

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

Estructura genética poblacional de dos especies  
de tiburones (*Carcharhinus falciformis* y  
*Sphyrna lewini*) del Pacífico Mexicano

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

(Biología experimental)

**P R E S E N T A**

Evangelina Castillo Olgún

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Manuel Uribe Alcocer

México, D.F.

Noviembre, 2005

0350094



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
 Director General de Administración Escolar, UNAM  
 Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 27 de junio del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) **CASTILLO OLGUÍN EVANGELINA** con número de cuenta **96576229** con la tesis titulada: **Estructura genética poblacional de dos especies de tiburones (Carcharhinus falciformis y Sphyrna lewini) del Pacífico Mexicano**, bajo la dirección del(a) Dr. Manuel Uribe Alcocer.

Presidente:	Dr. Píndaro Díaz Jaimes
Vocal:	Dr. Luis Medrano González
Secretario:	Dr. Manuel Uribe Alcocer
Suplente:	Dra. Ella Vázquez Domínguez
Suplente:	Dra. Ma. de Lourdes Muñoz Moreno

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
 "POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
 Ciudad Universitaria, D.F., a 10 de noviembre del 2005

  
 Dr. Juan Núñez Farfán  
 Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Autortzo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.  
 NOMBRE: Evangelina Castillo Olguin  
 FECHA: 16-Nov-2005  
 FIRMA: [Handwritten Signature]

---

## AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos al Dr. Manuel Uribe Alcocer por su gran apoyo brindado en mi formación académica, por sus importantes aportaciones, por la paciencia y por la confianza que me ha brindado para la realización de este estudio.

Agradezco a mi comité tutorial: A la Dra. María de Lourdes Muñoz Moreno por sus acertadas e importantes recomendaciones para la elaboración del proyecto, al Dr. Luis Medrano González por las sugerencias pertinentes para la realización de los análisis realizados en el presente trabajo.

Así mismo agradezco a los Revisores: Dra. Ella Gloria Vázquez Domínguez por sus correcciones y sugerencias realizadas y al Dr. Pindaro Díaz Jaimes por sus aportaciones pertinentes, por la paciencia brindada y ayuda en la realización de los análisis del presente trabajo.

Gracias al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología por las facilidades para la realización del trabajo en sus instalaciones y al apoyo otorgado por DGAPA mediante PAPIIT al proyecto IN215901 “Estudio genético poblacional de tres especies de importancia económica en el Pacífico mexicano” y al apoyo económico otorgado por DGEP y CONACYT.

Extiendo un agradecimiento al Dr. Felipe Galván M. del CICIMAR de la PAZ, BCS; al M. en C. Heriberto Santana H. del CRIP de Manzanillo; al M. en C. Vicente Anislado T. del ICMYL; al Biol. Francisco Sancho V. del CETMAR de Pto. Madero, Chiapas y a todas las personas que ayudaron en la colecta de los organismos estudiados en este trabajo.

Agradezco a Dios y en forma muy especial a mis padres por el gran amor brindado, por su apoyo ilimitado, por su comprensión y paciencia para la culminación de esta meta. A mi hermano y a Bere por sus ánimos y apoyo otorgado.

Y a mis compañeros de laboratorio, familiares y a cada uno de mis amigos por sus palabras de aliento en los momentos difíciles para la culminación de mi trabajo.....Gracias.

---

## CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>ANTECEDENTES</b>	6
• Tiburón sedoso	10
• Tiburón martillo	13
• Estudios genéticos y de estructura poblacional de tiburones	16
• Características oceanográficas del Pacífico mexicano	17
<b>OBJETIVOS</b>	21
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	22
Material biológico	22
RAPD'S	25
Análisis de datos en RAPD'S,	27
cit b mtDNA	30
Análisis de datos en cit b mtDNA	32
<b>RESULTADOS</b>	38
• Filogenia	38
<i>Carcharhinus falciformis</i>	
• Diversidad genética	39
• Estructura poblacional	44
• Flujo genético y aislamiento por distancia	48
• Genealogía	52
<i>Sphyrna lewini</i>	
• Diversidad genética	54
• Estructura poblacional	57
• Flujo genético y aislamiento por distancia	61
• Genealogía	66
<b>DISCUSIÓN</b>	68
• Filogenia	68
• <i>Carcharhinus falciformis</i>	68
• <i>S. lewini</i>	70
<b>CONCLUSIONES</b>	76
<b>REFERENCIAS</b>	77
<b>ANEXOS</b>	83

## ABREVIATURAS

AFLP's	Amplified Fragment Length Polymorphisms; Polimorfismos de Longitud de Fragmentos Amplificados.
AMOVA	Análisis de varianza molecular
CC	Corriente de California
CNE	Corriente Norecuatorial
CCE	Contracorriente Norecuatorial
CCC	Corriente Costanera de Costa Rica
CICIMAR	Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas
CRIP	Centro Regional del Investigación Pesquera
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminatetracético
FAO	Food and Agriculture Organization, Organización para la Alimentación y la Agricultura
INP	Instituto Nacional de la Pesca
LT	Longitud Total
LF	Longitud Furcal
mtDNA	Ácido Desoxirribonucleico mitocondrial
ND4	Deshidrogenasa subunidad 4
NOAA	National Oceanic and Atmospheric Administration; Administración Nacional Oceánica y Atmosférica.
pb	Pares de bases
PCR	Polimerase Chain Reaction, Reacción en Cadena de la Polimerasa
POT	Pacifico Oriental Tropical
p/v	Peso sobre volumen
RAPD's	Randomly Amplified Polymorphic DNA, DNA polimórfico amplificado aleatoriamente
RFLP's	Restriction Fragment Length Polymorphism, Polimorfismo de longitud de Fragmentos de Restricción
rpm	Revoluciones por minuto
SAGARPA	Secretaría de Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SEMARNAP	Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca
SEPESCA	Secretaría de Pesca
SSCP's	Single Strand Conformation Polymorphism, Polimorfismo de conformación de cadenas sencillas
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletlenadamina
TTPGA	Tools for Population Genetic Analysis
UPGMA	Unweighted-Pair Group Method with Arithmetic Mean
UV	Ultravioleta

VNTR's	Variable Number Tandem Repeat, Número Variable de Repeticiones en Tandem
ZEE	Zona Económica Exclusiva

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Productividad total de pesca en litorales Mexicanos de 1986 a 2000.	2
Figura 2.- Pesquerías Importantes en México en 2000 y 2001.	2
Figura 3.- Principales Pesquerías a nivel Mundial de 1995-2001	3.
Figura 4.- Principales Radiaciones de grupos de organismos de peces.	6
Figura 5.- Productividad histórica nacional de pesca de tiburón y cazón, de 1986 a 2002.	8
Figura 6.- Tiburón Sedoso ( <i>Carcharhinus falciformis</i> ).	11
Figura 7.- Distribución mundial de <i>Carcharhinus falciformis</i> .	12
Figura 8.- Tiburón Martillo ( <i>Sphyrna lewini</i> ).	14
Figura 9.- Distribución mundial de <i>Sphyrna lewini</i> .	15
Figura 10.- Características Oceanográficas del Pacífico mexicano en invierno y verano.	20
Tabla 1.- Muestras colectadas, de <i>C. falciformis</i> y <i>S. lewini</i> del Pacífico Mexicano.	23
Figura 11.- Ubicación geográfica de las muestras de <i>C. falciformis</i> y <i>S. lewini</i> en el Pacífico Mexicano.	24
Figura 12.- DNA genómico de alto peso molecular de tiburones.	25
Figura 13.- Reconstrucción filogenética del orden de los Carcharhiniformes mediante Máxima Verosimilitud	39
Tabla 2.- “Iniciadores”seleccionados y loci analizados para <i>C. falciformis</i> . .	40
Tabla 3.- Diversidad de RAPD's y frecuencias de haplotipos de <i>citocromo b</i> en <i>C. falciformis</i> .	41
Tabla 4.- Índices de diversidad molecular para una región de <i>citocromo b</i> en <i>C. falciformis</i> .	42
Figura 14.-Correlación de los índices de $\theta_{\pi}=\theta_m$ y $\theta_s$ de <i>C. falciformis</i> .	43
Tabla 5.-Valores de Pruebas de Neutralidad para los haplotipos de <i>C. falciformis</i> .	43
Tabla 6.- Valores <i>P</i> de la prueba exacta y de índice $F_{ST}$ para RAPD's en <i>C. falciformis</i> .	45
Tabla 7.- Valores de <i>P</i> de la prueba exacta y valores de $\Phi_{ST}$ de haplotipos en <i>C. falciformis</i> .	45
Figura 15.- Correlación de índices de divergencia poblacional entre pares de muestras para <i>C. falciformis</i> .	46
Tabla 8.- Valores <i>P</i> de la prueba exacta y valores de $F_{ST}$ para pares de muestras de <i>C. falciformis</i> .	47
Tabla 9.- Prueba de AMOVA para una región de <i>citocromo b</i> de muestras de <i>C. falciformis</i> .	47
Tabla 10.- Distancia genética y valores de identidad genética de RAPD's para <i>C. falciformis</i> .	48
Figura 16.-Dendograma de distancias genéticas de RAPD para <i>C. falciformis</i> con UPGMA.	48
Figura 17.- Ajuste al modelo de aislamiento por distancias para RAPD's en <i>C. falciformis</i> .	49
Tabla 11.- Distancias haplotípicas de Nei (1978), para las muestras <i>C. falciformis</i> .	50
Figura 18.- Dendograma de distancias genéticas de haplotipos para <i>C. falciformis</i> con UPGMA.	50
Tabla 12.- Migrantes por generación y valores de distancia genética para secuencias en <i>C. falciformis</i> .	51
Figura 19.- Dendograma de distancia genética de secuencias para <i>C. falciformis</i> .	51
Figura 20.- Ajuste al modelo de aislamiento por distancias para secuencias de <i>C. falciformis</i> .	52
Figura 21.- Genealogía de los haplotipos de un fragmento de <i>citocromo b</i> en <i>C. falciformis</i> .	53
Figura 22.-Distribución de diferencias nucleotídicas para los haplotipos de <i>C. falciformis</i> .	53
Tabla 13.- “Iniciadores” seleccionados y loci analizados para <i>S. lewini</i> .	54

---

Tabla 14.- Diversidad de RAPD's y frecuencias de haplotipos de <i>citocromo b</i> en <i>S. lewini</i> .	55
Tabla 15.- Índices de diversidad molecular para una región de <i>citocromo b</i> en <i>S. lewini</i> .	56
Figura 23.- Correlación de los índices de $\theta_{\pi}=\theta_m$ y $\theta_s$ de <i>S. lewini</i> .	56
Tabla 17.- Valores de Pruebas de Neutralidad para los haplotipos de <i>S. lewini</i> .	57
Tabla 18.- Valores <i>P</i> de la prueba exacta y de índice $F_{ST}$ para RAPD's en <i>S. lewini</i> .	58
Tabla 19.- Valores de <i>P</i> de la prueba exacta y valores de $\Phi_{ST}$ de haplotipos en <i>S. lewini</i> .	59
Figura 24.- Correlación de índices de divergencia poblacional entre pares de muestras para <i>S. lewini</i> .	60
Tabla 20.- Valores <i>P</i> de la prueba exacta y valores de $F_{ST}$ para pares de muestras de <i>S. lewini</i> .	60
Tabla 21.- Prueba de AMOVA para una región de <i>citocromo b</i> de muestras de <i>S. lewini</i> .	61
Tabla 22.- Distancia genética y valores de identidad genética de RAPD's para <i>S. lewini</i> .	62
Figura 25.- Dendograma de distancias genéticas de RAPD para <i>S. lewini</i> con UPGMA.	62
Figura 26.- Ajuste al modelo de aislamiento por distancias para RAPD's en <i>S. lewini</i> .	63
Tabla 23.- Distancias haplotípicas de Nei (1978), para las muestras <i>S. lewini</i> .	64
Figura 27.- Dendograma de distancias genéticas de haplotipos para <i>S. lewini</i> con UPGMA.	64
Tabla 24.- Migrantes por generación y valores de distancia genética para secuencias en <i>S. lewini</i> .	65
Figura 28.- Dendograma de distancia genética de secuencias para <i>S. lewini</i> .	65
Figura 29.- Ajuste al modelo de aislamiento por distancias para secuencias de <i>S. lewini</i> .	66
Figura 30.- Genealogía de los haplotipos de un fragmento de <i>citocromo b</i> de <i>S. lewini</i> .	66
Figura 31.- Distribución de diferencias nucleotídicas para los haplotipos de <i>S. lewini</i> .	67
Figura 32.-Ubicación de las colectas de <i>C. falciformis</i> y <i>S. lewini</i> y corrientes oceánicas del Pacífico mexicano.	75



---

## RESUMEN

La genética poblacional es una herramienta útil para detectar estructuración de las poblaciones, con base en modelos evolutivos. También los estudios genéticos ayudan a conocer más sobre la dinámica poblacional y algunos aspectos de su evolución. Por ello, esta disciplina se ha adoptado en las prácticas cotidianas por diferentes sectores académicos, como los ecólogos y los biólogos pesqueros.

Para el manejo de las pesquerías es importante conocer los niveles de diversidad y divergencia poblacional de las especies comerciales, con objeto de implementar modelos adecuados para permitir la conservación de los recursos explotados.

Debido a las características biológicas de los tiburones como son: sus bajas tasas de crecimiento, maduración sexual tardía y en algunas especies la baja tasa de reproducción, las poblaciones son vulnerables a efectos de sobreexplotación, lo que puede modificar la diversidad genética de las poblaciones de tiburones.

En este trabajo se evaluaron las condiciones de variación genética y se determinó el grado de estructura poblacional de las especies *Carcharhinus falciformis* y *Sphyrna lewini* que son especies de importancia pesquera en el Pacífico mexicano mediante RAPD's y mtDNA.

Mediante el análisis de RAPD's se encontró que ambas especies presentaron niveles altos de diversidad genética, en comparación con los niveles reportados en otras especies de tiburones, también con RAPD's se presentó diferenciación genética en las cuatro diferentes regiones de cada especie evaluada. Sin embargo con el análisis de un fragmento del *citocromo b* de la región mitocondrial se observó una estructura poblacional significativa únicamente en el tiburón martillo (*S. lewini*), mostrando indicios de que esta especie presenta posiblemente un desplazamiento diferencial de sexos.

Es posible que las divergencias encontradas en estas especies se deban principalmente al efecto que representan las corrientes oceánicas del Pacífico, ya que *S. lewini* es un organismo más costero y puede mantenerse cercano a zonas de surgencia mientras que *C. falciformis* es más oceánico y puede aprovechar las corrientes para su desplazamiento en búsqueda de alimento.

---

## INTRODUCCIÓN

Los recursos naturales bajo explotación abarcan una gran diversidad de organismos vegetales y animales. Dentro de este último grupo, los recursos acuáticos, principalmente los marinos, son elementos relevantes para la economía y alimentación de muchos países que cuentan con litorales ya que permiten el desarrollo de pesquerías, con importancia tanto a escala local y regional como mundial.

Los peces son los principales recursos acuáticos en explotación por sus altos volúmenes de captura. Las pesquerías de la anchoveta, la sardina, los atunes y los picudos son de gran importancia en México (INP, 1995 y 1996) y su éxito se debe principalmente a su abundancia y a que poseen una amplia distribución. Por tal motivo, los estudios poblacionales sobre los recursos explotados son herramientas valiosas para su administración y conservación.

Toda pesquería debe estar planificada sobre un esquema de administración que, a su vez, debe basarse en conocimientos tanto biológicos como genéticos que permitan mantener el rendimiento óptimo de los recursos, como: determinaciones de abundancia, tallas mínimas permisibles de captura, tasas de crecimiento y reproducción, datos demográficos, evaluación de niveles de diversidad genética y determinación de estructura genética poblacional de unidades discretas de pesca (Cochrane; 2002; Policansky, 1993; Kenchington, 2001; Utter, 1986 y 1991; Ryman, 1991).

El término de “unidades discretas” en biología pesquera se aplica a toda subpoblación que se encuentra en explotación y que posiblemente presenta diferencias biológicas y/o genéticas con otras entidades semejantes (Altukhov, 1981). La importancia de evaluar si un recurso se encuentra dividido en unidades discretas estriba en permitir que cada población sea administrada de acuerdo con sus características específicas, ya que si no existe una homogeneidad genética de estas unidades, es muy probable que existan diferencias biológicas tales como diferentes tasas de crecimiento, fecundidad y desarrollo entre otras (Sunnucks, 2000). Si estos elementos no se consideran en la administración de la pesquería, se puede ocasionar la disminución progresiva de la variación genética, con la consecuente modificación del tamaño poblacional y de los volúmenes de captura, llevando en casos extremos a que las poblaciones de estos organismos se colapsen, afectando de manera directa a toda pesquería o en casos verdaderamente graves se puede ocasionar la extinción de las unidades de pesca (Altykhov, 1981; Pope, 2002). Es por ello, que la identificación de unidades discretas de pesca ayuda a entender mejor a los recursos

naturales y contribuye a una administración más eficiente, teniendo como resultado una explotación racional y óptima conservación de dichos recursos (Waldman, 1999; Ward, 2000).

En México existe un número elevado de pesquerías tanto en el Golfo de México como en el Pacífico mexicano. De este último, se extrae la mayor producción pesquera del país (INP, 1995,1996) (Figura 1). Por tal motivo, los estudios realizados sobre los recursos de esta cuenca oceánica y la identificación de unidades discretas de pesca, son relevantes.

