015	Palangre	L1	44°00.380' N	4°37.400' W	1150	4
2015	CACHUCHO	BLD	13/10/2015	Arrastre	G100	43°55.530' N	5°05.880' W	815	2
2010	CAÑÓN AVILÉS	CA	22/07/2010	Arrastre	G4	43°55.240' N	6°13.790' W	995	8
			27/07/2010		G9	43°55.770' N	5°53.930' W	1030	6
2012	CAÑÓN AVILÉS	CA	06/06/2012	Palangre	L3	43°54.032' N	6°08.709' W	1000	3

4.3. Muestreo biológico

4.3.1. Medidas morfométricas

Antes del muestreo, los tiburones se descongelaron completamente en el refrigerador durante la noche a 4°C. Una vez en el laboratorio, se extrajo una muestra de músculo y se preservó en etanol al 99% 4°C para su posterior análisis genético, además de determinar la talla, el peso y el sexo de los individuos mediante la presencia/ausencia de pterigópodos. Se tomaron un total de 43 medidas morfométricas abarcando todas las zonas del cuerpo (cabeza, tronco y cola) incluyendo las medidas de cada una de las aletas (aleta pectoral, 1ª aleta dorsal, 2ª aleta dorsal, aleta pélvica, y aleta caudal). (ANEXO 2). En el caso de estructuras pares (aleta pectoral, pélvica, ojos) sólo se tomaron medidas del lado izquierdo del pez. En general, estas se tomaron en referencia a las detalladas por Compagno (1984), excepto algunas medidas que se adaptaron para esta propia especie con el fin de evitar ambigüedades. Por ejemplo, consideramos que en las medidas que conciernen a la 1ª y 2ª aleta dorsal es más preciso tomar la medida desde la espina, debido a la dificultad de distinguir el punto de origen de las aletas. Las medidas más pequeñas (< 30 cm) fueron tomadas con un calibre con una precisión de 0,02 mm mientras que las más grandes (> 30 cm) fueron tomadas con ayuda de una cinta métrica.

Para determinar el estado de madurez, se examinó el grado de desarrollo y calcificación de los pterigópodos además de los órganos sexuales internos de cada individuo. La fase de madurez se estableció de acuerdo a la escala de madurez propuesta por el grupo de trabajo de madurez sexual de elasmobranquios WKMSSEL2 (ICES, 2012) para elasmobranquios vivíparos. En el caso de existir hembras fecundadas, también se contó el número de óvulos fecundados o embriones en el útero.

4.3.2. Análisis del contenido estomacal

En cuanto al análisis del contenido estomacal, se procedió a realizar la disección mediante corte transversal y la evisceración de cada uno de los individuos. Cada uno de los estómagos fue extraído y pesado en una báscula digital, y tras su apertura, las presas obtenidas se clasificaron con ayuda de la lupa binocular en función de su grado de digestión atendiendo a la escala propuesta por Olson y Galván-Magaña (2002). Según esta, se asignaron valores desde el grado 1 (prácticamente intacto) hasta el grado 4 (sólo permanecen partes duras como otolitos o mandíbulas de cefalópodos). Si el estado de la

presa lo permitía, se midió la longitud máxima de la presa en mm. Cuando la presa presentaba un grado de digestión elevado, se procedió a su identificación mediante la presencia de otolitos con ayuda de las claves de Campana (2004) y Tuset *et al.* (2008) y con la base de datos de otolitos AFORO (Shape Analysis of Fish Otoliths creada por Lombarte *et al.* (2006) cuya página electrónica es: <http://isis.cmima.csic.es/aforo/> tratando de aproximar la identificación al mínimo taxón posible.

Para conocer la importancia de cada taxón presa, se han utilizado los índices de porcentaje en frecuencia, número y volumen. La composición de la dieta se puede analizar a través de diferentes parámetros. Bowen (1983) y Hyslop (1980) clasifican los estudios cuantitativos de la alimentación en aquellos que emplean datos de frecuencia, numéricos y volumétricos o gravimétricos.

Frecuencia: se emplea el número de estómagos en que aparece una presa (porcentaje en frecuencia, % F).

$$\% F = (\text{n}^\circ \text{ estómagos con presa } i) / (\text{n}^\circ \text{ estómagos llenos}) \times 100$$

Numéricos: se basan en el número de individuos presa que aparecen en los estómagos. El más utilizado es el porcentaje en número (% N).

$$\% N = (\text{n}^\circ \text{ total presa } i) / (\text{n}^\circ \text{ total presas}) \times 100$$

Volumétricos o gravimétricos: se basan en la medida del volumen ó peso del contenido estomacal de cada una de las presas.

$$\% W = (\text{Peso total presa } i) / (\text{Peso total presas}) \times 100$$

Asimismo, existen otros índices, como el IRI (Índice de importancia relativa), que engloban los tres índices anteriores: $IRI = (N+W) \times F$

4.3.3. Dentículos dérmicos

Se tomaron tres muestras de piel de alrededor de 1-2 cm² con ayuda de un bisturí de diferentes zonas: Anterior, dorsal y caudal (**Figura 3A**). Estas se limpiaron previamente con agua para eliminar restos de sedimento u otras partículas y se colocaron sobre papel de filtro para retirar el exceso de agua y posteriormente, cada una de estas muestras se visualizó y fotografió en un estereomicroscopio Nikon SMZ1500 a un aumento de 8x. Para poder medir los dentículos se utilizó el software de análisis de

imagen NIS-Elements. En total, se tomó la medida (**Figura 3B**) (en μm) tanto de la longitud de la corona (CL) como de la anchura (CW) de 10 dentículos (descartando aquellos que estuviesen rotos) de cada una de las zonas.

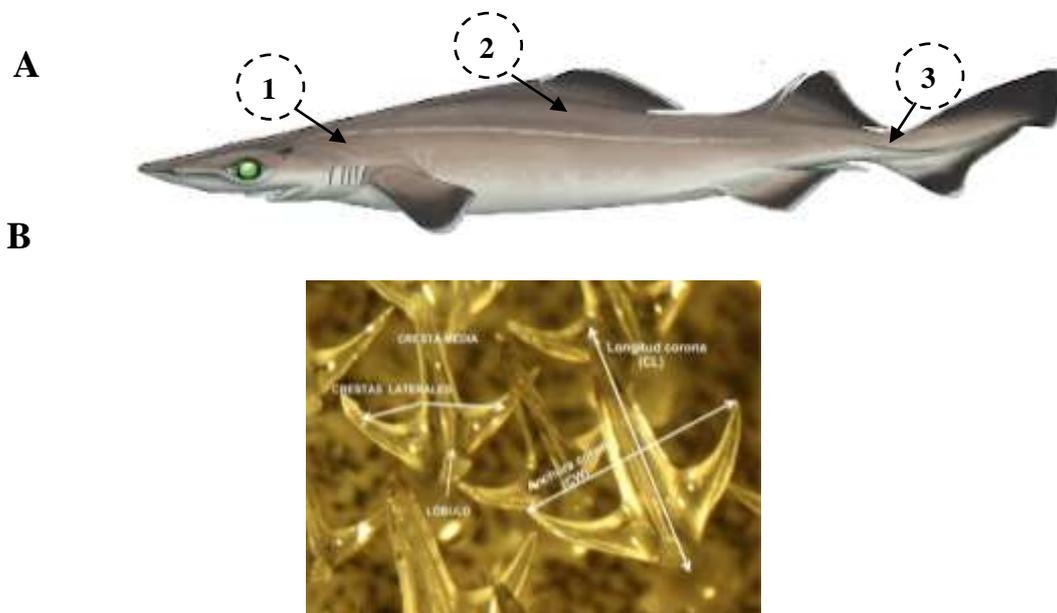


Figura 3:A) Localización de las muestras de piel tomadas de *D. calcea*. (1) Zona anterior (2) Zona dorsal y (3) Zona caudal. B) Descripción de las partes y medidas de un dentículo dérmico

4.4. Barcoding: Extracción de ADN, amplificación y secuenciación.

En total se extrajo el ADN genómico de 33 individuos de 3 especies diferentes: *Deania calcea* (30 secuencias), *Deania profundorum* (2 secuencias) y *Centrophorus squamosus* (1 secuencia). Para la extracción del ADN se utilizó un kit comercial NZY Tissue gDNA Isolation™ MB13503 (Nzytech Lda., Campus do Lumiar, Lisboa, Portugal) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para la amplificación por PCR y secuenciación del fragmento del gen COI se utilizó la pareja de cebadores FishF2-5'TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC3'/FishR25'ACTTCAGGGTGACCGAA GAATCAGAA3'descrita por Ward *et al.*, (2005).

La mezcla de reacción contenía: 1 μl de ADN genómico, tampón de reacción 1X (Bioline), 10 pmol de cada primer, 10 mM de dNTPs (Nzytech), 1,5 mM de MgCl_2 (Bioline) y 1U BioTaq DNA Polymerase (Bioline), en un volumen final de 20 μl . Las amplificaciones se realizaron dentro de un termociclador SureCycler 8800 (Agilent Technologies., Santa Clara, CA, USA). La reacción de PCR consistió en un paso de desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, 35 ciclos compuestos por una fase de desnaturalización a 95°C durante 45 s, una fase de anillamiento 1 min a 55 °C y una fase

de extensión 1 min a 72°C y una fase de extensión final a 72°C durante 10 min (**Figura 4**). Los productos de PCR se separaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2 % con Bromuro de Etidio a 80V durante 30 minutos. Los geles fueron visualizados mediante un transiluminador UV Vilber Lourmat (Vilber., Marne La Vallée, Francia) (**Figura 5**). Para purificar los productos de PCR obtenidos (eliminar los cebadores y degradar los nucleótidos sobrantes) se usó una mezcla de dos enzimas: 10 U de Exonucleasa I (Thermo Scientific) y 1 U de Fosfatasa alcalina (Thermo Scientific FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase) siguiendo el protocolo del fabricante.