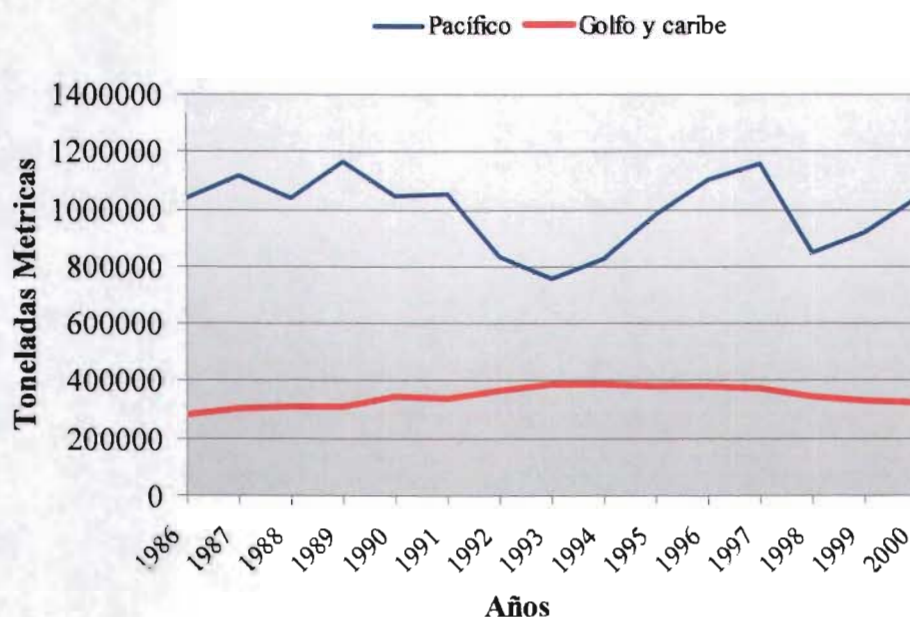


Figura 1.- Productividad total de pesca en litorales Mexicanos de 1986 a 2000 ( INP, 2000).

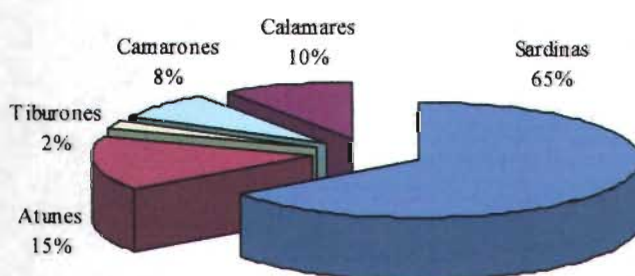


Figura 2.- Pesquerías importantes por volumen de captura en México en 2000 y 2001, datos obtenidos de FAO.

Las principales pesquerías del Pacífico mexicano son las de la anchoveta, la sardina, el atún, el camarón, el calamar, diferentes especies de picudos y tiburones (Figura 2). Estas pesquerías pueden realizarse de manera masiva, con embarcaciones pesqueras de altura. Sin embargo la pesca de tiburón se realiza en forma artesanal como en embarcaciones palangreras e

incidentalmente en embarcaciones de altura dedicadas a la pesca de atún o picudos, ya que los tiburones pueden ser capturados tanto en zonas costeras como oceánicas (FAO, 1994b).

A escala mundial, los tiburones que se ubican dentro de los 15 grupos de peces de mayor captura (Figura 3); comenzaron a ser explotados a fines de los años 1920 y durante el período de la segunda guerra mundial, se incrementó intensamente su pesca debido a la gran demanda de vitamina "A" que era extraída de sus hígados. Una vez que se logró sintetizar la vitamina "A", la pesca del tiburón disminuyó pero aún así su explotación continuó, ya que también su carne es importante fuente de grasas y hierro (Applegate *et al.*, 1993). También los tiburones se han usado en la elaboración de diversos medicamentos por lo que actualmente su pesquería se realiza principalmente con fines farmacéuticos y alimenticios.

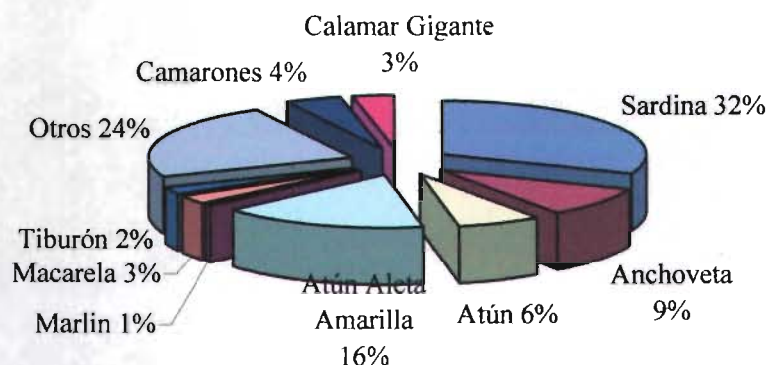


Figura 3.- Principales pesquerías mundiales de 1995-2001 datos obtenidos de FAO.

Las aletas de tiburón son altamente cotizadas por las industrias asiáticas, ya que se les ha atribuido carácter afrodisíaco, además de ser el ingrediente principal de la famosa sopa de aleta de tiburón, razón por la cual en muchas ocasiones se desaprovecha la carne del organismo, pues se sabe de casos en los que los pescadores dejan morir al animal después de mutilar únicamente sus aletas, que son mejor pagadas que su carne (Applegate *et al.*, 1993).

Ya que los tiburones son organismos sumamente antiguos y muy numerosos en cuanto a las especies conocidas y a que muchas de éstas se consideran como un recurso potencialmente explotable o en explotación, se ha generado un vasto conocimiento en torno a ellos, abarcando aspectos de carácter biológico, ecológico, etológico y pesquero, entre otros. Los escasos estudios

---

sobre genética poblacional que se han realizado en tiburones, se enfocan principalmente a las especies con importancia comercial como las del género *Carcharhinus*, *Sphyrna* y *Alopias* o algunas otras con importancia etológica, como es el caso del tiburón blanco (*Carcharodon carcharias*) causante de un número importante de ataques a humanos en algunas regiones.

Los estudios genético-poblacionales son relevantes en las pesquerías, ya que permite evaluar la variación genética de las poblaciones y estimar la magnitud de divergencia poblacional, para definir la presencia de unidades independientes de pesca; además de realizar estimaciones de su flujo genético, tamaño poblacional, cuellos de botella y otros (Pope, 2002).

La variación genética proporciona la plasticidad necesaria en las poblaciones que permite la adaptación a los cambios constantes en el ambiente (Dobzhansky *et al.*, 1993; Hedrik, 2000). En algunos casos también aquellos cambios originados por la sobreexplotación producen una forma de selección artificial, ya que al extraer una porción de organismos con determinada talla, edad o sexo, se puede modificar la composición genética de las poblaciones. Por lo que las poblaciones que presentan mayor variación genética tienen más probabilidad de sortear exitosamente estos cambios drásticos.

La endogamia producida por la disminución de los tamaños efectivos de las poblaciones, que podría ser el efecto de la sobreexplotación, puede originar entrecruzamientos entre individuos similares genéticamente (Dobzhansky *et al.* 1993; Hedrik, 2000), lo que puede afectar la viabilidad de las poblaciones. Además de que fuerzas evolutivas como la deriva, pueden actuar en poblaciones pequeñas donde se fijan determinados genes y como consecuencia disminuye la variación genética de la población. También estas poblaciones pueden llegar a tener cuellos de botella que originan colapsos fuertes dentro de las pesquerías o incluso extinciones de ciertas poblaciones (Ayala y Kiger, 1989; Kenchington, 2001).

El estudio de la genética poblacional aporta asimismo elementos para evaluar procesos de migración entre poblaciones, permitiendo profundizar en el conocimiento de la distribución y dinámica de los recursos, determinar el grado de proximidad de diferentes poblaciones y definir la presencia de stocks independientes (Sweijd *et al.*, 2000; Hedrik, 2000). Por esto, es importante conocer y mantener niveles adecuados de variación genética dentro de las poblaciones, ya que una mala administración del recurso puede provocar la pérdida de variación genética y ocasionar que actúen fuerzas evolutivas como la deriva genética y que el efecto de la endogamia se vea reflejado en la viabilidad de las poblaciones.

Para la evaluación de variación genética, la genética de poblaciones se ayuda de herramientas como las que proporciona la biología molecular. A partir de la década de los 1960

se utilizó el análisis de las isoenzimas (Lewontin y Hubby, 1966), las cuales permiten realizar comparaciones interespecíficas con adecuada resolución (Smith y Fujio, 1982; Murphy *et al.*, 1996; Gaida, 1997), pero su expresión puede estar influenciada por factores ambientales (Powers *et al.*, 1991; LeCorrete *et al.*, 1993), Actualmente la mayoría de los estudios genéticos utilizan técnicas que analizan el DNA. Los segmentos de DNA que generalmente se analizan, suelen estar menos influidos por factores ambientales y proporcionan estimaciones con mayor precisión que permiten realizar comparaciones entre organismos a nivel intra e interespecíficos.

Dentro de las diversas técnicas que analizan DNA, las más usadas para la determinación de la estructura poblacional son los RFLP's (Restriction Fragment Length Polymorphisms, Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción), los RAPD's, (Random Amplified Polymorphic DNA, DNA polimórfico amplificado aleatoriamente), los microsatélites (Silva y Russo, 2000) y recientemente los SSCP's (Single Strand Conformation Polymorphisms, Polimorfismos de la Conformación de Cadenas Sencillas), entre otros (Orita *et al.*, 1989; Angers *et al.*, 2000; Bastos *et al.*, 2001).

La técnica de RAPD's (Welsh y McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990) se ha utilizado mucho para evaluar estructura poblacional en peces, crustáceos y en organismos terrestres como plantas y algunos artrópodos, por los resultados satisfactorios obtenidos (Dinesh *et al.*, 1993; Lynch y Milligan, 1994; Todd *et al.*, 1997; Mamuris *et al.*, 1998; Aubert y Linghtner, 2000). La técnica de SSCP's (Orita *et al.*, 1989) no ha sido muy utilizada en peces, pero ha originado resultados satisfactorios en otros organismos para determinar estructura poblacional (Asensio *et al.*, 2001; Small y Gosling, 2001; Shaffer *et al.*, 2000). Debido a la sensibilidad de estas técnicas, se utilizan en este trabajo para evaluar la presencia de estructura genética poblacional en dos especies de tiburones de importancia comercial por sus volúmenes de captura en el Pacífico mexicano (*Carcharhinus falciformis* y *Sphyrna lewini*), además de que son organismos que se encuentran fuertemente explotados, ya que presentan características biológicas que los hace vulnerables a la sobrepesca.

## ANTECEDENTES

Los tiburones son peces cartilagosos altamente especializados y muy antiguos, ya que sus registros fósiles indican sus orígenes hace aproximadamente unos 400 millones de años a fines del Silúrico y comienzo del Devónico. A lo largo de su evolución, han pasado por dos procesos de radiación, una a finales del Devónico y otra a finales del Jurásico y principios del Cretácico (Strickberger, 2000) (Figura 4). Actualmente existen aproximadamente 350 especies de tiburones, las cuales presentan pocos cambios en su estructura original en comparación con otros organismos, como los mamíferos. Los tiburones han llegado a sobrevivir largo tiempo, gracias a sus características fisiológicas que les han permitido la adaptación a diversos ambientes, tanto marinos, como salobres e incluso de agua dulce (Compagno, 1984a).

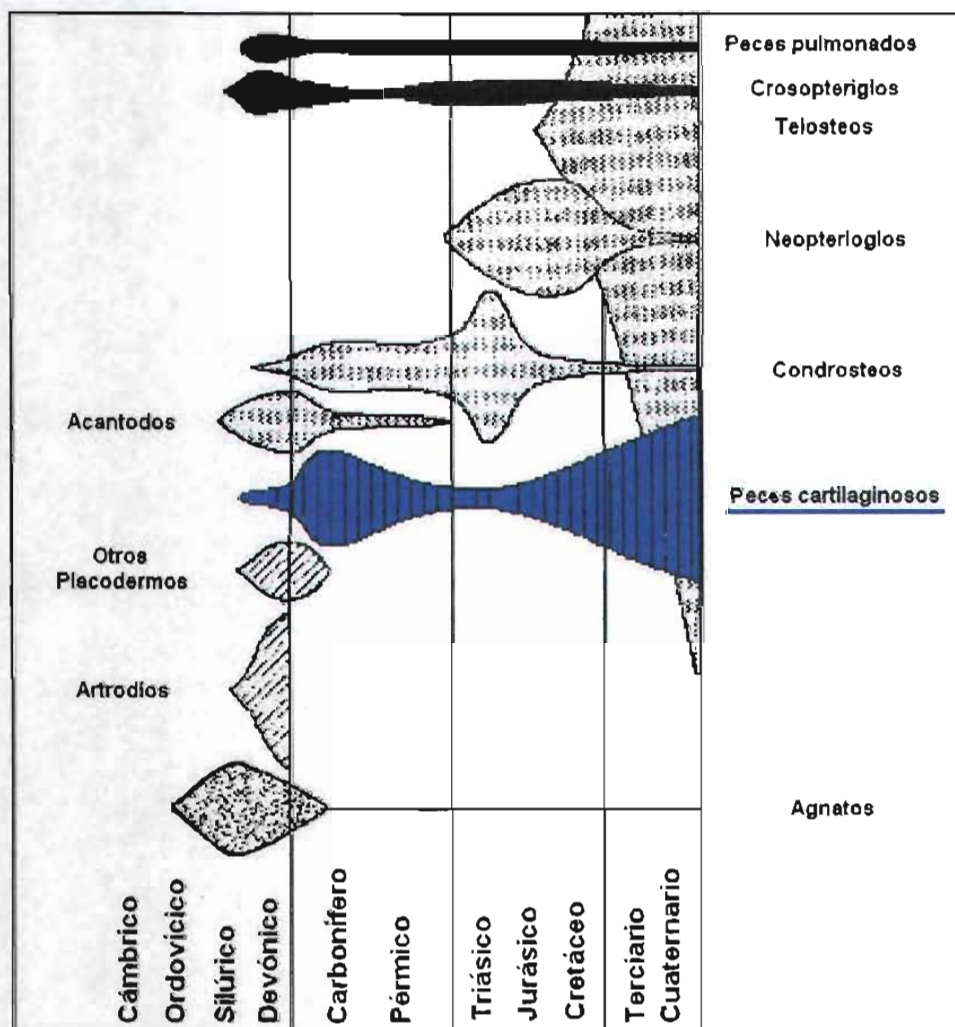


Figura 4.- Principales radiaciones en peces, (tomado de Strickberger. 2000)

Los tiburones han sido objeto de numerosas investigaciones debido a que, son modelos importantes para la comprensión de algunos procesos, como por ejemplo la reproducción, pues los tiburones son tanto vivíparos como ovíparos, o ambos. Los estudios de algunos factores fisiológicos son importantes, como el de los altos niveles de urea en su torrente sanguíneo ya que, además de regular aspectos osmóticos, es un elemento clave para evitar niveles elevados de mutación en su material genético (Martín *et al.*, 1992). A su vez los niveles altos de urea, originan mayor protección contra enfermedades como el cáncer, aspecto que es de gran importancia en el ámbito biomédico (FAO, 1999). También se ha observado una importante relación de la evolución de su sistema inmunológico con los sistemas actuales en diversos organismos, lo que ayuda a una mejor comprensión de estos aspectos (Litman, 1996).

Los tiburones se ubican en el superorden Euselachii el cual está conformado por cuatro órdenes, 8 familias y 350 especies aproximadamente. Dentro del orden Carcharhiniiformes, que se conforma de 32 especies, se encuentran las dos especies que fueron estudiadas en este trabajo.

De acuerdo con Compagno (1984b), la ubicación taxonómica de las especies estudiadas es:

Phylum: Chordata

Subphylum: Vertebrata

Superclase: Gnastostomata

Clase: Elasmobranchimorphi

Subclase: Chondrichthyes

Infraclase: Elasmobranchii

Superorden: Euselachii

Orden: Carcharhiniiformes

Familia: Carcharhinidae

Género: *Carcharhinus*

Especie: *C. falciformis* (Bibron, 1839)

Genero: *Sphyrna*

Especie: *S. lewini* (Griffith y Smith, 1834)

### **Pesquería de los tiburones**

En México se han observado aproximadamente 100 especies de tiburones, de las cuales 80 presentan reportes de información científica. De éstas, 40 son explotadas de forma artesanal por medio de palangres y/o de forma incidental para comercializar su carne (INP, 2001) y en ocasiones sólo para la venta de sus aletas.

México ocupa el sexto lugar de los países que explotan elasmobranquios y la pesquería de tiburones se encuentra en el 12º lugar de la lista de las pesquerías de mayor explotación en nuestro país. (FAO, 1994a; <http://www.sagarpa.gob.mx>).



Los volúmenes más altos de captura de tiburón y cazón se registraron en los años de 1990 y 1993 con un promedio de 36, 484 toneladas y en los años de 1997 y 1998 se reportaron los volúmenes más bajos con un promedio de 24,301 toneladas (Figura 5), disminución debida a la posible influencia del fenómeno “El Niño”. En la Figura 5 se muestra una tendencia relativamente estable de la captura de tiburón y cazón en nuestro país. Sin embargo se observa que su productividad puede decaer fuertemente de un año a otro, para recuperarse lentamente (<http://www.sagarpa.gob.mx>).

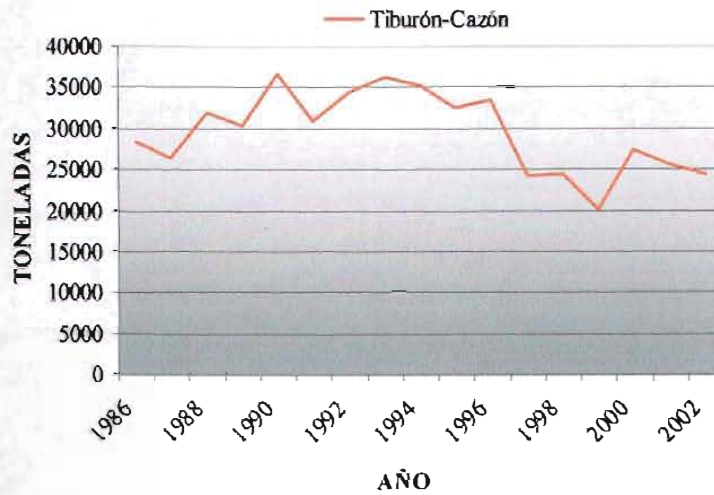


Figura 5.- Productividad histórica de pesca de tiburón y cazón en toneladas, de 1986 a 2002 a nivel nacional, datos tomados del anuario de pesca 2002 de SAGARPA (<http://www.sagarpa.gob.mx>)

El 60% de captura nacional de tiburón se realiza en el Pacífico y el 40% restante proviene del Golfo de México. En el Pacífico, las zonas de mayor volumen de captura son el Golfo de California y el Golfo de Tehuantepec, probablemente debido a que en estas zonas oceánicas, las mezclas de corrientes producen surgencias y generan sitios de alimentación para organismos de los que se alimentan los tiburones. (Kimley *et al.*, 2005)

La producción de tiburón-cazón en el Pacífico mexicano desde 1968 ha logrado una producción anual de 5,000 a 15,000 toneladas alcanzadas en 1975 (Solórzano *et al.*, 1982). De 1976 a 1999 se obtuvo un promedio anual de 19,391 t con un máximo de 25,500 t en 1981; durante las últimas dos décadas de 1980-1989 y 1990-1999 se obtuvo un promedio de 19,367 t y 20,217 t respectivamente (Castillo-Genis, 1992; SEPESCA, 1995; SEMARNAP, 2000), volúmenes de captura que permiten que esta pesquería se ubique dentro las primeras doce más importantes del país.

En México la captura de tiburón se realiza principalmente de forma artesanal, palangrera, por pesca incidental en la pesquería del atún, en barcos calamareros y en la pesca de picudos. Debido a que la pesquería de tiburón y raya es principalmente de tipo artesanal, existen pocos datos sobre las especies de tiburones más capturadas. Además el tipo de procesamiento de los organismos, donde se les cortan cabeza y aletas para su comercialización, impiden en algunos casos dicha identificación. Sin embargo, algunos programas del Instituto Nacional de Pesca como es el "Proyecto Tiburón" y el "Programa de pelágicos menores y mayores" de los Centros Regionales de Investigación Pesquera, han logrado mantener algunos registros, donde se reporta la extracción de ocho especies principales. Vélez *et al.*, (1989) registraron que el 64% de las capturas de las embarcaciones palangreras en los años 1986 – 1987 en el litoral del Pacífico Mexicano correspondió al tiburón zorro (*Alopias vulpinus*) seguido de la captura de organismos del género *Carcharhinus*; Santana-Hernández *et al.*, (1998) en un análisis de la captura de embarcaciones palangreras, encontraron también que los géneros *Alopias* y *Carcharhinus* tienen la más alta incidencia de captura. Los reportes de la Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca, (2000), registran que las especies de mayor importancia comercial en el Pacífico por su captura son el tiburón Zorro (*Alopias pelagicus*), el tiburón volador (*Carcharhinus limbatus*), el tiburón tunero o sedoso (*C. falciformis*) y organismos del género *Sphyrna* como el tiburón martillo (*Sphyrna lewini*) que es la más capturada. De manera general se puede decir que los tiburones pelágicos de mayor explotación en el Pacífico pertenecen a los géneros *Carcharhinus*, *Alopias*, *Isurus* y *Sphyrna* (INP, 2000), ya que su distribución abarca todas las regiones tropicales lo que permite encontrarlas desde lugares cercanos a los 30° latitud norte hasta 10° latitud sur.

Las características de reclutamiento pesquero de estas especies no están restringidas a una talla, ya que por falta de regularización y por efecto de pesca furtiva, se capturan organismos maduros desde los 60 cm. de longitud total (LT), así como organismos inmaduros de menos de 60 cm. LT. Estos organismos son conocidos comúnmente como cazones, aunque en ocasiones pertenezcan a etapas juveniles de especies de mayor tamaño (Applegate *et al.*, 1993).

Los tiburones son organismos con alta vulnerabilidad a la sobreexplotación por presentar tasas muy bajas de reproducción, madurez sexual tardíamente, lento crecimiento y largos periodos de gestación (Martin, 1990; Martin *et al.*, 1992). Lo que ha propiciado que las poblaciones de tiburones, generalmente de aquellas especies que se encuentran sujetas a explotación intensiva puedan estar en riesgo de pérdida considerable de diversidad genética como es el caso de las especies *Alopias vulpinus* y *Isurus oxyrinchus*. Por ello es importante el estudio

de sus poblaciones para establecer criterios de administración y lograr estrategias de captura que permitan la conservación de la diversidad genética en las poblaciones explotadas y la sustentabilidad en las pesquerías (FAO, 1994a y 1994b; FAO, 1999; INP, 2001). Existen también especies que se encuentran en estado de máximo rendimiento sostenible como el caso de *Carcharhinus falciformis*, *Carcharhinus limbatus* y *Sphyrna lewini* entre otros, ya que sus índices de abundancia son satisfactorios en relación con las especies anteriores de acuerdo al informe de la Secretaria del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (2000) y a la FAO, (1999) que los ubican en la categoría 3 de pesca, como especies con producciones en aumento. Sin embargo aun estas especies, son vulnerables a la sobrepesca por sus características biológicas.

En este trabajo se eligieron dos especies de tiburones del Pacífico mexicano, *Carcharhinus falciformis* y *Sphyrna lewini*, organismos de gran importancia pesquera en nuestro país, a fin de aportar información sobre su estructura genética poblacional y promover la incorporación de esta información a las políticas de administración pesquera racional para contribuir a su conservación y manejo.

### **El tiburón sedoso**

El tiburón sedoso pertenece al orden de los Carcharhiniformes, que está formado por 3 familias, 9 géneros y 32 especies. En el género *Carcharhinus* se ubican la mayor cantidad de especies de tiburones (Compango, 1984b; INP, 1996).

El tiburón sedoso (*Carcharhinus falciformis*), también conocido como tunero, por su alta incidencia en la pesquería del atún (Bibron, 1841), es frecuentemente confundido por los pescadores con *C. limbatus* (Castro-Aguirre, *et al.*, 2001).

Dentro de sus características diagnósticas el tiburón sedoso presenta un cuerpo alargado y poco robusto; el hocico es redondeado y muy largo, casi tanto como la primera aleta dorsal, sus ojos son moderadamente grandes, cubiertos con una membrana nictitante, elemento útil en la identificación del género. El origen de la primera aleta dorsal se encuentra por detrás de las puntas traseras libres de las aletas pectorales y posee una cresta entre las aletas dorsales, a la cual se le conoce como borde interdorsal, característico de algunas de las especies del género *Carcharhinus*. La segunda aleta dorsal es notablemente baja, en posición opuesta a la anal. Ambas aletas tienen un filamento posterior bastante largo, característico de la especie. Los organismos juveniles, poseen un color gris claro, mientras que los adultos presentan un color oscuro desde el dorso hasta las partes laterales. La parte ventral es generalmente blanca a grisácea

y la punta de la primera aleta dorsal es oscura sin llegar a ser negra (Compagno *et al.*, 1989) (Figura 6).

Su principal alimento lo constituyen los peces (54%), los cefalópodos (31%) y los crustáceos (15%) (Mendizábal, 1995), factor que influye en la distribución de este organismo. Las tallas de esta especie generalmente se encuentran entre los 200 y 240 cm, en algunos casos llegan a superar los 300 cm y se ha encontrado organismos con tallas de aproximadamente de 330 cm.

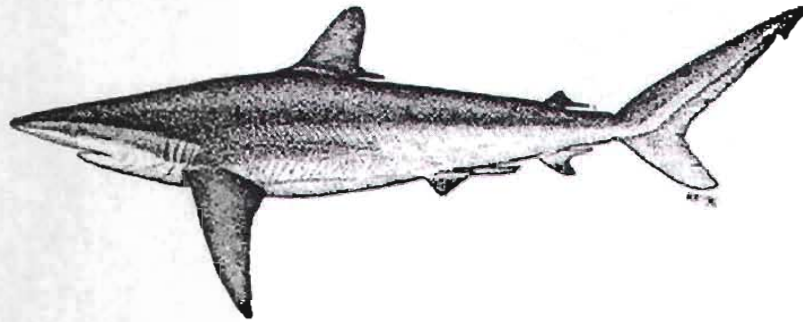


Figura 6.- Tiburón Sedoso (*Carcharhinus falciformis*), (Bibron, 1839) (<http://www.FAO.org/>)

La distribución de *Carcharhinus falciformis* se ubica en áreas costeras de los trópicos y alcanza hasta los 40° N y los 40° S, cerca del borde de la plataforma de las islas y los continentes. Ocasionalmente se encuentra en áreas costeras a profundidades de hasta 18 m y en mar abierto desde la superficie hasta profundidades de 500 m y en temperaturas de 23 a 24° C. Su distribución mundial se muestra en la Figura 7.

Su reproducción es vivípara, con tiempo de gestación de doce meses aproximadamente y con una fecundidad de 2 a 12 embriones por preñez en relación proporcional a la talla (Bonfil *et al.*, 1993). Los neonatos al nacer generalmente tienen un tamaño aproximado de 70 a 85 cm; Son paridos en aguas abiertas y presentan un rápido crecimiento (Breder y Rosen, 1966). Se ha observado que los juveniles se mantienen en las zonas de alimentación y no presentan desplazamientos amplios como los adultos (Compagno, 1984b; Claro, 1994). Los machos maduran sexualmente entre los 185 y los 220 cm mientras que las hembras entre 225 y 245 cm (Branstetter, 1987; Bonfil *et al.*, 1993). La longevidad estimada es superior a los 14 años, con talla y peso máximo observados de 210 cm. de Longitud Furcal (LF) y de 101 Kg. Bonfil *et al.*, (1993) han determinado que estos organismos alcanzan edades de hasta 23 años en las hembras y de 21 años en los machos en las costas de Yucatán. La proporción de sexos es de 1: 1.1 a 1:1.37

de acuerdo a las diferentes tallas registradas, pero de manera global se considera 1:1 (machos–hembras).

Su período máximo de reproducción es de mayo a junio en la zona oceánica entre Zihuatanejo y el Golfo de Tehuantepec, con otro punto de intensa reproducción frente a Puerto Vallarta, durante el mes de agosto, por el aumento de la termoclina y la isoterma superficial de los 29° C. (INP, 1996). La mayor abundancia de hembras preñadas también se observa entre mayo y junio, entre Zihuatanejo y el Golfo de Tehuantepec; donde se registró la talla mínima de preñez de 130 cm. de LF, a la edad de dos años. Alcanzan una proporción anual de preñez del 50% a los 160 cm a la edad de cuatro años y un 80% a los seis años (INP, 1996).

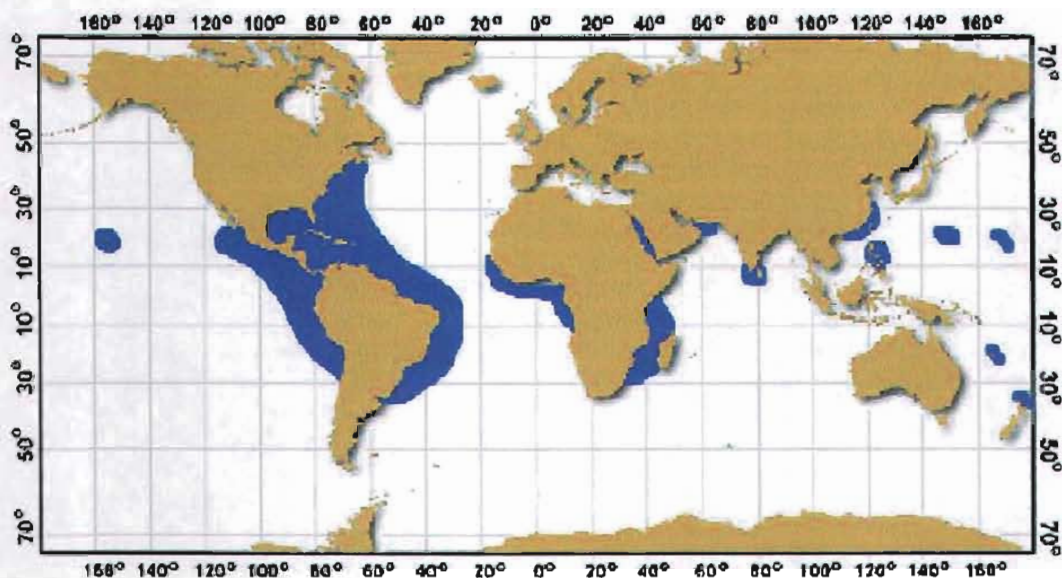


Figura 7.- Distribución mundial de *Carcharhinus falciformis*, tomada de FAO, (2001).

De su dinámica poblacional se conoce poco. Los muestreos en la pesca palangrera en el océano Pacífico oriental y central muestran que es más abundante en las zonas costeras que en la zona oceánica. Sin embargo se ha observado una segregación por tallas; donde los juveniles se concentran en áreas de crianza cercanas a la costa y los adultos en la zona oceánica (Compagno, 1984b).

*Carcharhinus falciformis* es una de las especies más abundantes en las capturas de palangre en la Zona Económica Exclusiva (ZEE) en el Pacífico Mexicano y es una de las tres especies de tiburones pelágicos más capturadas por su abundancia tanto en costera como oceánica del Pacífico (INP, 1996, 1995). Los registros de captura en el Pacífico de México son reportados por Kato *et al.* (1967) y Kato y Carvallo (1967), donde se reportan capturas en las zonas costeras,

oceánicas y alrededor de las Islas del Océano Pacífico Oriental, incluyendo las del Pacífico Mexicano. Kato (1964) menciona que es una especie incidental dominante en la captura de atún y se le puede localizar en las Islas Socorro, San Benedicto y Roca Partida donde se han registrado ejemplares con tallas de 140 a 165 cm con un promedio de 152 cm de LT.

En las capturas de embarcaciones tiburonerías menores al sur de Nayarit, se reportan tallas mínimas de 87 cm y máximas de 225 cm LT, con una abundancia del 50% de todas las especies durante octubre a marzo (Corro, 1997). En Puerto Madero, Chiapas, embarcaciones tiburonerías menores reportan una proporción del 43.24% de captura de *C. falciformis*, por lo que se considera la principal especie que sostienen la pesquería en la región del Golfo de Tehuantepec, con mayor abundancia en marzo, octubre y noviembre, cuando alcanza una captura del 80% con organismos de 50 cm. a 340 cm LT. (Castillo-Genis *et al.*, 1999).

En el Océano Pacífico centro y sur de México, el mayor índice de abundancia de captura por lance de pesca, se da frente a Puerto Vallarta, Jalisco, durante julio y agosto, el menor se presenta de la Boca del Golfo de California hasta el sur de Manzanillo, Colima, de enero a abril y una captura moderada de mayo a agosto frente al Golfo de Tehuantepec. Debido a que en estas zonas del Pacífico mexicano existe una gran cantidad de corrientes que convergen en ciertos puntos, las migraciones de esta especie se han relacionado con el desplazamiento de la isoterma de los 29° C al norte. (Vélez *et al.*, 1989; Mendizábal *et al.*, 1990).

De acuerdo a lo anterior, en México la SAGARPA a través del INP a partir de 1999 ha propuesto una veda a la pesca con redes de enmalle y palangre tiburonero, de principios de mayo a mediados de junio frente al Golfo de Tehuantepec, así como a todas las embarcaciones palangreras oceánicas con redes de enmalle que en este período deben operar por fuera de las 50 millas náuticas a partir de la línea de costa y 30 millas náuticas alrededor de las Islas Revillagigedo (Mendizábal, 2000).

### Tiburón martillo

De manera general se llaman tiburones martillo a las especies del género *Sphyrna* aunque debido a algunas características particulares en el tamaño, color y forma de su cabeza en forma de martillo, se les asigne otro nombre.