Figura 4: (A) Preparación de los componentes de la PCR, (B) Elaboración del gel de agarosa 2%, (C) PCR en el termociclador y (D) Electroforesis y visualización del gel en el transiluminador.

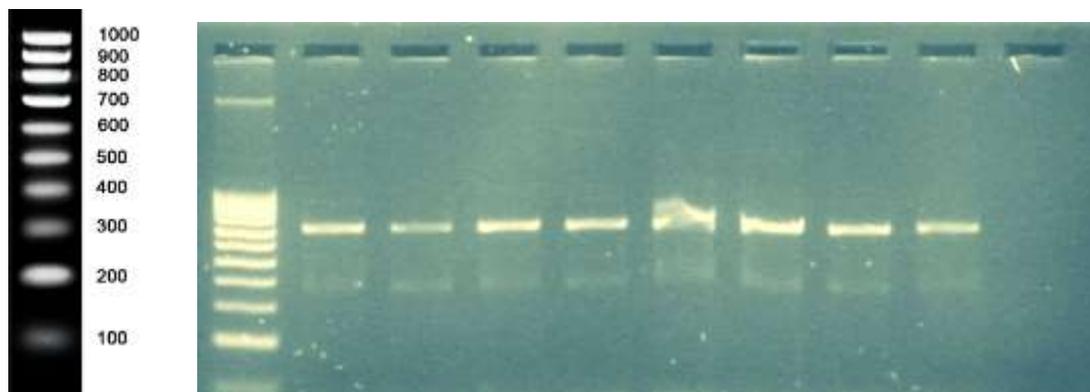


Figura 5: Gel de agarosa al 2% con los productos de PCR. 1-Ladder V (NZYDNA), 2-DCA1, 3-DCA2, 4-DCA3, 5-DCA4, 6-DCA5, 7-DCA6, 8-Control negativo.

Los fragmentos de PCR purificados se enviaron a secuenciar al CACTI (Universidad de Vigo, España) con el mismo par de cebadores usados para la amplificación por PCR. La secuenciación se realizó en un secuenciador automático capilar ABI Prism 3100 usando el kit de secuenciación BigDye Terminator Cycle (Applied Biosystems™).

Todas las secuencias COI obtenidas fueron alineadas y editadas con las secuencias disponibles de *Deania* spp. en la base de datos BOLD usando el software Bioedit versión 7.0.5 (Hall, 1999). El análisis involucró 28 secuencias de nucleótidos con un total de 468 posiciones en el conjunto de datos final. Todas las posiciones que contenían gaps fueron eliminadas. Los análisis evolutivos fueron llevados a cabo en MEGA7 (Kumar *et al.*, 2015). El modelo de evolución seleccionado según el criterio BIC (Bayesian Information Criterion) fue Tamura 3-parámetros (Tamura, 1992). El árbol filogenético se construyó con el método de Máxima Verosimilitud. Además, las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos del GenBank utilizando el programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local BLAST (Zhang *et al.*, 2000).

4.5. Análisis estadístico

La normalidad de las variables de “talla” y “longitud de los dentículos” se comprobó mediante un test de Saphiro-Wilk. Al no cumplirse los supuestos de normalidad y homocedasticidad, se procedió a realizar test no paramétricos. Para comprobar si la variable continua “longitud de los dentículos” dependía de la variable “talla” se calculó el coeficiente de correlación de Spearman. Por otro lado, para averiguar si existían diferencias en las medianas de la variable “longitud de los dentículos” en función del sexo, se realizó un test de Wilcoxon. Por último, para comprobar si existían diferencias en la longitud de los dentículos según la zona del cuerpo, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis. El software utilizado para realizar los análisis estadísticos ha sido R 3.4.3 (R Core Team, 2017). Para la elaboración de los gráficos se ha usado el paquete ggplot2 (Wickham, 2009).

Los análisis multivariantes se han llevado a cabo utilizando el programa PRIMER 5 (Clarke y Gorley, 2001). Para ello se construyó una matriz con los datos morfométricos obtenidos de los 32 ejemplares muestreados de *D. calcea* expresando los valores como porcentaje de la longitud total de cada ejemplar (TL) para evitar el efecto

de la talla en la comparación de las medidas. Las variables del sexo (1=Machos y 2= Hembras) y madurez sexual (1=Inmaduros y 2=Maduros) se han incorporado como factores. Esta matriz de datos se utilizó para crear la matriz de similitud usando el algoritmo de Bray-Curtis. El análisis de ordenación múltiple (MDS) se empleó para visualizar en dos dimensiones las posibles diferencias entre los factores antes mencionados (sexo y madurez sexual). El análisis estadístico de similitud (ANOSIM) se utilizó para evaluar si las diferencias observadas en los gráficos eran significativas o no. Este test estadístico comprueba si se cumple la hipótesis nula de que no existen diferencias entre grupos. En el caso de que se encuentren diferencias, se ha realizado un análisis SIMPER (porcentaje de similitud) para intentar determinar el porcentaje de contribución de cada carácter morfológico al resto de medidas. Se han seleccionado los caracteres morfológicos más importantes entendiendo como estos aquellos que contribuyen hasta un 50 % en las diferencias acumulativas.

5. RESULTADOS

5.1. Medidas morfométricas

Se muestrearon un total de 32 ejemplares de *D. calcea* (20 machos y 12 hembras) y 13 ejemplares *D. profundorum*, 6 machos y 7 hembras respectivamente. De las 43 medidas tomadas inicialmente, se escogieron para realizar el análisis 35 (**Tabla 2**) para simplificar la matriz de datos.

Tabla 2: Caracterización morfométrica (Media + rango) de machos y hembras de *Deania calcea* y *Deania profundorum*. Todos los valores se presentan como un porcentaje de la longitud total (TL), excepto TL que se da en cm.

Medidas morfométricas	<i>Deania calcea</i>		<i>Deania profundorum</i>	
	Machos	Hembras	Machos	Hembras
	N=20	N=12	N=6	N=7
TL	81,0 (88,0-63,0)	88,7 (107,0-65,0)	52,2 (68,1-39,0)	62,8 (86,4-28,0)
FL	88,9 (90,3-87,9)	89,7 (92,5-87,9)	88,2 (91,3-85,4)	87,0 (90,0-81,2)
PCL	80,9 (83,3-78,4)	81,5 (83,2-78,3)	80,8 (83,7-79,3)	79,3 (82,9-74,0)
PD2	64,4 (66,1-61,7)	65,5 (68,7-63,0)	66,7 (69,8-63,4)	66,5 (69,5-62,3)
IDS	13,9 (15,3-12,2)	14,1 (16,6-11,6)	19,7 (22,6-16,3)	19,2 (22,1-14,8)
IDto2D	11,8 (14,1-8,5)	11,7 (13,6-10,0)	14,4 (16,2-11,5)	13,4 (16,4-11,1)
PD1	27,5 (36,4-24,1)	28,2 (33,1-25,2)	34,6 (38,9-32,4)	38,1 (43,2-28,2)
PP2	62,8 (64,8-59,4)	63,6 (65,3-62,3)	60,0 (63,0-58,0)	59,7 (63,7-55,0)
HDL	24,2 (27,1-22,8)	24,8 (27,3-23,0)	25,2 (26,6-22,6)	24,8 (29,3-21,4)
PG1	20,3 (22,2-19,3)	20,9 (23,5-19,3)	21,5 (23,2-18,8)	20,9 (23,8-18,3)
POB	12,8 (15,1-11,6)	13,6 (15,4-11,9)	14,3 (15,9-12,2)	13,9 (15,7-12,2)
POR	9,5 (11,4-8,2)	10,3 (11,4-8,8)	10,1 (11,5-8,7)	10,1 (11,4-8,9)
PRN	4,7 (5,4-4,1)	5,1 (5,6-4,6)	5,1 (5,9-4,4)	4,8 (5,9-4,1)
EYL	5,2 (5,6-4,4)	5,0 (5,6-4,2)	5,6 (6,4-5,0)	5,0 (6,5-4,3)

INO	4,2 (4,9-3,6)	4,4 (4,9-4,0)	5,0 (5,1-4,6)	4,8 (5,2-4,4)
ENS	7,1 (8,1-6,3)	7,5 (8,3-6,9)	8,1 (8,5-7,2)	8,8 (10-7,3)
INW	3,9 (11,1-3,2)	3,9 (4,3-3,5)	3,9 (4,4-3,5)	4,1 (4,6-3,7)
MOW	6,9 (9,2-4,0)	7,0 (7,4-6,4)	7,3 (7,8-6,6)	7,0 (7,4-6,3)
P1L	11,6 (13,3-10,1)	11,5 (12,5-10,5)	13,2 (14,9-11,9)	12,9 (14,3-11,3)
P1B	3,5 (4,0-3,0)	3,4 (3,8-2,5)	4,9 (5,9-3,8)	5,2 (6,3-3,4)
P1H	6,6 (7,9-5,7)	6,3 (6,7-5,7)	8,3 (8,8-7,9)	7,7 (8,4-7,1)
D1L	31,5 (34,9-24,9)	31,7 (35,2-26,8)	19,9 (24,6-14,6)	15,9 (17,0-13,2)
D1B	24,5 (27,5-20,1)	24,1 (27,6-20,7)	12,9 (17,8-8,7)	11,3 (19,5-8,6)
D1H	4,3 (4,9-3,6)	4,2 (4,8-3,6)	5,4 (6,1-4,6)	5,4 (6,7-3,5)
D2L	18,1 (19,6-16,2)	18,3 (24,5-16,4)	14,9 (16,8-13,2)	13,9 (16,6-11,4)
D2B	13,5 (15,5-11,1)	13,1 (14,8-11,8)	10,5 (11,5-9,6)	10,6 (11,7-9,8)
D2H	6,1 (6,7-5,1)	6,3 (7,4-5,6)	6,6 (6,8-6,3)	6,5 (7,2-5,9)
P2L	10,7 (13,0-6,6)	10,4 (12,1-9,6)	10,6 (11,9-9,3)	10,3 (11,3-8,9)
P2B	2,8 (4,2-2,0)	2,7 (3,3-2,3)	3,8 (5,4-2,3)	4,5 (6,0-2,8)
P2H	4,5 (5,2-3,6)	4,5 (5,0-4,0)	5,1 (6,8-4,1)	4,9 (6,4-3,7)
CDM	18,8 (20,4-17,0)	18,2 (20,3-16,2)	19,7 (21,5-17,8)	19,0 (22,5-17,0)
CPV	10,4 (12,3-9,0)	10,5 (11,2-9,5)	10,8 (12,4-9,6)	11,0 (11,7-10,3)
CPU	7,2 (8,9-5,3)	6,8 (8,1-4,5)	8,2 (11,7-6,8)	7,4 (14,3-4,8)
CFL	10,7 (12,1-9,1)	11,0 (12,2-9,7)	10,4 (12,2-7,5)	11,0 (13,3-9,8)
CPH	3,3 (3,4-3,0)	3,3 (3,5-3,0)	3,4 (3,5-3,1)	3,5 (3,8-3,1)

El análisis de ordenación MDS basado en los caracteres morfológicos de los ejemplares de *D. calcea* teniendo en cuenta el sexo no muestran diferencias significativas entre machos y hembras (**Figura 6A**).

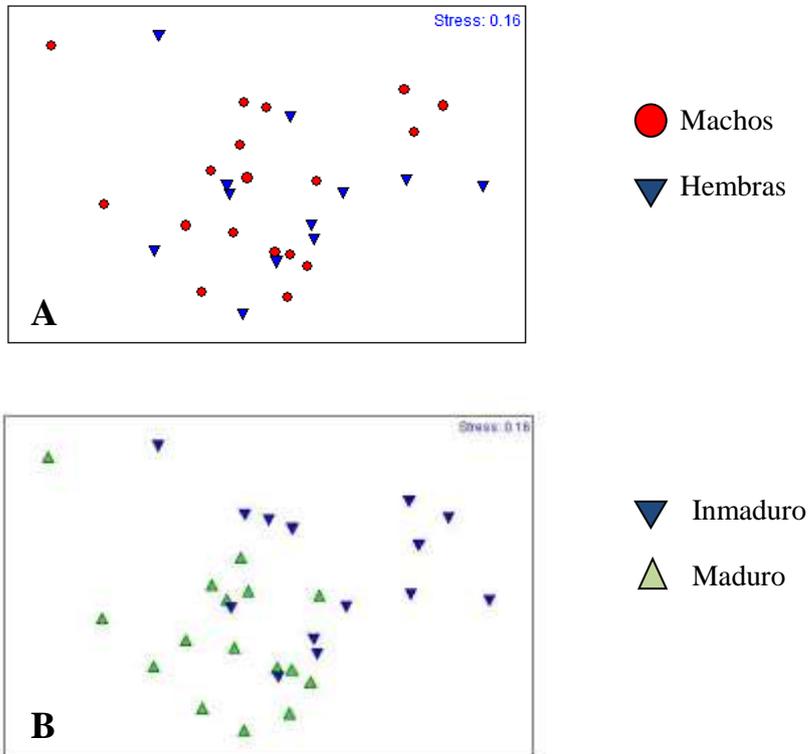


Figura 6: Análisis de ordenación multidimensional (MDS) basado en el índice de similitud Bray–Curtis según (A) sexo y (B) madurez sexual. El valor del stress se refiere al error que se crea cuando se representan los datos en dos dimensiones.

Estadísticamente, el análisis visual se comprobó con el test ANOSIM ya que no se detectan diferencias significativas entre sexos: ANOSIM $R=0.098$; p -valor= 0.231 . Dado que las diferencias sexuales a veces no se manifiestan hasta que los individuos alcanzan la madurez sexual se ha realizado el mismo análisis teniendo en cuenta también el factor madurez sexual (**Figura 6B**). Los resultados del test indican que existe cierta relación entre la madurez sexual y los caracteres morfológicos si bien esta relación no es altamente significativa: ANOSIM $R = 0.398$, p -valor = 0.005 .

El análisis jerárquico identificó claramente dos grupos que se corresponden con cada una de las dos especies muestreadas *D. calcea* (DCA) y *D. profundorum* (DPR). El porcentaje de disimilitud entre ambas es un 7% (**Figura 7**). El análisis MSD también produce resultados similares identificando claramente dos grupos (**Figura 8**) ANOSIM $R: 0.938$, p -valor = 0.001 .

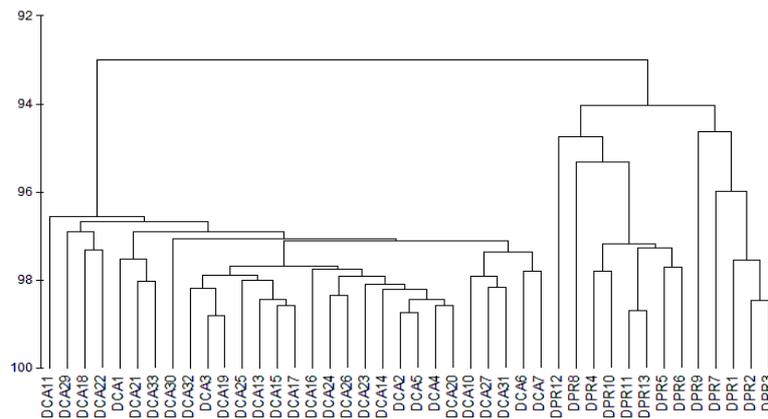


Figura 7: Dendrograma ó Cluster de similitud entre ambas especies del Genero Deania obtenido a partir de los caracteres morfométricas. *Deania calcea* (DCA) y *Deania profundorum* (DPR).

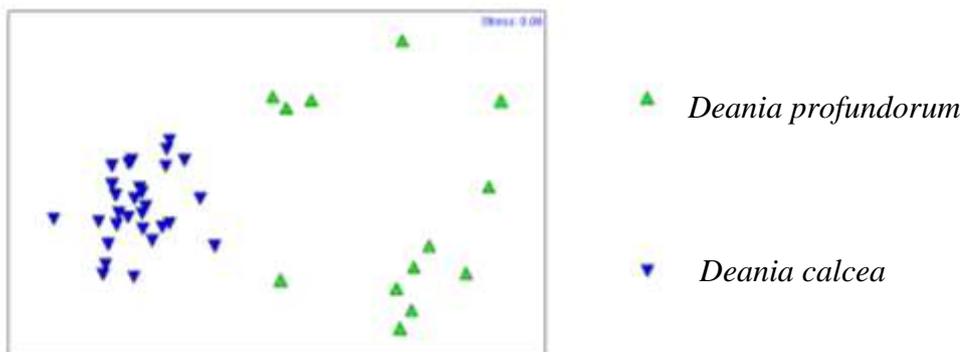


Figura 8: Análisis de ordenación multidimensional (MDS) basado en el índice de similitud de Bray-Curtis.

El análisis realizado con SIMPER muestra los caracteres morfométricos que más contribuyen a esta divergencia (**Tabla 3**). Entre estas diferencias las que más contribuyen con cerca del 50 % son: el tamaño de la primera aleta dorsal tanto la longitud total (D1L=15.6 %) como la de la base (D1B=13.7 %), la distancia del morro a la 1ª aleta dorsal (PD1=10.1 %), la distancia o espacio entre las aletas dorsales (IDS=6.13) y la longitud de la 2ª aleta dorsal (D2L=4.3 %).

Tabla 3: Índice de disimilitud (7.01 %) entre las dos *Deanias* y los caracteres morfométricos que más contribuyen a estas diferencias. Los resultados se expresan en porcentaje de la longitud total (TL) de cada ejemplar.

Carácter morfométrico	Promedio valor (cm)		Promedio Disimilitud	Disimilitud/SD	Porcentaje	
	<i>D. prof</i>	<i>D. calcea</i>			Contribución	Cumulativo
D1L	17,70	31,61	1,09	3,37	15,6	15,6
D1B	12,06	24,33	0,97	3,06	13,77	29,36
PD1	36,48	27,77	0,71	1,8	10,1	39,46
IDS	19,41	13,97	0,43	2,19	6,13	45,59
D2L	14,33	18,15	0,3	1,71	4,3	49,89
PP2	59,84	63,1	0,28	1,47	4,02	53,91
PD2	66,59	64,81	0,24	1,5	3,37	57,28
D2B	10,57	13,35	0,22	2,41	3,12	60,41
1Dto2D	13,83	11,76	0,19	1,52	2,7	63,1
FL	87,56	89,18	0,19	1,06	2,66	65,76
PCL	79,96	81,14	0,18	1,14	2,64	68,4
HDL	24,98	24,41	0,16	1,37	2,35	70,75
CPU	7,76	7,07	0,16	1	2,26	73,01
CDM	19,34	18,61	0,14	1,35	2,05	75,06
PGI	21,17	20,57	0,14	1,43	2,02	77,08
P1L	13,05	11,55	0,14	1,51	1,86	78,93
P1B	5,08	3,48	0,13	1,71	1,83	80,76
P2B	4,19	2,75	0,13	1,44	1,82	82,58
POB	14,07	13,12	0,13	1,42	1,79	84,38
P1H	8,01	6,5	0,12	2,37	1,71	86,09
ENS	8,49	7,24	0,1	1,62	1,48	87,57
CFL	10,72	10,84	0,1	1,23	1,39	88,95
D1H	5,36	4,24	0,1	1,9	1,38	90,33

5.2. Análisis contenido estomacal

Se han analizado un total de 34 contenidos estomacales, de los cuales 18 contenían alimento siendo el porcentaje de vacuidad del 47 %. Los peces dominan la dieta tanto en número (84,0 %) como en peso (96,3 %). Entre los peces destacan los Mictófidios (27,8 %) entre los cuales también se incluye la especie *Myctophum punctatum*. El resto de peces no se ha podido identificar con total seguridad ya que algunos otolitos están algo deteriorados por esta razón se ha considerado más conveniente clasificarlos como indeterminados. En el **ANEXO 3** se muestran algunas imágenes de los otolitos encontrados. Entre las especies posibles que no se han podido

confirmar figuran los mictófidios: *Lampanyctus spp.*, *Diaphus spp.*, *Chaulodius sloani* y otras especies como: *Notacanthus spp.*, *Stomias boa*, *Microchirus variegatus*, *Melagnotima atlanticum*.