El tiburón *Sphyrna lewini* se conoce como tiburón martillo o cornuda prieta, se caracteriza por una hendidura en la parte frontal de la cabeza y por ser curva la parte frontal del martillo. El origen de la primera aleta dorsal se encuentra por delante de la inserción de las aletas pectorales, su segunda aleta dorsal es pequeña, menor que la altura de la anal, con margen posterior

ligeramente cóncavo; sus aletas pélvicas no son falcadas y con márgenes posteriores estrechos y apenas cóncavos. Su aleta anal, es más larga que la segunda dorsal y su base es del 4.3 al 6.4 % del largo total, con un origen por delante de la segunda dorsal. Estos organismos cuentan con 174 a 209 centros vertebrales. Presentan una coloración gris marrón a café en la parte dorsal y en los flancos, las puntas pectorales son oscuras a negras y su parte ventral es blanca (Compagno, 1984b; Carrera, 1991).

La talla de los adultos puede alcanzar los hasta 420 cm de LT como máximo, pero las longitudes más comunes son de 300 cm. (Compagno, 1984b; Cervigón *et al.*, 1992). Los machos alcanzan por lo menos 295 a 301 cm. y las hembras son un poco mayores, de 309 a 331 cm. de LT. (INP, 1996; Chen *et al.*, 1990) (Figura 8).

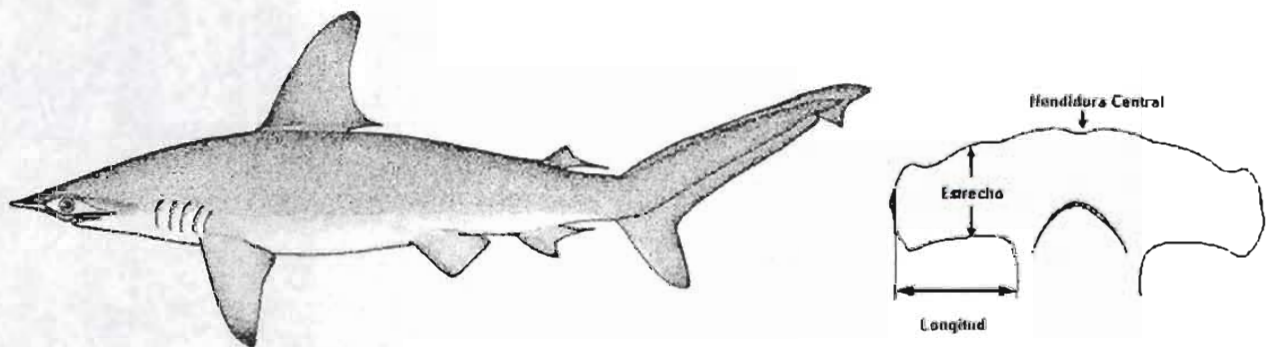


Figura 8.- Tiburón Martillo (*Sphyrna lewini*), tomado de (<http://www.FAO.org/>)

Este organismo se alimenta principalmente de peces como sardina (*Sardinops caeruleus*, *Scomber japonicus* y *Synodus evermanni*) y anchoveta, (*Engraulis mordax*), así como de algunos cefalópodos principalmente de *Dosidicus gigas*, *Stenoteuthis oualaniensis* *Abralopsis affinis* *Abralopsis falco* y *Onchotheuthis banksii* (Aguilar-Castro y Galván-Magaña, 2002).

Los tiburones *S. lewini* habitan zonas pelágicas, costeras y en algunas ocasiones regiones semi-oceánicas desde los 46° N a los 36° S. generalmente en aguas tropicales, así como en aguas profundas adyacentes a la plataforma continental. Se pueden encontrar en aguas superficiales y hasta profundidades de 275 m. (Smith, 1997). Los organismos juveniles generalmente se encuentran cerca de la costa y en algunas etapas de su vida llegan a formar cardúmenes, pero en la edad adulta se pueden encontrar solitarios, en cardúmenes (Compagno, 1984b; Compagno, 1998) o en parejas (Cervigón *et al.*, 1992).

Se han registrado algunas migraciones de grandes cardúmenes con dirección hacia altas latitudes durante el verano en el sureste de África (Compagno, 1984b), de igual forma se ha registrado gran abundancia de estos organismos en el Golfo de California durante el verano atribuido a la presencia de alimento en la zona (Kimley *et al.*, 2005). No se conoce un patrón determinado de migración para esta especie.

La distribución de estos organismos es cosmopolita en costas cálidas y templadas que se muestra en la Figura 9. (Compagno, 1984; Gilbert, 1967; Menni, 1976 Menni, *et al.*, 1986; Carrera, 1991).

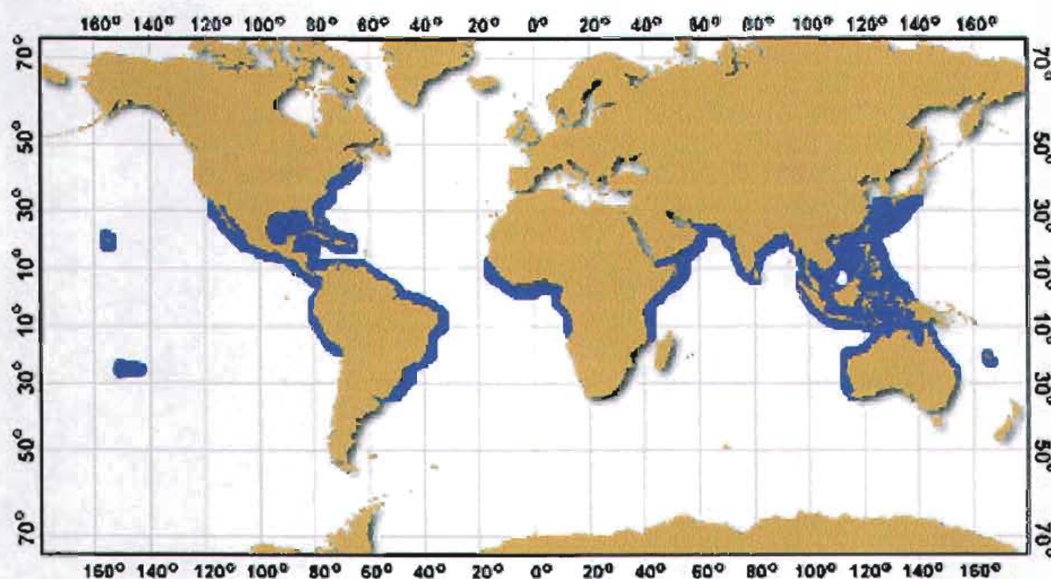


Figura 9.- Distribución mundial de *Sphyrna lewini*, tomada de FAO, (2001).

El tiburón *Sphyrna lewini* tiene una reproducción vivípara con saco vitelino, las hembras pueden producir de 10 a 48 embriones por preñez, aumentando el número de crías con la longitud total de la hembra (Compagno, 1984b; Anislado-Tolentino *et al.*, 2001). Las tallas de los neonatos son de entre 42 y 45 cm, registrándose longitudes de 48 cm para hembras y de 45 cm para machos en las costas del Pacífico mexicano (Anislado-Tolentino *et al.*, 2001), con períodos de gestación de 10 meses y una proporción de sexos de 1:1.6 (machos:hembras) y en las costas de Michoacán de 1:1.2 (Compagno, 1984b; Carrera, 1991; Anislado-Tolentino *et al.*, 2001). Las tallas de primera madurez sexual para machos son entre los 140 y 174 cm. de LT y para las hembras, alrededor de los 199 a 213 cm (Compagno, 1984b; Anislado-Tolentino *et al.*, 2001).



## Estudios genéticos y de estructura poblacional en tiburones.

Algunos estudios genéticos realizados en tiburones se han enfocado a la identificación de especies, ya que su gran similitud morfológica impide definir fácilmente su ubicación taxonómica y en consecuencia la composición de las capturas. En estos estudios se han usado principalmente marcadores como aloenzimas, que permiten una discriminación de especies con mayor sencillez y rapidez que otras técnicas de mayor costo. También se han usado marcadores mitocondriales como *citocromo b* analizado con la técnica de RFLP's, que permite la identificación entre especies de tiburones, principalmente del género *Carcharhinus* de la costa del Atlántico (Heist y Gold, 1999). Asimismo, se han utilizado algunas regiones mitocondriales, como la ribosomal, mediante técnicas como la PCR multiplex (Polimerase Chain Reaction, Reacción en cadena de la polimerasa), que permite distinguir entre *C. Plumbeus* y *C. obesus* (Pank *et. al.*, 2001).

Los estudios anteriores son de gran importancia para determinar la composición exacta de las capturas y de los volúmenes de cada especie de elasmobranquios en las diferentes zonas de explotación para una mejor administración del recurso y para su conservación poblacional.

Otros estudios genéticos realizados en tiburones son los poblacionales, que analizan y evalúan la variación genética y determinan el grado de su estructura poblacional. Estos trabajos son escasos en comparación con la gran diversidad de especies de tiburones, ya que sólo se han realizado en especies y regiones particulares; como el estudio de Lavery y Shaklee (1989) en el que encontraron que no existen diferencias significativas en las frecuencias alélicas de las aloenzimas de *C. Sorrah* y *C. Tilstoni* en la parte norte de Australia. Heist *et al.*, (1995) realizaron un análisis en muestras de la especie de *C. Plumbeus* provenientes del Atlántico y del Golfo de México mediante aloenzimas y DNA mitocondrial (mtDNA), para encontrar que no hay diferencias significativas en la distribución de las frecuencias alélicas y entre los haplotipos analizados, por lo que sugieren que esta especie no presenta estructura genética en la región cercana a la península de Florida. Estos mismos autores estudiaron la especie *Rhizoprionodon terranovae* en la misma zona del Atlántico que el estudio anterior y no encontraron estructura poblacional mediante análisis de mtDNA (Heist *et al.*, 1996b). Heist *et al.*, (1996a) encontraron diferencias significativas en las frecuencias de haplotipos entre organismos del Atlántico y Pacífico de la especie *Isurus oxirhincus* mediante un análisis de mtDNA, basados en RFLP's.

Existen otros estudios en los que se ha encontrado diferencias significativas tanto en las frecuencias alélicas como en haplotipos, como el caso de *Squatina californica* en la que se encontró, que presenta estructura genética poblacional local en las Islas Channel en California, mediante un análisis de aloenzimas (Gaida, 1997). Y el trabajo de Ward y Gardner (1997) informa

de diferencias en las frecuencias alélicas de aloenzimas y de haplotipos en *Mustelus antarcticus* de la parte sur y este de Australia.

De las diferentes técnicas que analizan la variación en el DNA, las más representativas son: los RFLP's, VNTR's, AFLP's, microsatélites, RAPD's y SSCP's. De estas se decidió utilizar las dos últimas debido a que permiten detectar niveles aceptables de variación genética presente en una gran cantidad de organismos además de su facilidad de implementación y bajo costo (Shaffer *et al.*, 2000; Angers *et al.*, 2000).

Con la técnica de RAPD's se puede evaluar la variación tanto intra como interpoblacional (Smith *et al.*, 1997; Silva y Russo, 2000) lo cual permite determinar con buen grado de certidumbre la existencia de estructura poblacional de los organismos. Esta técnica consiste en analizar la variación del DNA genómico mediante PCR, que utiliza una sola secuencia para la amplificación aleatoria de fragmentos de diferentes tamaños de DNA, que son considerados loci y cuya presencia o ausencia corresponde a un polimorfismo. Esta técnica tiene la ventaja que puede realizar análisis multiloci en una gran cantidad de organismos (Aubert y Lingtner, 2000; Exadactylos *et al.*, 2003).

La técnica de SSCP's permite una evaluación de la variación interpoblacional ya que tienen la ventaja de realizar un estudio de mayor resolución (Orita, 1989; Lessa y Applebaum, 1993) por el análisis a nivel de secuencias. La metodología de SSCP's detecta estructuras secundarias de DNA de cadena sencilla, para la evaluación de polimorfismos en diferentes marcadores o fragmentos específicos de menos de 400 pb, mediante la desnaturalización de DNA de doble cadena a 95° C y su inmediata reestructuración a 4° C, en la que se presenta la conformación de estructuras secundaria de cadena sencilla (Orita *et al.*, 1989). Una vez detectados los polimorfismos o variantes del fragmento, éstos pueden secuenciarse y presenta la ventaja de que se pueden conocer las secuencias de toda una colección de organismos sin el costo de la secuenciación particular de cada fragmento de todos los individuos de cada muestra. El estudio de secuencias permite obtener una gama muy amplia de información como tamaños poblacionales, diferenciación sexual de desplazamiento en el caso de usar marcadores mitocondriales, evaluación de tasas de mutación, entre otras, aparte de la evaluación de variación nucleotídica y de determinación de estructura genético-poblacional (Sunnucks *et al.*, 2000).

### **Características Oceanográficas del Pacífico Mexicano**

El Pacífico Mexicano se ubica en el Pacífico Oriental Tropical (POT). Esta zona del Pacífico presenta importantes Corrientes y Contracorrientes Oceánicas como la Corriente de

California (CC), la Corriente Norecuatorial (CNE) la Corriente Costanera de Costa Rica (CCC) y la Contracorriente Norecuatorial (CCE). Estas corrientes de acuerdo a la época estacional y a la zona climática de la geografía, presentan condiciones complejas y variables que pueden observarse en las costas del Pacífico mexicano y que pueden modificar la distribución y dispersión de los recursos pesqueros (De la Lanza, 1991).

La Corriente de California se presenta en la costa de Baja California de los 18° N, con dirección al sur, la constituye un flujo lento ya que debajo de esta corriente, corre otra en sentido opuesto que se acentúa la segunda mitad del año. La mayor fuerza de la CC se observa en la primera mitad del año donde puede desplazarse hasta los 15° N cerca de el estado de Chiapas (Wyrski, 1965).

La Corriente Norecuatorial está alimentada por la CC y por masas de aguas del POT. Debido a que en la primera mitad del año la CC tienen su mayor fuerza, es de marzo a junio la principal afluyente de la CNE y se le encuentra de los 10 a los 11.5° N y de julio a diciembre la principal contribución es por las aguas del POT y la presencia de la CCE, originando que la CNE se mantenga en los 110° O y de los 15 a los 20° N (del Golfo de Tehuantepec a Cabo Corrientes) (Cromwell y Bennett, 1959).

También la Corriente Costanera de Costa Rica (CCC), es una corriente que corre de sur a norte del Pacífico mexicano de julio a diciembre. Procede de la zona frente al Domo de Costa Rica, corre a lo largo de la Costa de Centro América y de México hasta llegar a Cabo Corrientes, alejándose de la costera una vez que pasa el Golfo de Tehuantepec e incorporándose poco a poco a la CNE.

La Contracorriente Norecuatorial se desplaza desde los 140° W. hacia el Este, entre los 4° y 12° latitud norte, su anchura así como su distribución longitudinal varía a lo largo del año. En la segunda mitad del año puede desplazarse hasta los 100° W, lo cual es un aspecto importante para las poblaciones de organismos de la zona cercana al Golfo de Tehuantepec.

La temperatura promedio anual de las aguas superficiales en el Pacífico mexicano fluctúa de manera general de los 26 a los 28° C, presentando un incremento hacia el sur. Cuando las aguas superficiales subtropicales ingresan al Golfo de Tehuantepec, se originan un aumento de temperatura en esta región de 3 a 4° C.

El Golfo de Tehuantepec presenta una distribución heterogénea de la temperatura superficial del agua, debido a la presencia los vientos. En invierno las temperaturas son bajas y existe un desplazamiento de aguas frías a zonas circunvecinas. En verano las temperaturas son relativamente más altas oscilando entre los 28 y 30° C y no existe un gran desplazamiento.

En el Golfo de Tehuantepec las Corrientes Superficiales tienen una dirección hacia el Oeste frente a la costa de Salina Cruz, Oaxaca durante casi todo el año. Estas corrientes se pueden desplazarse hacia el centro del Golfo de Tehuantepec, teniendo un proceso de circulación de la parte sur a la parte norte y viceversa.

Según Garfiel *et al.*, (1983) en el Pacífico oriental tropical se encuentran tres masas de aguas superficiales y dos subsuperficiales:

- Agua Superficial Tropical
- Agua Superficial Subtropical
- Agua Superficial de la Corriente de California
- Agua de la Corriente Norecuatorial
- Agua Subsuperficial Subtropical

La acción de estas masas de aguas, ocasionan que en la parte norte del Pacífico mexicano en abril, se presenten las temperaturas más cálidas y de menor salinidad y que en la región más al norte del ecuador se den temperaturas de 11 a 14 °C con salinidades un poco más altas que fluctúan de 34.6 a 34.82‰. En la parte sur del Pacífico mexicano se observa más claramente el enfrentamiento de la Corriente de California y la Corriente Norecuatorial (CEN), donde la primera presenta temperaturas frías y de baja salinidad, mientras que la segunda es de aguas cálidas y salinas. (Burke *et al.*, 1983). El límite entre estas dos corrientes se le conoce como frente de Doldrum que se caracteriza por un ligero descenso horizontal en la salinidad y densidad, con temperatura estable.

Según Wyrki (1965) se presentan tres situaciones básicas de la circulación de corrientes en el Pacífico mexicano (Figura 10):

- De Agosto a diciembre la CNE se presenta en su máximo desarrollo, la Contracorriente fluye al domo de Costa Rica dentro de la CCC y se introduce a la CNE en los 10 y 20 ° N. La CC se aleja de la costa y se introduce en la CNE en los 20° N, siendo esta fase la más estable y la más representativa.
- De febrero a abril, la CC es fuerte y aporta la mayor parte del agua de la CNE. La Contracorriente Norecuatorial CCE desaparece en este periodo.
- De mayo a junio se forma la CCE, su mayor cantidad de agua se mueve al norte y se une a la CCC. La CC es aparentemente fuerte y llega hasta el sur, sin embargo se debilita transcurriendo el año y la CNE tiene aportes de agua del Pacífico Oriental Tropical.