Tabla 4: Composición de la dieta de *Deania calcea* en las zonas de estudio. Se muestran los datos en porcentaje de frecuencia (% F), porcentaje en número (% N), porcentaje en peso (% W) y el índice IRI.

	% F	% N	% W	IRI
CRUSTACEOS	22,2	16	3,7	437,3
Decapoda	5,6	4	0,1	23
Natantia indeterminados	5,6	4	0,1	23
Otros crustáceos	16,7	12	3,6	259,1
Crustacea indeterminados	16,7	12	3,6	259,1
PECES	88,9	84	96,3	16028,5
Stomiidae	5,6	8	4,2	67,8
Stomiatoidei indeterminados	5,6	8	4,2	67,8
Myctophidae	5,6	4	4,7	48,1
<i>Myctophum punctadum</i>	5,6	4	4,7	48,1
Myctophoidei indeterminados	27,8	20	34,2	1504,2
Otros peces indeterminados	61,1	52	53,3	6435,8

5.3. Dentículos dérmicos

Las fotografías (**Figura 9**) obtenidas en las tres zonas escogidas muestran claramente la variabilidad existente en el tamaño y la morfología del dentículo a lo largo del cuerpo del ejemplar. Además, se puede observar que la densidad de dentículos es diferente siendo más numerosos hacia la zona caudal.



Figura 9: Dentículos dérmicos de *Deania calcea* tomados a 8X en el estereomicroscopio Nikon SMZ1500 en diferentes zonas del cuerpo: Zona anterior, zona dorsal y zona caudal de izquierda a derecha (Macho TL: 88 cm).

Respecto al análisis estadístico, la correlación de Spearman mostró una relación moderada y positiva ($\rho=0.4386836$, $p\text{-valor}=2.2e^{-16}$) de las variables continuas “longitud de los dentículos” y “talla”. Para estos análisis solo se ha tenido en cuenta la longitud del dentículo, no la anchura. Esto significa que, existe una relación directamente proporcional entre ambas variables, y a medida que aumenta la longitud del ejemplar, aumenta la del dentículo dérmico (**Figura 10**).

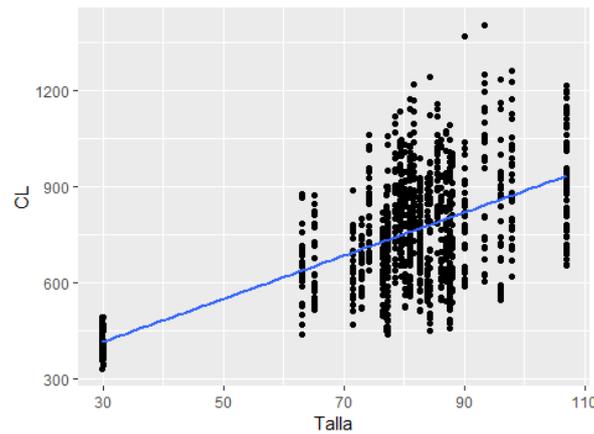


Figura 10: Diagrama de dispersión entre la longitud del ejemplar en cm (X) y la longitud el dentículo en μm (Y).

Tras realizar el test de Wilcoxon, podemos observar que existen diferencias significativas ($W = 98178$, $p\text{-valor} = 6,815e^{-08}$) en las medias del tamaño de los dentículos entre sexos, siendo mayores los de las hembras. La media de las hembras es de 794.76 y la de los machos 726.9 (**Figura 11**).

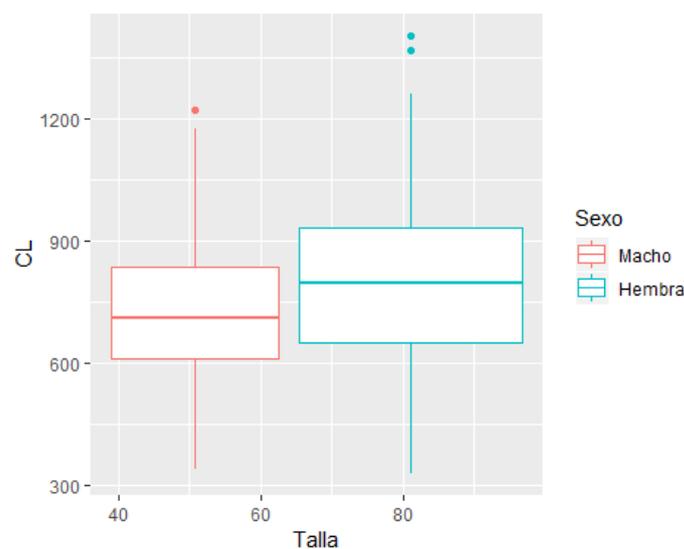


Figura 11: Longitud media de los dentículos dérmicos según el sexo. La línea central representa la mediana, en la caja se encuentran el 50% de los datos. Se puede observar que el tamaño de los dentículos de las hembras es de mayor magnitud que la de los machos.

Tras realizar el test de Kruskal-Wallis, se puede comprobar que existen diferencias significativas en el tamaño medio de los dentículos según la zona del ejemplar ($K= 314.85$, $df = 2$, $p\text{-valor} = 2.2e^{-16}$), siendo los más grandes los de la zona anterior (879.8) seguidos de la zona dorsal (760.0) y, por último, la zona caudal (630.0) (**Figura 12**).

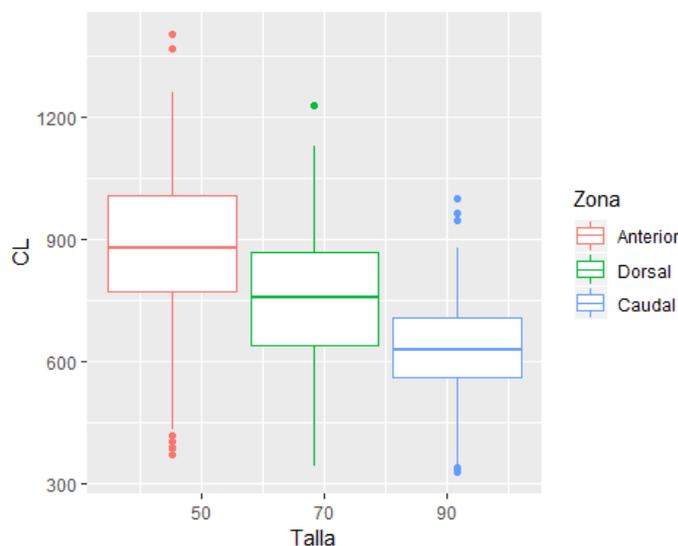


Figura 12: Longitud de los dentículos dérmicos según la ubicación en el cuerpo de la *Deania calcea*: Anterior, dorsal y caudal. La línea central representa la mediana, en la caja se encuentra el 50% de los datos. El tamaño medio de los dentículos disminuye hacia la zona caudal.

5.4. Barcoding de ADN

Las secuencias obtenidas de las 33 muestras extraídas al inicio del estudio resultaron imposibles de leer con fiabilidad por tener posiciones dobles, debido probablemente a una contaminación externa de bacterias. Debido a la falta de tiempo sólo se repitió la extracción de ADN con otras tres muestras de *Deania calcea*, pero finalmente, solo se incluyeron en el análisis dos de ellas, debido a que una de las secuencias estaba incompleta.

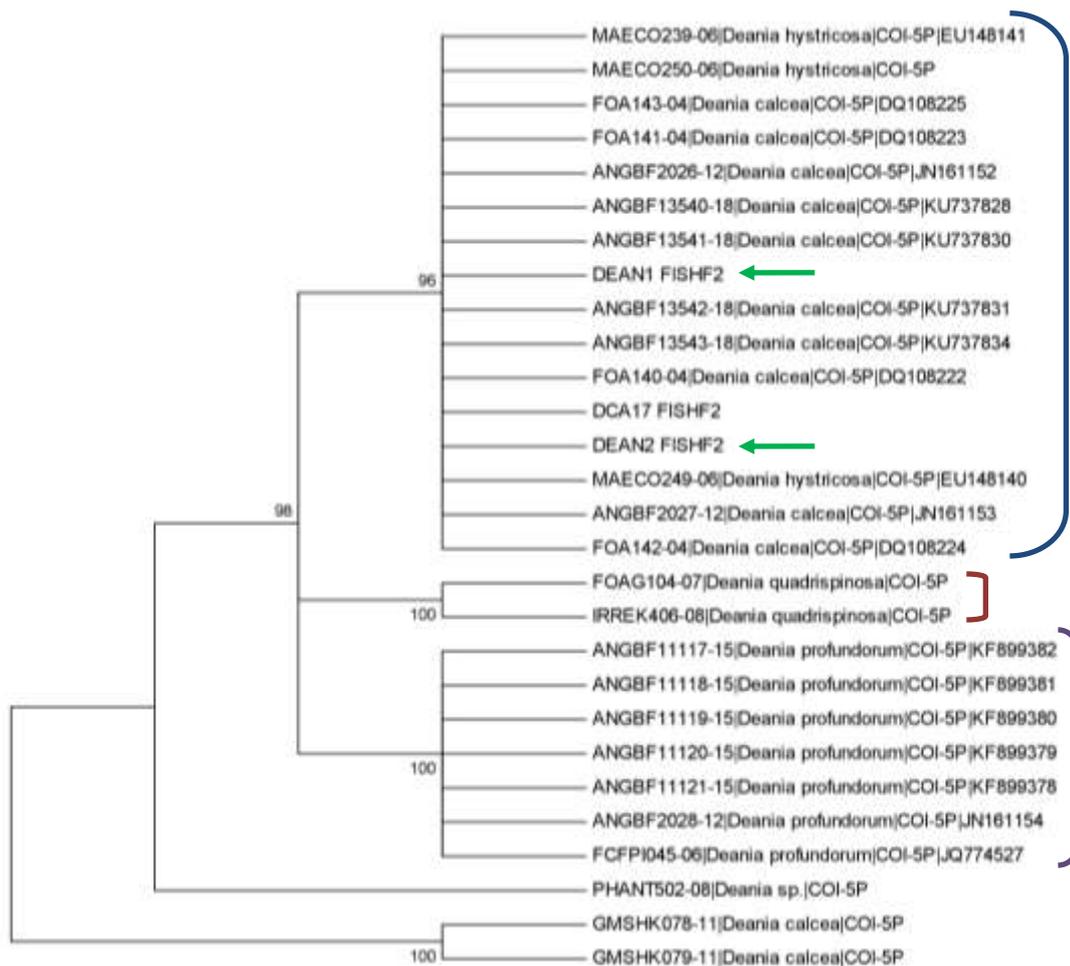


Figura 13: Árbol filogenético obtenido con las secuencias descargadas de BOLD y 2 secuencias COI obtenidas de *Deania calcea* obtenidas en este trabajo (DEAN1 y DEAN2).

El árbol filogenético (**Figura 13**) agrupó las secuencias de *Deania calcea* obtenidas (DEAN1 y DEAN2) junto las secuencias de *Deania hystricosa* y *Deania calcea* con un bootstrap del 96%. Todas las secuencias de *Deania profundorum* y *Deania quadrispinosa* fueron agrupadas con un bootstrap de 100%. Sin embargo, tres secuencias de *Deania calcea* quedaron fuera de estos agrupamientos. Al comprobar las secuencias y contrastarlas con las secuencias disponibles en el BLAST, coincidieron con un 99% con la secuencia COI obtenida de *Etmopterus bigelowi* por Straube *et al.*, (2010) y un 98% con la de *Centrophorus isodon* obtenida por Ward *et al.*, (2008).

6. DISCUSIÓN

6.1. Medidas morfométricas

Los resultados obtenidos en este estudio indican que los caracteres morfológicos que más contribuyen a las diferencias encontradas entre ambas *Deanias* están fundamentalmente relacionados con el tamaño de las aletas dorsales y en concordancia con las distancias desde el hocico al origen de las mismas. Resultados similares son descritos por Verissimo *et al.*, (2014) en especies congéneres de la familia Centrophoridae, (género *Centrophorus*). En su estudio los principales caracteres taxonómicos que describen para identificar esas especies se basan principalmente en diferencias encontradas en la altura, longitud y base de las aletas dorsales y pectorales, espacio inter-dorsal y distancias del hocico a la boca ó narinas.

Tras comparar las medidas morfométricas entre sexos no se observa que exista dimorfismo sexual en los caracteres morfológicos de *Deania calcea*. Aunque sí que se observa que existe un claro dimorfismo en la talla (las hembras alcanzan mayores tallas que los machos) y estado de madurez, ya que los machos alcanzan la madurez a una longitud menor que las hembras. Los valores de LT_{50} son de 720-807 mm para los machos y de 914 para las hembras (Rochowski, *et al.*, 2015), patrón que comparte con la mayoría de los escualoides (Yano y Tanaka, 1983).

Existen otras especies de tiburones que han demostrado presentar dimorfismo sexual en la cabeza, la boca y la dentadura, como es el caso de la pintarroja común, *Scyliorhinus canicula* (Ellis y Shackley, 1995), caracteres que no se han examinado con detalle en este estudio, por lo que sería interesante para futuras investigaciones. Por el contrario, otros autores no observan diferencias significativas entre ambos sexos en especies del genero *Etmopterus*, ni en *E. spinax* ni en *E. pusills* (Coelho y Erzini, 2008).

No obstante, para sacar unas conclusiones más robustas convendría ampliar el tamaño muestral ya que el número de hembras presentes en este estudio, así como la distribución de tallas era menor (N=12) que en el caso de los machos (N=21).

Los análisis morfológicos han conseguido discriminar adecuadamente a la especie *Deania calcea* de su congénere *Deania profundorum*. Clásicamente, esta última se diferencia de la primera por la presencia de una quilla subcaudal, el menor tamaño y un tamaño menor de los dentículos, pero en este trabajo, hemos observado además que

existe un mayor número de diferencias como una mayor distancia interdorsal y unas aletas dorsales de distinta proporción, por lo que podría ser relevante tener en cuenta estos caracteres en cuanto a su identificación por claves taxonómicas.

6.2. Dentículos dérmicos

Según los datos obtenidos, se puede confirmar que existe una relación directa y positiva entre el tamaño del ejemplar y el de sus dentículos dérmicos. Estos resultados van en concordancia con otros estudios llevados a cabo con anterioridad en otras especies de tiburones carcarínidos, en los que se observó que la longitud y la complejidad del dentículo variaba ontogénicamente, con el objetivo de reducir el arrastre para mejorar la hidrodinámica y la natación de los tiburones (Raschi y Musick, 1984). También se han detectado en el género *Heterodontus*, donde los dentículos de los ejemplares adultos son cada vez más grandes, debido al cambio de la preferencia de sustrato por hábitats más rocosos, en lugar del fondo fangoso preferido por los juveniles (Raschi y Tabit, 1992).

Por otro lado, nuestros datos no solo demuestran que los dentículos varían según el estado ontogénico, sino que también existen diferencias significativas en el tamaño y morfología del dentículo dependiendo de la ubicación en el cuerpo del tiburón. De manera que, aunque los dentículos mantienen la forma de tridente, los dentículos de la zona anterior de la cabeza son de mayor tamaño, presentando un pedúnculo más alto y el lóbulo de la corona más prominente (Ver figura 9), mientras que los dentículos de la zona caudal son de menor tamaño y la forma se simplifica, perdiendo prácticamente el pedúnculo que lo sostiene. Esto también se ha observado en los dentículos dérmicos de la *S. canicula*, donde si bien conservan la forma tridentada, al igual que en este caso, los dentículos en general tendían a reducirse progresivamente desde la zona de la cabeza hasta la aleta caudal, además de revelar un cambio en la relación de la longitud y el ancho de estos, mostrando un mayor alargamiento de los dentículos hacia la cabeza (Sullivan y Regan, 2011).

Al comparar la piel de los tiburones entre machos y hembras, se ha observado que existe una diferencia significativa en el tamaño de los dentículos, siendo los de las hembras de mayor magnitud. Este dimorfismo sexual, ya se ha descrito en el trabajo llevado a cabo por Crooks *et al.*, (2013), donde revelaron que la longitud, la anchura y la densidad de los dentículos eran más robustos en algunas zonas del tegumento de las

hembras (aleta pectoral, área posterior de la aleta pectoral y aleta caudal), sin embargo, no encontraron diferencias significativas en el resto de áreas examinadas (cabeza, piel dorsal y pedúnculo caudal) al contrario de lo que muestran nuestros resultados. Esto podría deberse a una respuesta de la conducta de apareamiento de los machos, debido a que durante el proceso de apareamiento, los tiburones machos pueden sujetar a las hembras con los dientes y les producen mordeduras bastante graves, por tanto, una mayor densidad de dentículos así como una piel gruesa, proporcionaría una mayor protección frente a estos ataques. Aunque existe poca bibliografía acerca del dimorfismo sexual de los dentículos dérmicos, sí que se ha reportado un dimorfismo sexual en el espesor de la piel en varias especies de tiburones como la tintorera, *Prionace glauca* (Pratt, 1979) y la raya atlántica *Dasyatis sabina* (Kaijura *et al.*, 2000), por lo que sería interesante un análisis de los dentículos para ver si existe el mismo patrón.

En definitiva, es posible hacer una separación de las especies a través de la morfología de sus dentículos dérmicos, aunque no es un criterio taxonómico de fuerza a la hora de discriminar entre especies muy similares debido a la gran variabilidad existente entre dentículos de diferentes estados ontogénicos juvenil/adulto, y diferentes sexos macho/hembra de la misma especie, por lo que se trata de un buen complemento a la hora de identificar especies de tiburones siempre y cuando se contraste con otros estudios de otra naturaleza como la morfología y el análisis molecular (Rodrigues, 2009).