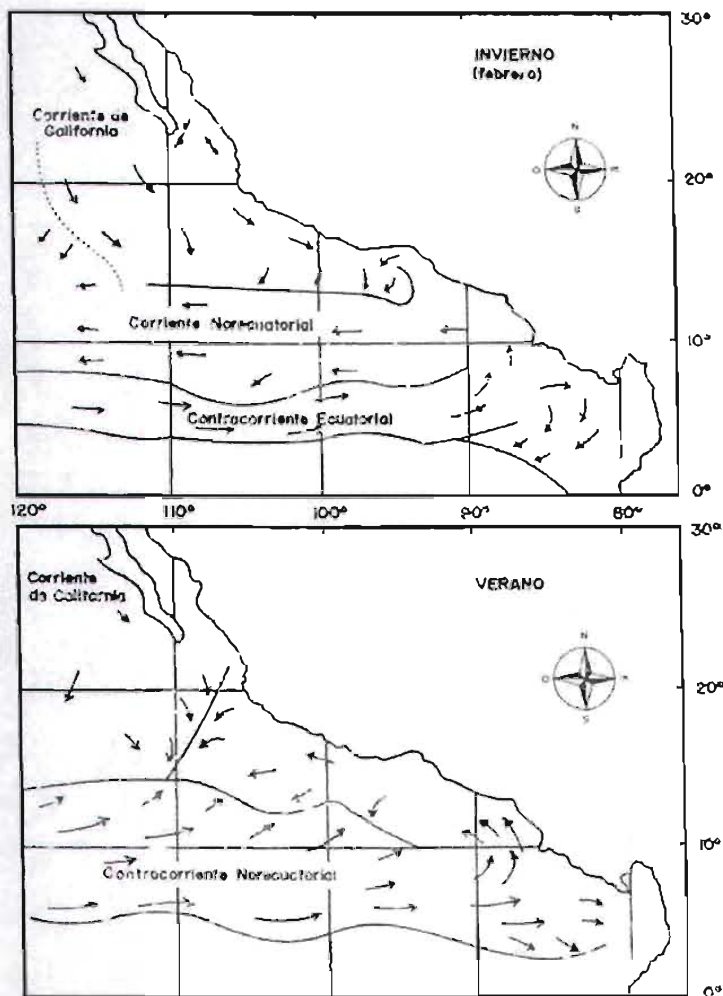


Figura 10.- Características Oceanográficas en invierno y verano de las corrientes superficiales del Pacífico mexicano, tomado de Cromwell y Bennett (1959).

El fenómeno de “El Niño” que es la alteración de las aguas cálidas en el Pacífico Este y de la Corriente Subsuperficial de agua fría, que incrementa la temperatura de las masas de aguas superficiales y las hace más profundas, originando una acumulación de aguas cálidas en el Pacífico Este e incrementando el nivel del mar. Cuando estas características se presentan el POT, la CC gira al Oeste, se hace más débil y se cambia por una Contracorriente débil (Quinn 1974), la CNE también se debilita y se desplaza a los polos (Wyrcki 1975) mientras que la CCE se ensancha latitudinalmente (Wyrcki, 1973, 1975). Este proceso oceanográfico es de gran importancia en el desplazamiento de corrientes y masas de agua, así como en el movimiento de organismos acuáticos como los tiburones, ya que se ha visto que este fenómeno modifica la distribución de los organismos y por lo tanto altera la producción pesquera.

Debido a la gran importancia de los tiburones en nuestro país, a sus características de vulnerabilidad a la sobrepesca, a los posibles factores biológicos y geográficos que pueden estar influyendo en el arreglo poblacional de estos organismos, como las corrientes y a que existen pocos estudios sobre la genética poblacional de los mismos, el objetivo de este trabajo es:

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la estructura genética poblacional en muestras de tiburones *Carcharhinus falciformis* y en *Sphyrna lewini* del Pacífico mexicano mediante dos técnicas moleculares, RAPD's y SSCP's.

### **Objetivos particulares**

- ◆ Determinar la diversidad genética de las dos especies de tiburones mediante dos diferentes marcadores, RAPD's y ctb mtDNA.
- ◆ Examinar la divergencia poblacional en ambas especies mediante los dos marcadores.
- ◆ Evaluar si existe aislamiento por distancia.
- ◆ Determinar una filogenia de ambas especies en contexto del orden Carcharhiniformes mediante un fragmento de *citocromo b* mitocondrial.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material Biológico

La obtención del material biológico se realizó en campos pesqueros a lo largo del Pacífico Mexicano, durante 2001, 2002 y 2003. En algunos casos, las colectas se realizaron en dos puntos diferentes del mismo estado en el mismo año de colecta, para tratar de obtener un número muestral aceptable de organismos, como en el caso de la población de Sinaloa, compuesta por organismos colectados en Barra de Piaxtla, Mazatlán y Tecapan. Algunos de los muestreos se realizaron con la ayuda de personal del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR) de la Paz, Baja California Sur; del CRIP de Colima y de Mazatlán, como personal del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología y pescadores de cada región, a quienes se les solicitó que los organismos llegaran completos a la costa para su identificación, la cual fue realizada con las claves de Compango (FAO, 1984), Grace M. (NOAA, 2001) y con la guía rápida de SAGARPA (2001).

Una vez identificados los especímenes, se extrajo una porción de tejido muscular de 3 cm<sup>3</sup> a cada individuo analizado. Las muestras fueron colocadas en tubos con un amortiguador de DMSO (DMSO Sigma D-5879, EDTA 0.25M pH 8.0, NaOH 30gr/100ml.) y se transportaron a una temperatura aproximada de 10° C al Laboratorio de Genética de Organismos Acuáticos del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología en Ciudad Universitaria, donde se almacenaron a temperatura ambiente para posteriormente ser procesadas. El tamaño de las muestras varió en cada localidad, siendo de entre ocho a 50 organismos por punto de muestreo; a cada muestra, se le asignó una clave de localidad geográfica (Tabla 1 y Figura 11).

Tabla 1.- Nomenclatura de muestras colectadas, número de organismos por especie que conforman cada muestra y lugar de colecta.

Muestra	Clave	Especie	Año de colecta	Lugar de colecta	Totales para cada localidad
Baja California Sur	BCS	<i>C. falciformis</i>	2001	Punta Lobos	30
Colima	COL	<i>C. falciformis</i>	2003	Manzanillo	30
Oaxaca	OAX	<i>C. falciformis</i>	2002	Puerto Escondido	30
Chiapas	CHIAP	<i>C. falciformis</i>		Puerto Madero	55
Baja California Sur	BCS	<i>S. lewini</i>	2001	Sauzoso	20
Sinaloa	SIN	<i>S. lewini</i>	2002	Mazatlán, Barras de Piaxtla y Teacapan	25 8
Nayarit	NAY	<i>S. lewini</i>	2003	San Blas	30
Chiapas	CHIAP	<i>S. lewini</i>	2003	Puerto Madero	9
<b>Total</b>	6 poblaciones	2 especies		10 localidades	237 organismos





Figura 11.- Ubicación geográfica de los puntos de muestreo para *C. falciformis* y *S. lewini* en el Pacífico Mexicano.

## Procesamiento de muestras

### Extracción de DNA

La primera parte del procesamiento de las muestras consistió en la extracción de DNA de cada una de las muestras de tejido de tiburón, siguiendo el protocolo de extracción del KIT Promega (A1125) (Ver anexo A)

### Cuantificación de DNA

Uno de los requerimientos para la técnica de RAPD's, es el conocimiento previo de la concentración de DNA que se utiliza en cada una de las reacciones de PCR, ya que dependiendo de la concentración y calidad del DNA el número de regiones a amplificar puede variar, por lo

que se cuantificó dicha concentración, de cada una de las muestras, con un fluorómetro Hoefler DyNA Quant™ 200.

Las lecturas se realizaron de acuerdo al protocolo de operación, que indica utilizar una solución de ensayo con 10  $\mu$ L. de solución Hoechst (No. de catálogo 3258), 10 ml. de TNE 10X, (100 mM Tris, 10 mM EDTA, 2 M NaCl) y 90 mL. de agua destilada filtrada y estéril para intervalos de lectura de 10 a 100ng/ $\mu$ L (unidades de lectura del fluorómetro) y calibrando el fluorómetro con una solución de referencia de DNA (Calf thymus DNA standard 80-6227-06). En la obtención de cada lectura se utilizaron 2 mL de la solución de ensayo adicionando a estas 2  $\mu$ L del DNA a cuantificar.

La concentración de DNA en cada stock se corroboró mediante la electroforesis de 5  $\mu$ L de cada uno de estos stocks, en geles de agarosa al 1%, técnica que también ayudo a conocer la calidad de DNA obtenida de las extracciones. Se consideró DNA de buena calidad cuando el corrimiento no se mostraba barrido y se mostraba una banda de alto peso molecular, bien definida, con buena intensidad y compacta. (Figura.12)

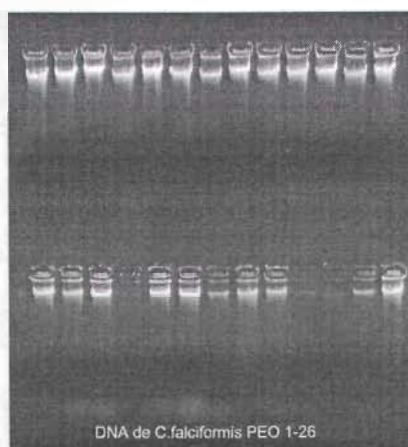


Figura 12.- DNA genómico de alto peso molecular de tiburones extraído mediante el Kit Promega.

### RAPD's

Una vez conocida la concentración de DNA en cada stock de muestras, se realizaron ensayos para determinar la concentración óptima en la realización de PCR y obtención de RAPD's (Ver Anexo B). Los ensayos consistieron en probar diferentes diluciones de DNA de 0.5, 0.7, 1.0, 1.2 y 1.5 ng/ $\mu$ L en reacciones de PCR, determinando como concentración óptima para la amplificación, la que generara fragmentos bien definidos y consistentes. Las reacciones de

PCR para la obtención de RAPD's se realizaron con una concentración de DNA a 0.7 ng/ $\mu$ L, la cual presentó las mejores amplificaciones.

Para la obtención de las mejores amplificaciones y patrones de bandeo mediante RAPD's, se probaron las series de "iniciadores" OPA, OPB y OPF. Cada una de éstas está conformada por 20 "iniciadores", diseñados y sintetizados por la empresa Operon Technologies (Operon<sup>TM</sup>).

Con el fin de identificar y seleccionar aquellos "iniciadores" que produjeran patrones de amplificación constantes y polimorfismo consistente para ser analizados en las dos especies de tiburones, se realizaron pruebas con el total de "iniciadores", en muestras de ambas especies, para seleccionar las secuencias de inicio que generaran un mayor número de fragmentos bien definidos, con buena intensidad y consistencia y con el menor número de fragmentos generados por dimerización del "iniciador". Estos últimos fragmentos se detectaron mediante controles que se integraron en cada corrimiento de PCR y por cada "iniciador" utilizado en el mismo (ver detalles más adelante).

Las PCRs para obtener RAPD's se llevaron al cabo en un termociclador Eppendorf (Mastercycler gradient 5331) utilizando un programa de 44 ciclos, iniciando con un ciclo a 94° C durante un minuto y cada uno de los 44 ciclos subsecuentes con las siguientes características:

- Desnaturalización a 94° C durante 1 min.
- Alineación a 37° C durante 1 min.
- Amplificación a 72° C durante 1 min.

Una vez finalizados los ciclos correspondientes al PCR, los tubos se mantuvieron a 37° C durante 15 min. para estabilizar las cadenas complementarias de DNA de los fragmentos amplificados y por último un ciclo permanente de 4° C.

La mezcla de reacción para la PCR para un volumen final de 25.7  $\mu$ L, se conformó de la siguiente forma:

- 17.5  $\mu$ L de agua bidestilada filtrada con millipore milliex de 0.22  $\mu$ m y esterilizada.
- 2.5  $\mu$ L de buffer PCR 10X (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.3 15 mM; Promega M190G)
- 0.5  $\mu$ L de cada nucleótido (1.25 mM dATP, dCTP, dGTP y dTTP; Promega U1330)
- 2.0  $\mu$ L de "iniciador" (Operon Technologies)
- 0.25  $\mu$ L de taq polimerasa equivalente a 1.15 U/ $\mu$ L (5 U/ $\mu$ L Promega M1665)
- 0.25 de MgCl<sub>2</sub> 25mM (Promega A351H)
- y 1.2  $\mu$ L de muestra de DNA con dilución 0.7 ng/  $\mu$ L.

Por cada ensayo de PCR se incluyeron controles para confirmar la amplificación correcta de los fragmentos obtenidos por RAPD's y que los fragmentos generados no se debieran a efectos de contaminación o dimerización de los "iniciadores", teniendo así lo siguiente:

- Un control con sólo la mezcla de reacción, sin DNA y sin iniciador.
- Un segundo control con: mezcla de reacción, DNA y sin iniciador y
- Un tercer control con mezcla de reacción con iniciadores y sin DNA.

Para la visualización y separación de los diferentes fragmentos amplificados por PCR, se realizaron electroforesis horizontales en geles de agarosa como matriz de corrimiento. Las electroforesis se realizaron en un equipo Horizon modelo 11-14 (Gibco BRL 15510-019) con geles de agarosa (Invitrogen 15510-019) al 1.5% (peso/volumen, p/v), preparados con buffer TBE 1X pH 8.0 (0.09 M Tris, 0.09 M Ácido Bórico y 0.02 M de EDTA), a partir de una solución stock al 10X. La mezcla de agarosa y buffer se calentó en un horno de microondas hasta su ebullición y homogenización total. Una vez que la mezcla tuviera aproximadamente una temperatura de 55° C, se agregó bromuro de etidio 0.1 µL/mL de una solución stock de 10mg/mL (Gibco BRL 15585-011) para visualizar los fragmentos de DNA con luz UV. La mezcla se vació en la cámara de electroforesis con un espaciador de 20 carriles y se dejó reposar durante 15 a 20 min., hasta su gelificación.

Cada uno de los productos de PCR se mezclaron con 3 µL de Buffer de carga 65% (p/v) consistente en sucrosa, 10mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM EDTA y 0.3% (p/v) de azul de bromofenol. En cada corrimiento se incluyó un carril con 5 µL de marcador molecular de 100 pares de bases (pb) (Gibco BRL 15628-019), con el fin de determinar el tamaño de cada fragmento amplificado.

Las condiciones de cada corrimiento fueron de 90V y 75mA aproximadamente, durante hora y media. La corriente eléctrica se generó mediante una fuente de poder Bio-Rad (Power Pac 300); después del tiempo de electroforesis, el gel se colocó sobre un transluminador de luz UV (foto/UV300) a 302 nm para la visualización de los fragmentos, cada uno de los geles se fotografiaron con una cámara digital (Cannon Power Shot S40) con un filtro para UV (naranja) y se analizaron posteriormente los patrones de bandeo.

### **Análisis de Datos para RAPD's**

Una vez realizados los ensayos de PCR y seleccionados los "iniciadores" con mayor número y mejor calidad de amplificación, se realizó una selección de fragmentos para ser

analizados, por lo que se tomaron en cuenta sólo aquellos fragmentos que presentaron repetibilidad a lo largo de todos los individuos de cada muestra.

Debido a que los RAPD's no permiten identificar heterócigos y homócigos de cada loci, se consideran de carácter dominante, por lo que cada fragmento amplificado se consideró como la expresión de alelo dominante, mientras que la ausencia de éste correspondería al alelo recesivo.

Dadas las características anteriores de los RAPD's como marcadores moleculares, los fragmentos que presentaron frecuencias menores al criterio propuesto por Lynch y Milligan (1994)  $1-3/N$  (N es el tamaño de muestra) fueron eliminados del análisis para evitar la subestimación del alelo recesivo.

Ya que la obtención de las frecuencias está basada únicamente en la presencia de un alelo dominante, resulta imposible la determinación directa de la frecuencia de los heterócigos ( $H_o$ ) por lo que se asumieron condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg y una distribución binomial de las frecuencias de los genotipos, expresados en la siguiente ecuación.

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Donde:  $p^2 + 2pq$  = frecuencia del genotipo dominante y  $q^2$  = frecuencia del genotipo nulo o recesivo y cuya suma de estas anteriores representan el total de la distribución de los genotipos en el genoma.

La expresión anterior, considerando las frecuencias de los alelos, puede ser dada por la ecuación:

$$p + q = 1$$

Teniendo en cuenta que los genotipos heterócigos se encuentran incluidos en la frecuencia del alelo dominante representada por "p" y ya que partimos de la estimación de las frecuencias de este último, el valor del alelo recesivo ("q") se obtiene conforme a la expresión:

$$q = 1 - p$$

El sesgo producido en la frecuencia de los genotipos dada por la estimación indirecta de las frecuencias, fue corregido mediante la ecuación de segundo orden de Taylor (Kendall y Stuart, 1997; citado por Le Corre *et al.*, 1997) mediante la expresión:

$$y_i = -f_i/2(1-f_i) + \Delta^{1/2}/2(1-f_i) - (1-f_i) \Delta^{-3/2} \text{Var}(q_i)$$

Donde:

$$\Delta = f_i^2 + 4(1-f_i)q_i \quad \text{y} \quad \text{Var}(q_i) = q_i(1-q_i)/n_i$$

Siendo:  $n_i$  el número de organismos de cada muestra  $i$ ,  $q_i$  la frecuencia observada de los individuos con ausencia del fragmento en la muestra  $i$ , y  $f_i$  el coeficiente de endogamia, que es obtenido a partir de las estimaciones de las frecuencias esperadas de los organismos que no presentan el fragmento y de su varianza (Lynch y Milligan, 1994).