6.3. Análisis del contenido estomacal

En cuanto a los resultados recogidos en los análisis de los contenidos estomacales, se puede intuir que la *Deania calcea* presenta una dieta en su mayoría ictiófaga, complementada con crustáceos y posiblemente cefalópodos (aunque no se ha encontrado ningún resto orgánico en el presente trabajo) (Mauchline y Gordon, 1983). Se han encontrado resultados similares en otros trabajos realizados por otros autores tanto en esta zona de estudio (Preciado *et al.*, 2009) como en otras zonas como Namibia (MacPherson y Roel, 1987; Yano, 1991) o Tasmania (Blaber y Bulman, 1987).

El porcentaje de vacuidad es relativamente alto al igual que ocurre con otros tiburones de fondo y también se ha descrito en esta especie, hasta un 69% (Mauchline y Gordon, 1983). Valores similares se obtuvieron en los trabajos de Yano (1991) y

Pethybridge *et al.* (2011) donde el porcentaje de vacuidad alcanzó un valor de 53 % y 61,7 % respectivamente. En un estudio realizado en Marruecos de 20 estómagos analizados sólo 2 contenían presas y estos fueron peces, concretamente *Ahanopus carbo* y Bathypteridae (Patokina y Litvinov, 2004).

En los estómagos llenos, se han identificado como presas mictófidios como el contenido dominante al igual que lo han descrito otros autores (Marshall y Merret, 1977; Yano, 1911), aunque contrariamente a lo que indican estos reportes no ha aparecido ninguna clase de cefalópodos, segunda presa más abundante en esta especie en el contenido estomacal. Al contrario que en otros estudios, por ejemplo, el realizado en el caladero de Rockall Trough por Mauchline y Gordon, (1983) no se han identificado en los contenidos estomacales de los ejemplares examinados, peces de la familia Gadidae como la bacaladilla (*Micromesistius poutassou*), la locha (*Phycis blenoides*) identificados en ese estudio y también abundantes en aguas del Cantábrico.

Sin embargo, la mayor parte de teleósteos descubiertos en nuestros resultados no se han podido identificar debido a su elevado grado de digestión, por lo que sería conveniente complementar estos estudios con otras técnicas más avanzadas de la ecología trófica como por ejemplo el análisis de isótopos o la elaboración del perfil de ácidos grasos. Esto permitiría recopilar una mayor información acerca de las interacciones tróficas que existen en el medio marino, ya que los tiburones desempeñan como depredadores un papel clave en la regulación de los ecosistemas marinos a niveles tróficos inferiores (Bethea *et al.*, 2004). Por todo ello, el conocimiento de la alimentación de una especie es fundamental para el éxito en la conservación y gestión de las especies, así como del estado de salud del ecosistema donde habitan.

6.4. Barcoding de ADN

Según el árbol filogenético resultante, las dos secuencias COI obtenidas en este trabajo se agruparon junto con las secuencias COI públicas disponibles de la especie *Deania calcea* y las de *Deania hystricosa* en la base de datos BOLD. Aunque dos de las secuencias de *Deania calcea* quedaron fuera del cluster en una rama con un soporte del 100%. Estas secuencias se compararon con las disponibles en la base de datos GenBank utilizando la herramienta BLAST y resultaron coincidentes en un 98% a la especie *Centrophorus* spp. Estos resultados corroborarían los obtenidos por Ward *et al.* 2005, que separa los géneros *Deania* y *Centrophorus* (pertenecientes ambos a la familia

Centrophoridae) en dos clados monofiléticos, así como, la clasificación tradicional propuesta por Compagno (1984). Si bien, indican que sería necesaria una revisión de las secuencias depositadas en la base de datos que correspondan a sus características morfológicas. Por otro lado, con la filogenia reconstruida con el fragmento de la citocromo c oxidasa I no se consigue discriminar molecularmente la especie *Deania hystricosa* de la *Deania calcea*, al igual que se había observado en el trabajo de Ward (2009). Estas especies son morfológicamente muy similares y únicamente se distinguen según el tamaño de los dentículos dérmicos (criterio que no es muy fiable debido a la gran variabilidad existente, como se ha demostrado en el presente trabajo). Es posible que se hayan producido errores en la identificación morfológica, y que sea necesario un análisis más exhaustivo de otras secuencias mitocondriales o nucleares para poder separar las especies ya que puede tratarse de fenotipos distintos de la misma especie. Por todo ello, la relación taxonómica entre estas dos especies debe ser investigada más a fondo (Sanjuán *et al.*, 2012; Menezes *et al.*, 2012).

7. CONCLUSIONES

- Morfológicamente, no se han detectado diferencias en los fenotipos de la *D.calcea* entre sexos y estado de madurez sexual. Sin embargo, el estudio morfológico ha conseguido discriminar esta especie de su congénere, *D.profundorum*, proponiendo otros caracteres de interés (a parte de la presencia de la quilla subcaudal) como la distancia interdorsal y las aletas dorsales.
- *Deania calcea* es una especie fundamentalmente ictiófaga.
- Los dentículos dérmicos no constituyen, por sí solos, un criterio fiable para clasificar taxonómicamente las especies debido a la gran variabilidad existente entre sexos y estados ontogénicos dentro de una misma especie.
- La técnica de barcoding de ADN es válida para identificar especies, como la *D. calcea*, pero no es una herramienta 100% resolutive, ya que no consigue discriminar entre especies morfológicamente muy similares como la *D. calcea* y la *D. hystricosa*. Los resultados obtenidos deben ser complementados con los estudios morfológicos tradicionales de rigor, así como el uso de los dentículos dérmicos, para aumentar la potencia de estos.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Bethea, D.M., Buckel, J.A. y Carlsón, J.K.** (2004). Foraging ecology of the early life stages of four sympatric shark species. *Marine Ecology Progress Series*, 268, 245–264.
- Bineesh, K.K., Gopalakrishnan, A., Akhilesh, K.V., Sajeela, K.A., Abdussamad, E.M., Pillai, N.G.K., ... y Ward, R.D.** (2016). DNA barcoding reveals species composition of sharks and rays in the Indian commercial fishery. *Mitochondrial DNA Part A*, 28(4), 458–472.
- Blaber, S.J.M. y Bulman, C.M.** (1987). Diets of fishes of the upper continental slope of eastern Tasmania: content, calorific values, dietary overlap and trophic relationships. *Marine Biology*, 95, 345–356
- Bowen, S. H.** (1983). Quantitative description of the diet. En: L.A. Nielsen & D.L. Johnson (Ed.), *Fisheries Techniques*: 325-336. American Fisheries Society, Maryland, U.S.A.
- Campana, S.E.** (2004). *Photographic Atlas of Fish Otoliths of the Northwest Atlantic Ocean*. NRC Research Press, Ottawa, Ontario. 284 pp.
- Compagno, J.V.** (1984). *FAO species catalogue Vol. 4. Sharks of the world. An annotated and illustrated catalogue of the shark species known to date*. Italia, Roma: Publishing and Multimedia Service.
- Crooks, N., Babey, L., Haddon, W.J., Love, A.C. y Waring, C.P.** (2013). Sexual Dimorphisms in the Dermal Denticles of the Lesser-Spotted Catshark, *Scyliorhinus canicula* (Linnaeus, 1758). *PLoS ONE*, 8(10): e76887.
- Clarke, K.R. y Gorley, R.N.** (2001). *PRIMER v5: User manual/tutorial*, PRIMER-E, Plymouth UK, 91pp.
- Coelho, R., y Erzini, K.** (2008). Life history of a wide-ranging deepwater lantern shark in the north-east Atlantic, *Etmopterus spinax* (Chondrichthyes: Etmopteridae), with implications for conservation. *Journal of Fish Biology*, 73(6), 1419–1443.
- De la Cueva, M.S.** (1978). Capítulo VIII. En: *Artes y aparejos*. Tecnología pesquera. Subsecretaría de la Marina Mercante, (pp. 137–149). Inspección General de Enseñanzas Marítimas y Escuelas. Litografía EGRAF, Madrid.
- Ebert, D.A. y Stehmann, M.F.W.** (2013). *Sharks, batoids, and chimaeras of the North Atlantic. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes*. No.7. Rome, FAO. 523 pp.
- Ellis, J. R. y Shackley, S.E.** (1995). Ontogenic changes and sexual dimorphism in the head, mouth and teeth of the lesser spotted dogfish. *Journal of Fish Biology*, 47(1), 155–164.
- FishBase** (2018). Froese, R. y Pauly, D. Editors. FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, (06/2018)
- Hall, T. A.** (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95–98.
- Helfman, G.S., Collette, B.B. y Facey, D.E.** (1997). *The Diversity of Fishes*. Blackwell Science. pp. 33–36.
- Hyslop, E.J.** (1980). Stomach content analysis – a review of methods and their application. *Journal of Fish Biology*, 17, 411–429.
- ICES.** (2013). *Report of the workshop on Sexual Maturity Staging of Elasmobranchs (WKMSSEL)*, 11-14 December 2012, Lisbon, Portugal. ICES CM 2012/ACOM:59. 66 pp.
- Iglésias, S.P., Toulhoat, L., y Sellos, D.Y.** (2010). Taxonomic confusion and market mislabelling of threatened skates: important consequences for their conservation status. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 20(3), 319–333.

- Kajiura, S.M., Sebastian, A.P., y Tricas, T.C.** (2000). Dermal bite wounds as indicators of reproductive seasonality and behaviour in the Atlantic stingray, *Dasyatis sabina*. *Environ Biol Fishes*, 58, 23–31.
- Kemp, N.E.** (1999). Integumentary system and teeth. Chapter 2. En: *Sharks skates and rays. The biology of elasmobranch species*. Ed. William Hamlett. The Jhon Hopkins University Press. 501 pp.
- Kumar, S., Stecher, G. y Tamura, K.** (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* 33(7), 1870–1874.
- Lombarte, A., Chic, Ò., Parisi-Baradad, V., Olivella, R., Piera, J. y García-Ladona, E.** (2006). A web-based environment from shape analysis of fish otoliths. The AFORO database. *Scientia Marina*, 70, 147–152.
- MacPherson, E. y Roel, B.A.** (1987). Trophic relationships in the demersal fish community off Namibia. *South African Journal of marine Science*, 5, 585–596.
- Marshall, N. B. y Merrett N.R.** (1977). The existence of a benthopelagic fauna in the deep sea. *Deep-Sea Res. (Suppl)*, 483–497.
- Martínez, P. y Figueras, A.** (2012). *Genética y genómica en acuicultura*. Publicaciones científicas y tecnológicas de la Fundación Observatorio Español de Acuicultura: Madrid, España.
- Mauchline, J. y Gordon, J.D.M.** (1983). Diets of the sharks and chimaeroids of the Rockall Trough, northeastern Atlantic Ocean. *Marine Biology*, 75, 269–278.
- Menezes, G. M., Rosa, A., Melo, O., y Porteiro, F.** (2012). Annotated list of demersal fishes occurring at Sedlo Seamount, Azores north-east central Atlantic Ocean. *Journal of Fish Biology*, 81(3), 1003–1018.
- Muñoz-Chápuli, R.** (1985) Sobre la clasificación tipológica del esqueleto dérmico de escualos. *Miscel·lànea Zoològica*. 9, 396–400.
- Olson, R. J., y Galván-Magaña, F.** (2002). Food habits and consumption rates of common dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) in the eastern Pacific Ocean. *Fishery Bulletin*, 100(2), 279–298.
- Patokina, F.A. y Litvinov, F.F.** (2004). *Food composition and distribution of demersal elasmobranchs on shelf and upper slope of North-West Africa*. ICES CM 2004/K:19.
- Pethybridge, H., Daley, R.K y Nichols, P.D** (2011). Diet of demersal sharks and chimaeras inferred by fatty acid profiles and stomach content analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 409, 290–299.
- Pratt, H.L.** (1979). Reproduction in the blue shark, *Prionace glauca*. *Fish Bull*, 77, 445–470.
- Preciado I., Cartes J.E., Serrano A., Velasco F., Olaso I., Sánchez F. y Frutos I.** (2009). Resource utilization by deep-sea sharks at the Le Danois Bank, Cantabrian Sea, north-east Atlantic Ocean. *Journal of Fish Biology*, 75, 1331–1355
- R Core Team.** (2017). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Raschi, W.G., y Musick, J.A.** (1984). *Hydrodynamic Aspects of Shark Scales. Special report in applied marine science and ocean engineering; no.272*. Virginia Institute of Marine Science, College of William and Mary.
- Raschi, W y Tabit, T.** (1992). Functional Aspects of Placoid Scales: A Review and Update. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, 43, 123–147.
- Reif, W. E.** (1982). Morphogenesis and function of the squamation in sharks. *Neues Jahr. Geol. Palaont.*, 164, 172–184.

- Rochowski, B.E.A., Walker, T.I. y Day, R.W.** (2015) Geographical variability in life-history traits of a midslope dogfish: the brier shark *Deania calcea*. *Journal of Fish Biology*, 87,728–747
- Rodrigues, H.C.B.** (2009). *Dentículos dérmicos de tubarões da costa portuguesa: A sua utilização para identificação das diferentes espécies* (tesis doctoral). Departamento de biología animal. Faculdade de Ciências. Universidad de Lisboa, Lisboa, Portugal.
- Sánchez, F.** (1993). *Las comunidades de peces de la plataforma del Cantábrico*. Publ. Esp. Inst. Esp. Oceanogr. 13, 137 pp.
- Sánchez, F., Poulard, J.C. y de la Gándara, F.** (1993). *Experiencias de calibración entre los artes de arrastre BAKA 44/60 y GOV 36/47*. Inf. Tec. Inst. Esp. Oceanogr, 156, 48 pp.
- Sánchez, F., Blanco, M. y Gancedo, R.** (2002). *Atlas de los peces demersales y de los invertebrados de interés comercial de Galicia y el Cantábrico. Otoño 1997–1999*. Instituto Español de Oceanografía, MYC Ed.CYAN. Madrid, 158 pp.
- Sánchez, F., Gómez-Ballesteros, M., González-Pola, C. y Punzón, A.** (2014). *Sistema de cañones submarinos de Avilés*. Proyecto LIFE +INDEMARES. Ed. Fundación Biodiversidad del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.
- Sanjuán, A., De Carlos, A., Rodríguez-Cabello, C., Bañón, R., Sánchez, F. y Serrano, A.** (2012). Molecular identification of the arrowhead dogfish *Deania profundorum* (Centrophoridae) from the northern waters of the Iberian Peninsula, *Marine Biology Research*, 8(9), 901–905.
- Straube, N., Iglesias, S.P., Sellos, D.Y., Kriwet, J. y Schliewen, U.K.** (2010). Molecular phylogeny and node time estimation of bioluminescent Lantern Sharks (Elasmobranchii: Etmopteridae) *Mol. Phylogenet. Evol.* 56(3), 905–917.
- Sullivan, T. y Regan, F.** (2011). The characterization, replication and testing of dermal denticles of *Scyliorhinus canicula* for physical mechanisms of biofouling prevention. *Bioinspiration & Biomimetics*, 6(4), 046001.
- Tamura K.** (1992). Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Molecular Biology and Evolution*, 9, 678–687.
- Tuset, V.M., Lombarte, A., y Assis, C.A.** (2008) Otolith atlas for the western Mediterranean, north and central eastern Atlantic. *Scientia Marina*, 72(S1), 7–198.
- Veríssimo, A., Cotton, C.F., Buch, R.H., Guallart, J., y Burgess, G.H.** (2014). Species diversity of the deep-water gulper sharks (Squaliformes: Centrophoridae: Centrophorus) in North Atlantic waters - current status and taxonomic issues. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 172(4), 803–830.
- Ward, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R. y Hebert, P.D.** (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 360 (1462), 1847–1857.
- Ward, R.D., Holmes, B.H., White, W.T. y Last, P.R.** (2008). DNA Barcoding Australian Chondrichthyans: Results and Potential Uses in Conservation. *Mar. Freshw. Res.* 59, 57–71.
- Ward, R. D.** (2009). DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. *Molecular Ecology Resources*, 9(4), 1077–1085.
- Ward, R. D., Hanner, R., y Hebert, P. D. N.** (2009). The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology*, 74(2), 329–356.
- White, W.T. y Last, P.R.** (2012). A review of the taxonomy of chondrichthyan fishes: A modern perspective. *J. Fish. Biol.*, 80, 901–917.
- White, W.T., Ebert, D.A. y Naylor, G.J.P.** (2017). Revision of the genus *Centrophorus* (Squaliformes: Centrophoridae): Part 2—Description of two new species of *Centrophorus*

and clarification of the status of *Centrophorus lusitanicus* Barbosa du Bocage & de Brito Capello, 1864. *Zootaxa*, 4344(1), 86 pp.

Wickham, H. (2009). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York.

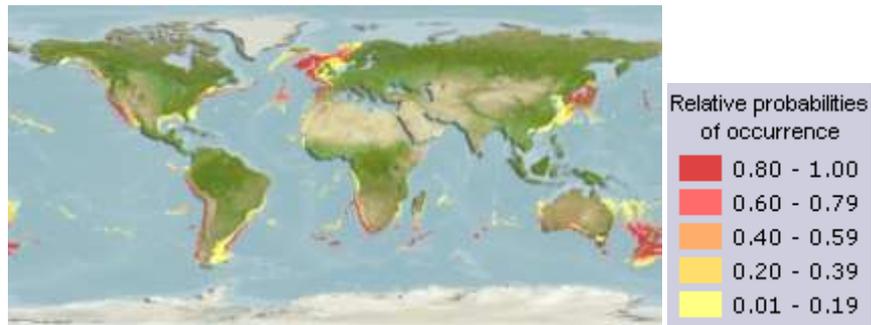
Yano, K. (1991). Catch distribution, stomach contents and size at maturity of two squaloid sharks, *Deania calceus* and *D. crepidalbus*, from the southeast Atlantic off Namibia. *Bulletin of the Japanese Society of Fisheries Oceanography*, 55, 89–196.

Yano, K. y Tanaka, S. (1983). Biological studies on squaloid sharks from Suruga Bay, Japan. En: *Proceedings of the 2nd North Pacific Aquaculture Symposium, Tokyo and Shimizu, September 1983* (Nagai, A., ed.), pp. 405–414. Tokyo: Tokyo University Press.

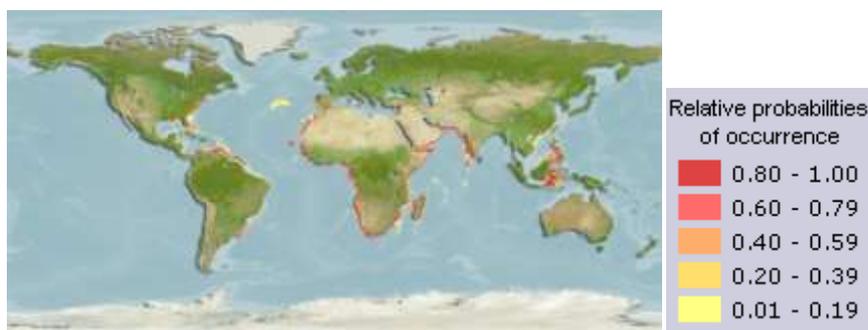
Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. y Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* 7, 203–214.