La frecuencia del alelo recesivo incorporada a la corrección anterior se obtuvo por la ecuación de  $y_i$ .

$$q_i = y_i^2 (1 - f_i) + f_i y_i$$

El análisis de los datos se realizó basándose en los algoritmos mencionados, utilizando el programa de “Tools For Population Genetic Analysis” (TFPGA) versión 1.3 (Miller, 1997) mediante el cual se obtuvieron las frecuencias alélicas de cada loci (fragmento), así como la heterocigosis esperada ( $H_e$ ) de los mismos.

Las frecuencias alélicas obtenidas se utilizaron para evaluar la homogeneidad de frecuencias alélicas para cada locus y entre pares de muestras, mediante la prueba exacta de Raymond y Rousset (1995), la cual se basa en tablas de contingencia para realizar la estimación, generando valores de chi-cuadrada y sus respectivas probabilidades de significancia ( $P$ ). También se obtuvieron valores de error estándar mediante remuestreos de Montecarlo que consistieron en 10 ciclos de 1000 pasos reiterativos y cada ciclo con 2000 permutaciones. Dichas estimaciones fueron realizadas tanto por locus, como entre pares de muestras.

Para determinar la presencia de estructura genética poblacional, se utilizó el programa TFPGA para obtener el estimador theta ( $\theta$ ) de subdivisión poblacional, descrito por Weir y Cockerham (1984), que es equivalente al estadístico  $F_{ST}$  de Wright, (1965) donde  $\theta = F_{ST}$ .

Se estimó el índice de subdivisión poblacional,  $\theta$  debido a que se basa en análisis de varianza, presenta un valor menor de sesgo por considerar la varianza generada en cada análisis tanto para los loci como para pares de muestras y considera la expresión de alelos múltiples (comparación de pares de alelos entre individuos de cada población), además de que toma en cuenta distintos tamaños de muestras.

Para ambos estimadores se obtuvieron los valores de significancia, tanto para los índices estimados en cada loci como para las comparaciones entre pares de muestras, mediante una prueba de chi-cuadrada ( $\chi^2$ ) realizada mediante la fórmula de  $\chi^2 = 2N F_{ST} (k-1)$ , donde  $k$  = al número de alelos, con 1 grado de libertad ( $g.l.$ ) para el análisis de loci y 3  $g.l.$  para el análisis

entre pares de muestras; la prueba se llevó al cabo mediante el programa de Statgraphics versión 5.0.

A partir de los valores de  $\theta = F_{ST}$  se realizó una estimación del número de migrantes por generación ( $Nm=M$ ) entre pares de poblaciones, usando la aproximación de Slatkin (1993):

$$F_{ST} = 1/4Nm+1 \text{ de donde se deriva } Nm = [(1/F_{ST})-1]/4 = M$$

Donde M corresponde al valor de flujo genético entre pares de poblaciones y la  $F_{ST}$  sería el índice de subdivisión poblacional entre poblaciones. Dichos datos se correlacionaron con los valores de distancia geográfica mediante una prueba de Mantel (1967) con el programa TFPGA, para determinar si existe un aislamiento por distancia.

Se obtuvieron los datos de distancia genética de Nei (1978) entre pares de muestras, a partir de las frecuencias alélicas de cada muestra mediante el programa TFPGA. A partir de las distancias genéticas se realizaron dos análisis de agrupamientos para obtener los dendrogramas correspondientes a cada especie, utilizando el método de “Unweighted-Pair Group Method with Arithmetic Mean” (UPGMA) de Swofford y Olson (1990) realizado con el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis versión 2.1 (MEGA; Kumar et al., 2001) el cual llevó al cabo un remuestreo utilizando 1000 réplicas para obtener los valores de consistencia de las ramas y estimar el grado de confiabilidad de los resultados del agrupamiento.

Por último, en el programa TFPGA se elaboró una matriz de los datos de distancia geográfica en millas náuticas entre pares de muestras, para conocer el grado de correlación existente entre las distancias genética y la distancia geográfica para ser analizadas mediante la prueba de Mantel (Hellberg, 1994), que resulta más apropiada que una regresión simple debido a que en ésta se viola el supuesto de independencia de los datos.

## **cit b mtDNA**

### **Amplificación de Marcadores**

La estandarización de la técnica de SSCP's (Ver anexo C), se hizo con marcadores nucleares (dos genes de la actina) y con marcadores mitocondriales con niveles de polimorfismo conocido (*citocromo b*, ND4 y 12S *D-loop*).

Los ensayos se realizaron en primer término mediante PCR, utilizando “iniciadores” universales para la amplificación de los genes de actina y de ND4 y algunos reportados en trabajos de otras especies cercanas a las trabajadas (Kocher *et al.*, 1989; Palumbi *et al.*, 1991; Martín y Palumbi, 1993; Chow *et al.*, 1997).

Con la técnica de SSCP's se estudió únicamente el marcador mitocondrial, *citocromo b*, mismo que se amplificó con los oligos CB3RL (CATATTAACCCGAATGATA) y CB6H (CTCCAGTCTTCGCTTACAAG) (Martín y Palumbi, 1993). Aunque se logró también la amplificación y secuenciación de la región del 12S-*D loop*, debido a su gran tamaño de 1200pb, no fue posible analizarla mediante esta técnica. La amplificación del *citocromo b*, en la que se lograron los mejores resultados, se realizó utilizando una mezcla de reacción con las siguientes características, para un volumen final de 10  $\mu$ L.:

- 6.1  $\mu$ L de HO<sub>2</sub> bidestilada filtrada con millipore milliex de 0.22  $\mu$ m y esterilizada.
- 1  $\mu$ L de Buffer 10 X (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.3 15 mM; Promega M190G).
- 1.6  $\mu$ L de mezcla de dNTP's (1.25 mM dATP, dCTP, dGTP y dTTP; Promega U1330).
- 0.4  $\mu$ L de "iniciador" CB3RL y 0.2  $\mu$ L de "iniciador" CB6H
- 0.1  $\mu$ L de Taq polimerasa, equivalente a 0.5 U/ $\mu$ L (5 U/ $\mu$ l. Promega M1665).
- 1.2  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (Promega A351H).
- 0.5 $\mu$ L de muestra del stock de DNA.

Se verificó la amplificación del fragmento, corriendo de 2 a 5  $\mu$ L del producto de PCR en 3  $\mu$ L de buffer de carga en geles de agarosa al 1.5% y mediante tinción con bromuro de etidio. Las condiciones de esta electroforesis se fijaron a 90V durante 30 min., con la misma fuente de poder que se utilizó para la separación de RAPD's. Su visualización se realizó en un transluminador de luz ultravioleta (90mm) y finalmente se tomó una fotografía digital para corroborar si el amplificado de cada muestra era de buena calidad para la técnica de SSCP; en ese caso, se mezclaron en un tubo de PCR 5  $\mu$ L del amplificado y 5  $\mu$ L de buffer de carga al cual se adicionó formadida para facilitar la desnaturalización del DNA en cadenas sencillas y mantener así la conformación durante la electroforesis. La mezcla se colocó en termociclador a 95° C durante 5 min., e inmediatamente se pasó a hielo, hasta el momento de colocar cada muestra en los carriles del gel.

Para la electroforesis se utilizó una cámara de electroforesis vertical marca BioRad (Sequi-Gen GT System 38 X 30). Antes de montar el sistema de electroforesis los vidrios se limpiaron con H<sub>2</sub>O bidestilada y alcohol etílico, repitiéndolo tres veces para cada uno y agregando 2 mL de Sigmacote (Sigma SL-2) al vidrio que no se adhirió al gel y volviendo a limpiar con alcohol etílico después de cinco minutos; al vidrio que se adhirió al gel se le agregó 1  $\mu$ L de 3-(trimetoxisili)propil metacrilate silane (Sigma M6514) mezclados en 1mL de Alcohol



etílico al 95% y ácido acético al 5%, para limpiar después de 5 minutos tres veces con la mezcla de alcohol- ácido acético.

Los geles consistieron de 55mL. de una solución de poliacrilamida al 8% (acrilamida: bisacrilamida 37.5:1 ICN 800-800 y 800-801 respectivamente) y 5% de glicerol (Sigma G-5516), mezclando 10.71mL de acrilamida al 40%, 5.71 mL de bisacrilamida al 2%, 35.83 mL de TBE 0.5X y 2.75 mL de glicerol. Se extrajo la mayor cantidad de aire de la mezcla durante 15 min. aproximadamente mediante una bomba de vacío y se agregaron 82.5mL de TEMED (ICN 805614) y 82.5 de persulfato de amonio al 25% p/v (ICN 802811), se mezcló y se inyectó rápidamente en el sistema de electroforesis para formar un gel de aproximadamente 3 mm de grosor, se dejó reposar durante 40 min. para que polimerizara y una vez que gelificó, se colocaron las muestras ya tratadas y los marcadores de 20 pb (BMA 50320). Se corrieron con buffer TBE 1X durante 15 hrs. a 16mA a 4° C.

Posteriormente, el gel adherido a una de las placas de vidrio fue revelado con un kit de tinción de plata (Silver Satin Plus Kit Bio-Rad 161-0449). Para ello se fijó el gel en una solución de ácido acético al 10% en una charola con movimiento constante durante unos 20 min. Después se lavó tres veces con agua bidestilada y se agregó la solución de plata. Transcurridos 30 min. aproximadamente y con movimiento constante, aparecieron las bandas de las diferentes estructuras secundarias. Una vez revelado el gel, se agregó inmediatamente una solución de ácido acético al 5% para inactivar la solución de revelado y evitar la sobreexposición, se lavó el gel con agua y se fotografió para su análisis. Se identificaron los diferentes haplotipos en los fragmentos amplificados provenientes las diferentes muestras en cada especie para evaluar su polimorfismo.

### **Análisis de Datos de cit b mtDNA**

Una vez determinados los diferentes electrofenotipos se elaboró una base de datos registrando los haplotipos identificados en cada muestra de las dos especies estudiadas. A cada haplotipo se le asignó una letra, dando la primera letra del abecedario al más común y así sucesivamente hasta registrar todos los haplotipos detectados. Una muestra de cada una de las diferentes conformaciones fue secuenciada en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (UNAM), donde se utilizó un secuenciador modelo 3100 Genetic Analyzer de 16 capilares: Big Dye Terminator versión 3.1 Sequencing kit, movilidad de transporte polímero D+31000pop6 (BD)v3, capilar de 50cm y tiempo de electroforesis de secuencia de 2 hrs. 30 min.

Las secuencias obtenidas de los diferentes haplotipos en las dos especies fueron verificadas con el fenograma respectivo, obtenido de la secuencia y posteriormente se realizó una

---

búsqueda mediante Blast, en la página de banco de genes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) de aquellas secuencias en diferentes especies de tiburones para las que existen secuencias de la misma región y que alinean con las secuencias obtenidas, con el fin de corroborar el origen del fragmento del *citocromo b* secuenciado y verificar la confiabilidad de la secuencia.

Una vez obtenidas las secuencias de cada haplotipo en cada especie, se eliminaron los fragmentos correspondientes a los “iniciadores”, tanto 5’-3’ como 3’-5’ de todas las secuencias, así como un aproximado de 10 a 15 pb más en cada extremo, ya que en algunas secuencias, la secuenciación se mostró no consistente para el análisis. Después las secuencias obtenidas fueron alineadas mediante el programa de BioEdit versión 6.0.5 (Hall, 2001) con la aplicación de ClustalW con 1000 replicas utilizando booststraps. La alineación fue verificada también de forma manual, para mejorar el alineamiento.

Se realizaron dos tipos de análisis para los datos de SSCP’s: uno analizando los diferentes electrofenotipos como haplotipos y otro como secuencias.

Para el análisis como haplotipos se estructuró una base de datos, incluyendo los datos de todos los ejemplares portadores de cada variante (haplotipo) en las diferentes muestras. Estas bases de datos fueron analizadas mediante el programa de TFPGA para obtener también los parámetros descritos para RAPD’s, como diversidad, valores de probabilidad de la prueba de homogeneidad de frecuencias haplotípicas, índices de subdivisión poblacional, distancias genéticas, valores de correlación entre distancias genéticas y geográficas y agrupamiento de las muestras mediante el programa de TFPGA y MEGA (Kumar *et al.*, 2001).

La prueba de neutralidad de los diferentes haplotipos en ambas especies se realizó mediante diferentes modelos como: el de Tajima (1996) que se basa en la relación entre sitios segregantes y diversidad nucleotídica entre secuencias. El modelo de Ewens-Watterson (1972), se basa en que la probabilidad de extraer dos haplotipos idénticos de una muestra aleatoria sea menor o igual al de la muestra observada. El análisis de neutralidad de Chakraborty (1990) compara la cantidad de haplotipos esperados en una muestra homogéneamente neutra, con el número de haplotipos observados y la prueba de Fu (1997) analiza la cantidad de diferencias entre pares de haplotipos en cada población. De tal forma que cada prueba, evalúan la neutralidad de los haplotipos con base en diferentes elementos como son:

- Número de sitios segregantes
- Diversidad nucleotídica
- Teoría de alelos neutros

- Teoría de población en equilibrio.
- Modelo de alelos infinitos, con y sin recombinación.
- Diferencias entre la cantidad de haplotipos esperados y el promedio de diferencias de sitios entre pares de haplotipos.

El análisis de secuencias se realizó mediante el programa Arlequín versión 2 (Schneider *et al.*, 2000), con el cual se obtuvieron índices de diversidad nucleotídica, de Theta ( $\theta_{Hom}$ ,  $\theta_S$  y  $\theta\pi$ ). Donde el índice  $\theta_{Hom}$  obtiene la diversidad nucleotídica según la homocigosis esperada, mientras que  $\theta_S$  se base a la cantidad de sitios segregantes en las secuencias de cada muestra, y  $\theta\pi$  obtiene la diversidad entre sitios segregantes pero entre pares de secuencias. Una vez obtenidos los índices se realizó una correlación para conocer la relación entre los valores de sitios segregantes  $\theta_S$  con los valores de  $\theta\pi$ , de tal forma de conocer si existe un crecimiento poblacional reciente o si las poblaciones han pasado por algún cuello de botella. También se obtuvieron los valores de probabilidad de la prueba exacta, índices de divergencia poblacional  $F_{ST}$ , análisis de AMOVA, distancia genética y número de migrantes.

Para la obtención de índices moleculares de divergencia se utilizó el modelo de Tamura y Nei (1993) con un valor de gamma de 0.16 para la especie de *C. falciformis*, ya que se observa que no existe una distribución de mutación constante a lo largo de la secuencia como se puede observar en el Anexo C, por que este modelo considera distintas tasa de mutación para transversiones y transiciones, sin embargo para la especie de *S. lewini* no se utilizó valor gamma, por presentar una distribución más homogénea a lo largo de la secuencia. La diversidad nucleotídica de acuerdo con el modelo se refiere a la probabilidad de que dos secuencias homólogas contengan diferencia en cuanto a la composición de nucleótidos, esto equivale a la diversidad genética pero a nivel nucleotídico, que es obtenido mediante la siguiente expresión:

$$\pi_n = \frac{\sum_{i=1}^K \sum_{j<i} p_i p_j d_{ij}}{L}$$

Donde  $d_{ij}$  es la estimación del número de mutaciones ocurrida desde la divergencia de los haplotipos  $i$  y  $j$ ,  $k$  es el número de haplotipos y  $p_i$  es la frecuencia del haplotipo  $i$  y  $L$  es el largo de la secuencia, el modelo asume no-recombinación y secuencia selectivamente neutra.

Para las estimaciones de Theta se utilizó el índice de  $\theta_{Hom}$  que se obtuvo a partir de la homocigosis esperada, mediante la siguiente expresión:

$$E(\theta_H) = \theta \left[ 1 + \frac{2(1+\theta)}{(2+\theta)(3+\theta)} \right] \quad (\text{Zouros, 1979}).$$

El parámetro  $\theta_S$  se estimó a partir del número de sitios segregantes, con base en la relación de equilibrio de alelos infinitos y el tamaño de la secuencia. A su vez,  $\theta\pi$ , fue estimado por la relación de alelos infinitos entre el número medio de diferencias de  $\pi$  estimado y  $\theta$  (Tajima, 1983, 1989). Se realizó también una correlación mediante el programa STATISTICA versión 6.0 (StatSoft.Inc, 2001) de los índices de diversidad  $\theta_S$  y  $\theta\pi = \theta m$ , para conocer si las poblaciones han pasado por cuellos de botella o si han presentado un crecimiento poblacional reciente, ya que los índices se encuentran relacionados con los tamaños poblacionales según la diversidad nucleotídica ( $\theta_S$ ) o la cantidad de sitios segregantes ( $\theta\pi$ ).