9. ANEXOS

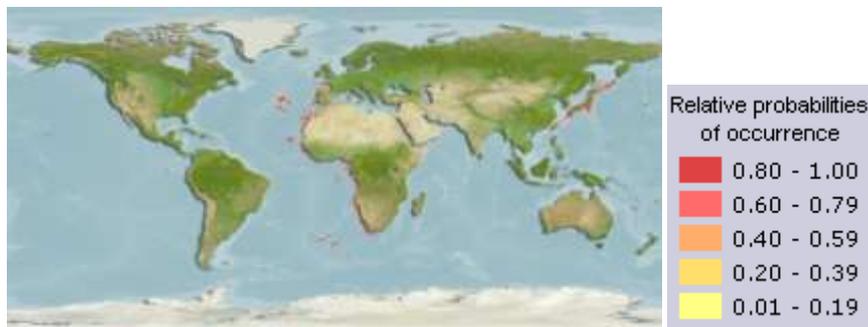
ANEXO I: Mapas de distribución



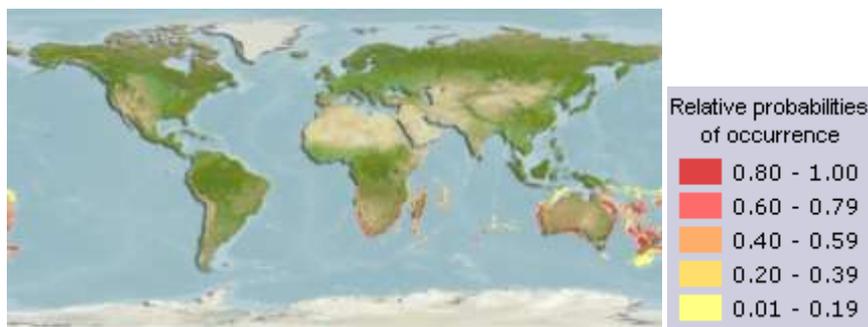
Mapa mundial de distribución de la especie *D. calcea* (FishBase, 2018).



Mapa mundial de distribución de la especie *D. profundorum* (FishBase, 2018).



Mapa mundial de distribución de la especie *D. hystricosa* (FishBase, 2018).

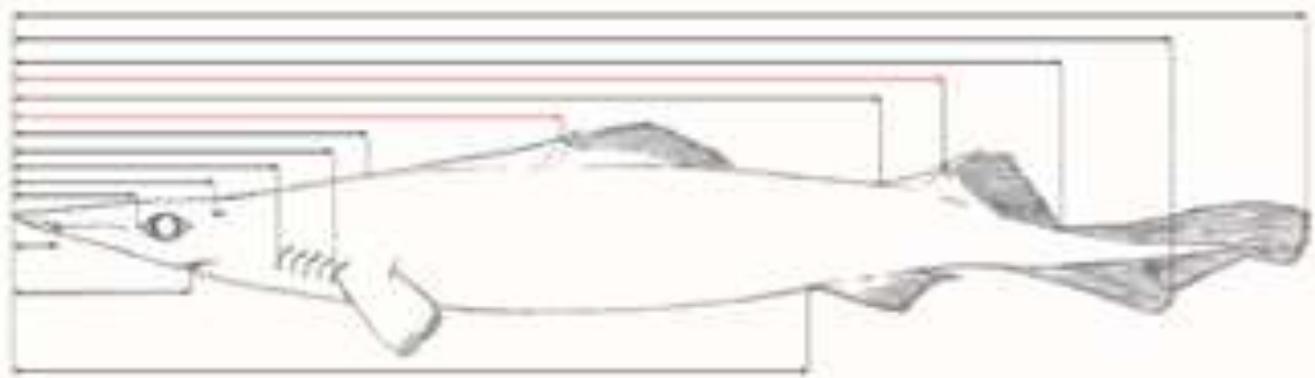


Mapa mundial de distribución de la especie *D. quadrispinosa* (FishBase, 2018).

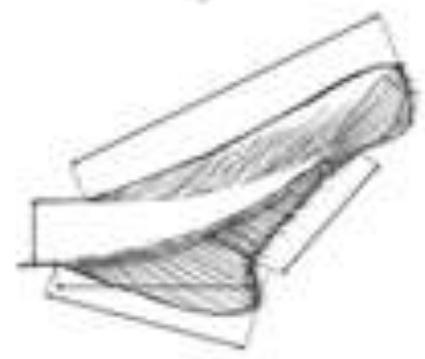
ANEXO 2: Medidas morfométricas y descripción

Medidas morfométricas	Descripción
TL	Longitud total
FL	Longitud de la bifurcación
PCL	Longitud pre-aleta
PD2	Longitud pre-2ª aleta dorsal
IDS	Espacio interdorsal
1Dto2D	Distancia de la 1ª aleta dorsal a la 2ª espina dorsal
PD1	Longitud pre-1ª aleta dorsal
PP2	Longitud pre-aleta pélvica
HDL	Longitud de la cabeza
PG1	Longitud prebranquial
PSP	Longitud preespiracular
POR	Longitud preoral
POB	Longitud preorbital
PRN	Longitud prenarial
EYL	Longitud ojo
INO	Espacio interorbital (principio ojo)
INO	Espacio interorbital
ENS	Anchura exterior de las narinas
INW	Espacio internarial
MOW	Anchura de la boca
P1L	Longitud de la aleta pectoral
P1B	Base de la aleta pectoral
P1H	Altura de la aleta pectoral
D1L	Longitud de la 1ª aleta dorsal
D1B	Base de la 1ª aleta dorsal
D1H	Altura de la 1ª aleta dorsal
D2L	Longitud de la 2ª aleta dorsal
D2B	Base de la 2ª aleta dorsal
D2H	Altura de la 2ª aleta dorsal
P2L	Longitud de la aleta pélvica
P2B	Base de la aleta pélvica
P2H	Altura de la aleta pélvica
CDM	Margen dorsal de la aleta caudal
CPV	Margen preventral de la aleta caudal
CPU	Margen postventral superior de la aleta caudal
CFL	Longitud de la bifurcación de la aleta caudal
CPH	Anchura pedúnculo caudal

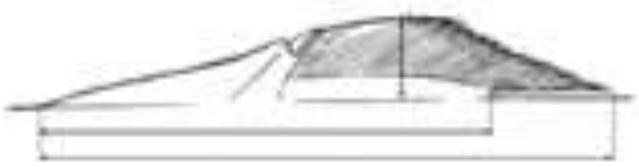
Códigos de las medidas morfométricas y descripción



Principales medidas longitudinales. Vista lateral *Deania calcea*
(Elaboración propia)



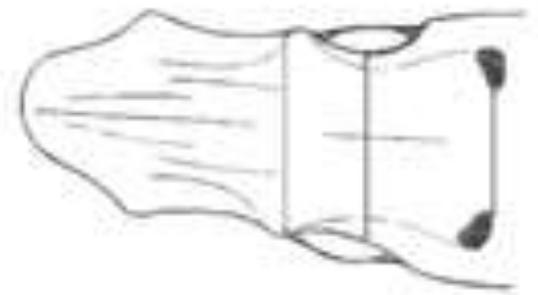
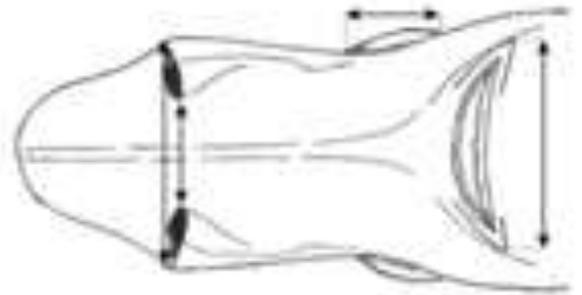
Medidas aleta caudal



Medidas 1ª aleta dorsal
Medidas aleta pectoral



Medidas 2ª aleta dorsal
Medidas aleta pélvica



Medidas de la cabeza.
Vista ventral y dorsal



ANEXO 3: Otolitos.

Código: BLD15L1DCA3

TL=81.5 cm

Sexo=Macho

Madurez=2



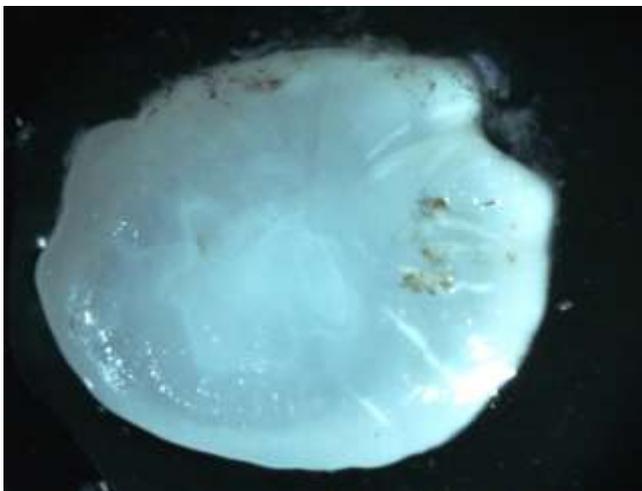
Reino:	Animalia
Filo:	Chordata
Clase:	Actinopterygii
Superorden:	Scopelomorpha
Orden:	Myctophiformes
Familia:	Myctophidae
Subfamilia:	Lampanyctinae
Género:	Diaphus spp Eigenmann & Eigenmann, 1890

Código: CA10G4DCA3

TL=79.3 cm

Sexo= Hembra

Madurez=2



Reino:	Animalia
Filo:	Chordata
Clase:	Actinopterygii
Orden:	Myctophiformes
Familia:	Myctophidae
Género:	Myctophum
Especie:	<i>Protomyctophum punctatum</i> , Rafinesque (1810)