Para conocer las distancias genéticas entre muestras con sus diferentes haplotipos, se usó el modelo de Tamura y Nei (1993) que como el modelo de Kimura de dos parámetros, asume diferente tasa de mutación para transversiones y transiciones, haciendo diferencia entre las transiciones de purinas y de pirimidinas, pues se pueden dar con mayor frecuencias el cambio de una que otras y ya que el fragmento analizado presenta diferencias entre la cantidad de transversiones respecto a el fragmento en otros organismos (Martín *et al.*, 1992; Martín y Palumbi, 1993) por lo que el modelo de Tamura y Nei es adecuado para analizar las secuencias.

Para determinar la estructura genética con base en datos de secuencias, el programa Arlequín utiliza un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA), que analiza las varianzas según los datos de frecuencias de los diferentes haplotipos que se estudian. Esta información fue analizada mediante la covarianza de los datos, que son analizadas mediante distancias euclidianas, bajo el modelo de los estadísticos F de Wright: los cuales se basan en la probabilidad de identidad por descendencia de los haplotipos o electromorfos y definiendo a  $F_{ST}$

$$\text{como: } F_{ST} = \frac{f_0 - f_1}{1 - f_1} = \frac{\bar{t}_1 - \bar{t}_0}{\bar{t}_1}$$

Donde:  $f_0$  es la probabilidad de identidad por descendencia de encontrar dos genes diferentes en una muestra,  $f_1$  es la probabilidad de identidad por descendencia de encontrar dos genes en dos diferentes poblaciones,  $\bar{t}_1$  es la media del tiempo de coancestría de dos genes en dos diferentes poblaciones de  $\bar{t}_0$  en la media de tiempo coancestral de encontrar dos genes en una misma población (Slatkin, 1991). Para obtener valores de significancia se realiza una prueba de hipótesis con 1000 permutaciones. También se obtiene el índice  $F_{ST}$  y su valor de probabilidad.

Una vez obtenidos los valores de probabilidad de AMOVA y de  $F_{ST}$  se estimaron los valores de distancia genética según Slatkin (1995) mediante la siguiente expresión  $D=F_{ST}/(1-F_{ST})$ , los valores se correlacionaron con las distancias geográficas en millas náuticas como se realizó en RAPD's. También se obtuvieron las distribuciones de Mismatch en cada una de las especies de acuerdo con los datos obtenidos mediante las secuencias de los haplotipos, de tal forma que pueda indicarnos si algunas de las diferencias que se encuentran en las muestras son debido a errores de muestreo y si además si las diferencias pueden tener alguna explicación con algún evento evolutivo como cuellos de botella.

Se calculó la cantidad de migrantes por generación entre pares de poblaciones por medio de la fórmula:  $M=1-F_{ST}/2F_{ST}$ , con éstos datos entre pares de poblaciones, se realizó una correlación con los datos de distancia genética para conocer el ajuste al modelo de aislamiento por distancia. Además se realizó una correlación de los valores de  $F_{ST}$  con las distancias geográficas para conocer si existe una relación de la divergencia poblacional con aspectos geográficos.

También se realizó una correlación, entre valores de  $F_{ST}$  de RAPD's con los valores de  $F_{ST}$  de las secuencias de *citocromo b* con el programa STATISTICA, para conocer si las diferencias obtenidas son causadas por un desplazamiento diferencias de hembras, y conocer las relaciones de flujo genético entre las poblaciones, ya que si se observa una mayor cantidad de divergencia con RAPD's y menor con *citocromo b*, podría indicar mayor flujo de hembras, mientras que una divergencia mayor en el marcador mitocondrial y menor en RAPD's, sugeriría mayor flujo genético para machos.

Se realizó una reconstrucción de la genealogía de los fragmentos analizados para cada especie con base en los datos de las secuencias obtenidas del *citocromo b*. Las secuencias se alinearon con el fragmento de un grupo externo que para ambas especies fue *Carcharodon carcharias*, el cual corresponde al orden de los Lamniformes, mientras que las especies analizadas son del orden de los Carcharhiniformes. Una vez alineadas las secuencias mediante Bio-Edit, se analizaron mediante el programa MODELTEST (Posada, 2005) y Phylogenetic Analysis Using Parsimony (PAUP\*; Swofford, 1998) para determinar el mejor modelo de evolución para la reconstrucción de cada genealogía. Después se utilizó la información de MODELTEST para la construcción de los árboles de la genealogía de los haplotipos en ambas especies en el programa MEGA (Kumar et al., 2001) con el cual se utilizó el método de UPGMA para la obtención de cada árbol.

También se realizó una reconstrucción filogenética de algunas especies de tiburones, utilizando secuencias obtenidas del Gene Bank (<http://www.ncbi.com>) (Ver anexo F) y alineando con secuencias consenso de los haplotipos de cada especie estudiada y utilizando una quimera (*Chimaera monstrosa*) como grupo externo que no pertenece a la infraclase de los tiburones. Las secuencias fueron analizadas también por MODELTEST, para determinar el mejor modelo de evolución para la reconstrucción filogenética de tiburones, con un modelo de Tamura-Nei (1993) con distribución gamma, de que según el análisis en MODELTEST el valor de gama fue de 0.159. El árbol filogenético se obtuvo mediante PAUP con los datos del modelo evolutivo seleccionado mediante el método de Máxima Parsimonia con 100 replicas y con Máxima Likelihood con 100 replicas.

---

## RESULTADOS

### Filogenia

La reconstrucción filogenética del grupo de tiburones se realizó con base en las secuencias obtenidas de *citocromo b* y con secuencias ya reportadas para otras especies de tiburones que se obtuvieron del banco de genes <http://www.nci.com> (anexo F). En esta reconstrucción se observó que las secuencias de los diferentes haplotipos analizados de *C. falciformis* obtenida en el presente trabajo se ubican en una solo grupo con una conformación monofilética, a este grupo se agrupan las especies del género *Carcharhinus* (*C. porosus* y *C. plumbeus*). También se observó que las secuencias de los haplotipos correspondientes a *S. lewini* se agrupan correctamente con la secuencias de la misma especie ya reportada y que el genero *Sphyrna* se ubica como de los más reciente en aparición. Esto coincide, con lo reportado en otras reconstrucciones filogenéticas de tiburones (Martín 1992). De forma general la reconstrucción filogenética obtenida con los datos analizados en el presente trabajo y reportados en otras especies se apega a las filogenias de caracteres dentarios fósiles y a las realizadas con datos mitocondriales, ya que se separa claramente la especie *C. carcharias* que corresponde a la familia de los Lamnidos y aunque se a observado en otras filogenias que la especie *G. Cuvier* se ubica como base de la Familia de los Carcharhinidos, y aquí se observa a *P. glauca* como la especie más ancestral, el reflejo de esta filogenia es unicamente el reflejo evolutivo de la evolución del fragmento y no el de las especies como tal (Figura 13).

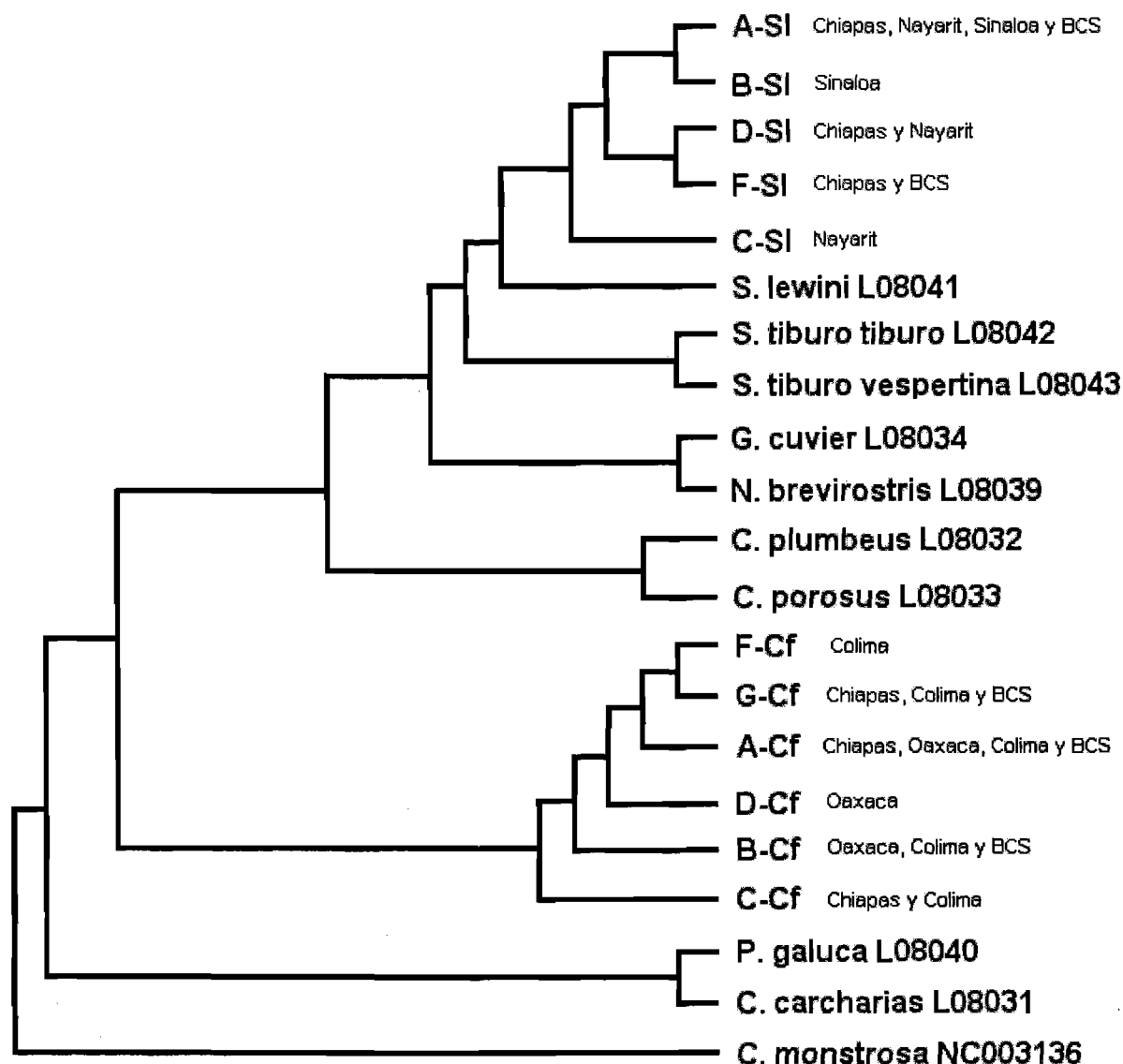


Figura 13.- Reconstrucción filogenética del orden de los Carcharhiniformes en base a un fragmento de *citocromo b*, mediante Máxima Likelihood con 100 replicas en PAUP y como grupo externo a *Chimera monstrosa*.

### *Carcharhinus falciformis*

#### Diversidad Genética

Después de ensayar diferentes series de “iniciadores”, se seleccionaron para el análisis de RAPD's sólo aquellos que produjeron un alto número de bandas intensas y constantes en las muestras, así como aquellas que cumplieron con el criterio propuesto por Linch y Milligan



(1994). Con estas condiciones cumplieron sólo 5 “iniciadores” que amplificaron 42 loci en *C. falciformis* (Tabla 2).

Tabla 2.- “Iniciadores” seleccionados, secuencia nucleotídica, el número de fragmentos generados y loci analizados de cada “iniciador” en *C. falciformis*.

Especie	Iniciadores	secuencia	# de loci generados	# de loci analizados
<i>C. falciformis</i>	OPA-1	5'-CAGGCCCTTC-3'	11	10
	OPB-12	5'-CCTTGACGCA-3'	9	9
	OPB-18	5'-CCACAGCAGT-3'	7	7
	OPF-9	5'-CCAAGCTTCC-3'	8	7
	OPF-14	5'-TGCTGCAGGT-3'	10	9

La lista de los loci analizados, así como de sus respectivas frecuencias alélicas, estimaciones de heterocigosis esperada por locus y por muestra y la probabilidad de la prueba exacta para cada locus *C. falciformis* se presentan en el Anexo B.

En *C. falciformis* la diversidad genética en términos de la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) por loci presentó los valores más altos en los loci F14.8 y B12.2 con valores de  $H_e$  de 0.509 y 0.506 respectivamente, mientras que los valores más bajos los presentaron los loci F9.3 y A1.6 con diversidades de 0.177 y 0.222 respectivamente (ver Anexo B). Los valores de  $H_e$  de las cuatro muestras, mostraron intervalos de  $H_e$  entre 0.340 y 0.409, las estimaciones de heterocigosis esperada más altas se presentaron en las muestras de Colima y Baja California Sur (0.409 y 0.392 respectivamente) y la más baja en las muestras de Chiapas (0.340). De manera global se observó un valor de diversidad total para la especie de  $H_e = 0.424$  (Tabla 3).

En cuanto a la diversidad haplotípica encontrada con el marcador de la región de *citocromo b* mediante la técnica de SSCP's, se identificaron siete diferentes haplotipos para *C. falciformis*. De estos se analizaron únicamente 6 (Tabla 3), ya que el alelo E, que se presentó en un sólo organismo de la población de Baja California Sur, no fue secuenciado satisfactoriamente, lo que motivó su eliminación del análisis. Se observó que el haplotipo “D” fue único para la población de Oaxaca y el “F” para la población de Colima. Al analizar cada una de las poblaciones con sus diferentes haplotipos, se encontró que el intervalo de diversidad haplotípica para las muestras de *C. falciformis* fue de  $H_e = 0.226$  (Chiapas) a 0.552 (Colima). Ambos valores de las muestras anteriores, coinciden con los valores más bajos y altos del análisis mediante

RAPD's. La diversidad haplotípica Total, para la especie de *C. falciformis* con este mismo marcador fue de  $He_T = 0.331$  (Tabla 3).

Tabla 3.- Diversidad de loci de RAPD's y de los haplotipos de *citocromo b* en cada muestra y frecuencia de cada haplotipo para las muestras de *C. falciformis*. N= tamaño de la muestra.

Muestras <i>C. falciformis</i>	(N)	Diversidad esperada He	# de Haplotipos	Frecuencias Haplotípicas						Diversidad Haplotípica
				A	B	C	D	F	G	
CHIAPAS	55	0.3404	3	0.875	0	0.1	0	0	0.025	0.2266
OAXACA	30	0.3742	3	0.84	0.12	0	0.04	0	0	0.2841
COLIMA	30	0.4095	5	0.654	0.077	0.077	0	0.077	0.115	0.5520
BCS	30	0.3921	3	0.885	0.077	0	0	0	0.038	0.2711
<b>Total</b>	145	0.4248								0.3312

De las amplificaciones de una región de *citocromo b*, se obtuvo un fragmento de 398 pb y sólo 301 pb de cada uno de los fragmentos de los 6 haplotipos que se utilizaron para el análisis, se mandaron secuenciar cada uno en ambos para confirmar su secuencia (ver Anexo C). Mediante la comparación entre cada una de las secuencias, se obtuvo la información general de la composición del fragmento estudiado, que fue la siguiente:

- Número de transiciones observadas: 15
- Número de transversiones observadas: 23
- Número de sustituciones: 38
- Sitios polimórficos: 50
- Sitios con transiciones: 14
- Sitios con transversiones: 23
- Sitios con sustituciones: 34
- Sitios con deleciones: 18

Los valores de las estimaciones de diversidad nucleotídica, muestras nuevamente que es la muestra de Colima la que presentó los valores más altos, mientras que los más bajos se observaron en las muestras de Baja California Sur y Chiapas, esta última presentó los valores más bajos de diversidad en todos los análisis. Los índices de diversidad Theta ( $\theta_{Hom}$ ,  $\theta_s$ ,  $\theta\pi$ ) también presentan un patrón similar al ya observado, donde de forma general la muestra de Colima

presentó mayor diversidad mientras que Chiapas y Baja California Sur presentaron los valores más bajos de diversidad con base en estos índices (Tabla 4).

Tabla 4.-Índices de diversidad nucleotídica y molecular de una región de *citocromo b* en *C. falciformis*.

Muestra	Diversidad Genética	Diversidad Nucleotídica	$\theta_{Hom}$	$\theta_S$	$\theta\pi$
CHIAPAS	0.2295	0.0145	0.2220	7.9433	4.3827
OAXACA	0.2900	0.0192	0.3042	9.0043	5.7919
COLIMA	0.5631	0.0299	0.9658	8.9099	9.0213
BCS	0.2185	0.0123	0.2084	8.9099	3.7301

La relación encontrada entre los índices basados en el tamaño poblacional según la diversidad nucleotídica ( $\theta\pi = \theta m$ ) y el número de sitios segregantes ( $\theta_S$ ), resultó no significativa con un valor de correlación de  $r = 0.36979$  y se observó que en las poblaciones de Oaxaca y Baja California Sur presentan evidencia de un crecimiento poblacional reciente, mientras que en la población de Chiapas se observa aislamiento de material genético y por último, Colima fue la única muestra que presenta un estado con mayor equilibrio de entre sitios segregantes y diversidad nucleotídica (Figura 13).

Para conocer los niveles de neutralidad de las secuencias analizadas en las muestras estudiadas, la prueba de Tajima permite observar que la muestra de Baja California Sur es la única que presenta haplotipos con niveles fuera de neutralidad, mientras que la prueba de neutralidad de Ewens con sus diferentes modelos y la prueba de Fu, no mostraron valores significativos por lo que la variación observada en la secuencia analizada puede ser explicada bajo el modelo de la teoría neutral. También la prueba de Chakraborty presentó valores significativos, para la mayoría de las muestras con excepción de las muestras de Colima, indicando que el resto de las muestras presentan menor cantidad de haplotipos a los esperados (Tabla 5). Todo lo anterior coincide con lo encontrado en la prueba de correlación, donde la única muestra que presenta una relación más estable entre sitios segregantes y diversidad nucleotídica es la de Colima, mientras que el resto de las muestras no presentan una correlación lineal (Figura 14).

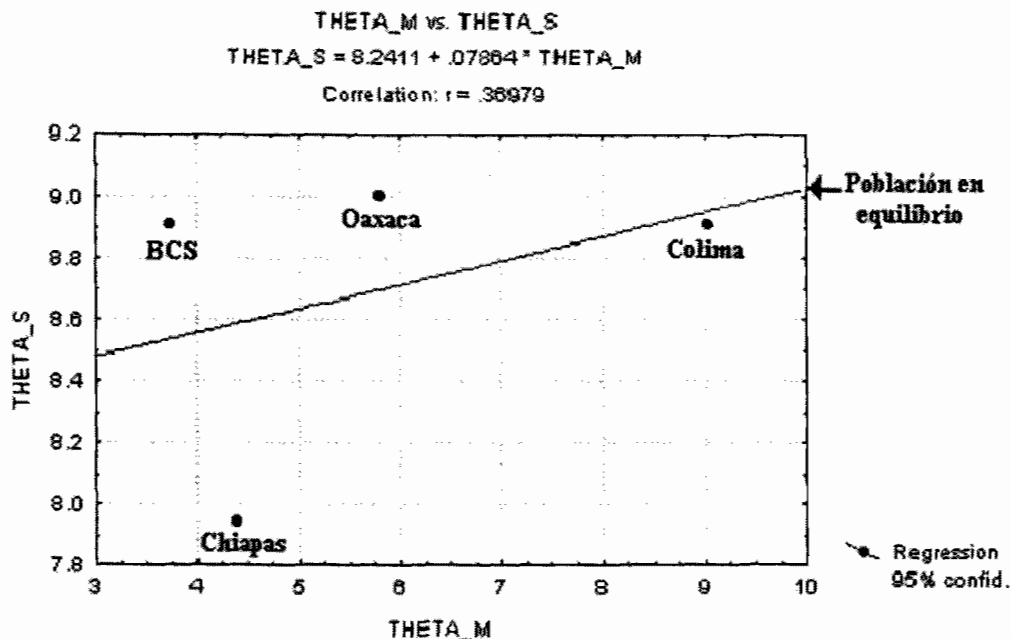


Figura 14.-Correlación de valores de los índices de  $\theta\pi = \theta_m$  y  $\theta_s$  de una región de *citocromo b*, en las cuatro muestras analizadas de *C. falciformis* en el Pacífico mexicano.

Tabla 5.-Valores de las pruebas de Neutralidad para las secuencias de los haplotipos de una región de *citocromo b* en *C. falciformis* del Pacífico mexicano.

Prueba de Neutralidad	Tajima		Ewens				Chakraborty			Fu	
	D	P	F-ob	F-es	P-W	P-S	Hom-ob	P-1	P-2	F	P-F
CHIAPAS	-0.84	0.185	0.7762	0.3618	1.00	0.985	0.7705	0.001*	0.001*	7.016	0.888
OAXACA	-0.22	0.451	0.7216	0.3163	1.00	0.968	0.7100	0.001*	0.002*	6.69	0.906
COLIMA	-0.30	0.436	0.4585	0.3177	0.920	0.626	0.4369	0.082	0.1241	10.833	0.981
BCS	-1.49	0.049*	0.789	0.320	1.00	0.985	0.7815	0.0004*	0.0004*	4.2763	0.783

D: índice de Tajima

P: valor de probabilidad de la prueba de Tajima

F-ob: valor de F observado

F-es: Valor de F esperado

P-W: probabilidad según el modelo de Waterson

P-S: probabilidad según el modelo de Slatkin

Hom-ob: Homocigosis observada

P-1: Probabilidad de que obtener K alelos

P-2: Probabilidad de obtener más de K alelos

P-F: Probabilidad de valor de F

## Estructura Poblacional

La prueba de homogeneidad de frecuencias alélicas por loci, de Raymond y Rousset (1995) en RAPD's, para conocer la distribución de las frecuencias entre las muestras analizadas en *C. falciformis* mostró diferenciación significativa en el 50% de los loci. Los cuales presentaron heterogeneidad en la distribución de las frecuencias entre las diferentes muestras, por lo que el valor total de probabilidad para el global de las frecuencias resultó altamente significativo  $P \leq 0.00001$  (ver Anexo B).

En la misma prueba analizando comparaciones entre pares de muestras, se observó heterogeneidad en todas las comparaciones, con valores significativos de  $P \leq 0.05$  (Tabla 6), los valores más significativos se presentaron en las comparaciones con la muestra de Chiapas, mientras que el valor de probabilidad en la comparación entre Baja California Sur y Oaxaca fue de  $P = 0.0448$  (Tabla 6).

En *C. falciformis* el índice de subdivisión poblacional  $F_{ST}$  para RAPD's, presentó valores individuales por loci de 0.002 a 0.367 para los loci A1.1 y B12.7 respectivamente. Las estimaciones de  $F_{ST}$  entre pares de muestras presentó diferencias importantes en todas las comparaciones, principalmente entre las poblaciones de Chiapas-Oaxaca, Chiapas-Colima y Chiapas-Baja California Sur, como se observó en el análisis de homogeneidad, por lo que se va observando un patrón importante de diferenciación de las muestras de Chiapas (ver anexo B).

Al realizar la prueba de hipótesis para determinar la significancia de cada valor obtenido del índice de theta por locus, encontramos que el 86.9% de los valores de probabilidad fueron significativos (ver anexo B), lo que posiblemente este reflejando la gran significancia que se presenta en las estimaciones entre pares de muestras correspondiente al 100% de significancia en las comparaciones (Tabla 6). Esto indica, una importante divergencia poblacional, corroborando la hipótesis de la existencia de estructura poblacional en esta especie.

Tabla 6.- Valores  $P$  de probabilidad para las estimaciones de la prueba exacta para RAPD's, para comparaciones entre pares de muestras de *C. falciformis*, \*valores significativos o muestras heterogéneas, por arriba de la diagonal y valores de índice  $F_{ST}$  para RAPD's entre pares de muestras para *C. falciformis* obtenidos a partir de RAPD's, abajo de la diagonal, con las desviaciones estándar \*valores significativos con  $P \leq 0.05$ .

Poblaciones	CHIAPAS	OAXACA	COLIMA	BAJA CAL. SUR
CHIAPAS	*****	0.00001*	0.00001*	0.00001*
OAXACA	0.1358* $\pm$ 0.0292	*****	0.0004*	0.0448*
COLIMA	0.1122* $\pm$ 0.0256	0.0929* $\pm$ 0.0189	*****	0.0012*
BCS	0.0921* $\pm$ 0.0191	0.0776* $\pm$ 0.0162	0.0844* $\pm$ 0.0230	*****

La prueba global de homogeneidad de frecuencias haplotípicas presentó diferencias significativas para *C. falciformis*. Esta misma prueba aplicada entre pares de muestras para la misma especie mostró que sólo las comparaciones de Chiapas-Oaxaca y Chiapas-Baja California Sur presentaron valores significativos, esto indica que son las únicas comparaciones de muestras que presentan heterogeneidad en la distribución de las frecuencias entre localidades (Tabla 7). Lo anterior coincide con el patrón encontrado a lo largo de los análisis realizados con RAPD's, donde es la muestra de Chiapas la que se observa con mayor diferencia. Sin embargo el valor global de la estimación de divergencia poblacional  $\Phi_{ST} = F_{ST}$  obtenido mediante el análisis de haplotipos, mostró que no existe una estructura poblacional en *C. falciformis* con un valor de  $\Phi_{ST} = 0.026$ .

Tabla 7.- Valores de probabilidad de la prueba exacta de homogeneidad de frecuencias haplotípicas, por arriba de la diagonal y valores de  $\Phi_{ST}$  entre pares de poblaciones de *C. falciformis* por debajo de la diagonal \*valores significativos con  $P < 0.05$ .

Poblaciones	CHIAPAS	OAXACA	COLIMA	BCS
CHIAPAS	*****	0.0237*	0.0748	0.0293*
OAXACA	0.0221*	*****	0.8324	0.1086
COLIMA	0.0043	0.0333*	*****	0.2455
BCS	0.0608*	-0.0276	0.0315*	*****

Una vez obtenidos los valores pareados de  $F_{ST}$  y  $\Phi_{ST}$  de los diferentes marcadores RAPD's (nuclear) y *citocromo b* (mitocondrial). Se realizó una correlación con ambos índices para conocer la relación entre estos y si existe un flujo genético diferencial entre sexos para *C.*

*falciformis*, ya que si se encuentran poblaciones con mayor diferenciación con RAPD's y menor con *citocromo b* se sugiere mayor flujo genético posiblemente entre hembras, mientras que si la divergencia es mayor con *citocromo b* y menor con RAPD's, es posible un mayor flujo genético generado por machos. Con base a lo anterior, se encontró una correlación positiva pero no significativa ( $r=0.3532$ ). Las comparaciones de Colima con las demás muestras sugieren un mayor flujo genético de machos mientras que las comparaciones de Chiapas con Oaxaca y con Baja California Sur y la comparación de estas dos últimas, sugieren mayor flujo genético de hembras (Figura 15).

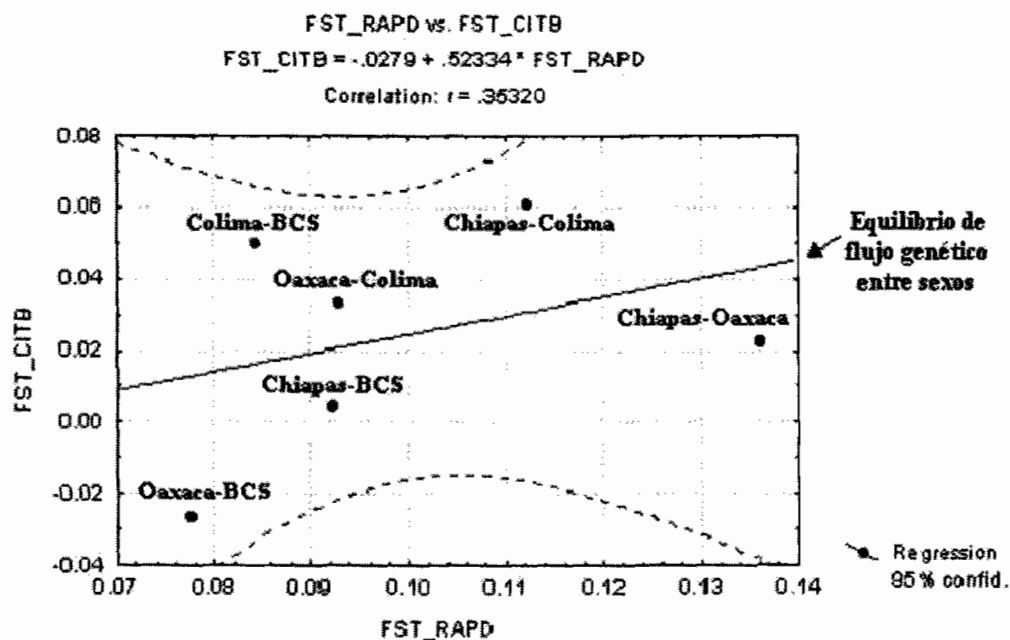


Figura 15.- Correlación de índices de divergencia poblacional  $F_{ST}$  entre pares de muestras de marcadores nuclear (RAPD's) y mitocondrial (*citocromo b*) para la especie de *C. falciformis*.

La prueba exacta de homogeneidad global para la especie en el análisis de secuencias, presentó valores de significancia  $P=0.015$  y para la comparación entre pares de poblaciones sólo mostró valores significativos en las comparaciones entre la población de Chiapas con las muestras de Oaxaca y Colima, mientras que el resto de las comparaciones resultaron ser homogéneas, principalmente las comparaciones que involucraron a la muestra de Baja California Sur (Tabla 8).

La estimación de divergencia poblacional  $F_{ST}$  mediante el análisis de secuencias entre pares de muestras resultó ser significativo únicamente para la comparación de Chiapas y Colima

con un valor de probabilidad de  $P=0.037$ , mientras que para el resto de las comparaciones no se observaron valores significativos (Tabla 8). La varianza interna más alta en las muestras con respecto a la frecuencia de sus haplotipos y a la composición de estos, fue para la muestra de Colima (0.5630; Tabla 8), misma que presentó la mayor cantidad de haplotipos diferentes.

Tabla 8.- Valores de probabilidad de la prueba exacta de homogeneidad entre pares de muestras mediante secuencias de la región de *citocromo b*, por arriba de la diagonal y valores de  $F_{ST}$  de secuencias entre poblaciones de *C. falciformis* por debajo de la diagonal \*valores significativos  $P<0.05$ .

	CHIAPAS	OAXACA	COLIMA	BCS
CHIAPAS	****	0.0257*	0.0455*	0.01167
OAXACA	0.0221	****	0.0798	0.0761
COLIMA	0.0608*	0.0332	****	0.0497
BCS	0.0042	-0.0262	0.0497	****

Mediante la prueba de AMOVA se obtuvo un valor de fijación de  $F_{ST}=0.0306$ , el cual resultó ser no significativo ( $P=0.0606$ ) lo que indica que no hay diferencias importantes entre poblaciones para la especie de *C. falciformis*, por lo que solo el 3.07% de la variación encontrada entre poblaciones se debe a factores genéticos. La ausencia de estructura poblacional encontrada en la prueba de AMOVA se corrobora con el valor de la estimación de  $\Phi_{ST}$  el cual es el análogo del estadístico  $F_{ST}$  de Wright para mtDNA y que presentó una estimación no significativa (0.108;  $P=0.056$ ). Sin embargo se encontró una diferencia significativa en el análisis con RAPD's, debido a las características del marcador (Tabla 9).

Tabla 9.- Varianza y porcentajes de variación entre poblaciones y dentro de poblaciones obtenidos mediante la prueba de AMOVA para una región de *citocromo b* de muestras de *C. falciformis*.

Variación	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	0.900	0.00497 Va	3.07
Dentro de las poblaciones	17.724	0.15685 Vb	96.93
Total	18.624	0.16182	



## Flujo Genético y Aislamiento por Distancia

Las estimaciones de distancias genéticas de Nei (1978) para RAPD's, entre pares de muestras mostraron valores que van de  $D = 0.056$  a  $0.096$  en *C. falciformis* (Tabla 10). Cabe destacar que no hay correspondencia entre los valores de distancia genética y los de distancia geográfica, ya que el valor menor es presentado en comparaciones de muestras que se encuentran alejadas entre sí (Baja California-Oaxaca) y la distancia mayor en muestras que están cercanas geográficamente, como es el caso de Oaxaca-Chiapas.

Esto se corrobora, de manera gráficamente en el análisis de agrupamiento con base en las distancias genéticas de Nei (1978) originadas de los datos de RAPD's donde se, agrupan las muestras de Oaxaca con Baja California Sur en un primer grupo, para conjuntar después a la muestra de Colima y Chiapas (Figura 16).

Tabla 10.- Estimaciones de distancia genética de Nei (1978) por debajo de la diagonal y valores de identidad genética por arriba de la diagonal, obtenidas a partir de RAPD's para *C. falciformis* del Pacífico mexicano .

Poblaciones	CHIAPAS	OAXACA	COLIMA	BCS
CHIAPAS	*****	0.9081	0.9299	0.9413
OAXACA	0.0964	*****	0.9331	0.9453
COLIMA	0.0727	0.0692	*****	0.9376
BCS	0.0605	0.0562	0.0644	*****

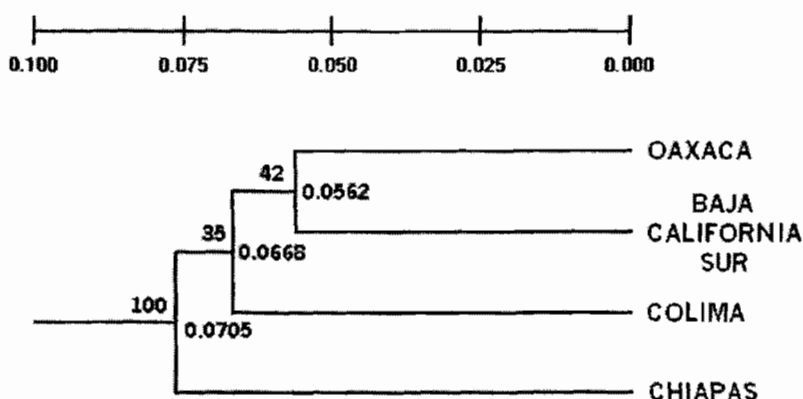


Figura 16.-Dendrograma con UPGMA de muestras de *C. falciformis* a partir en distancias genéticas de Nei, obtenidas mediante RAPD's.

Los valores de migrantes por generación para *C. falciformis* mediante la estimación de los valores de  $F_{ST}$  para RAPD's, presentaron los valores más altos de 6 a 5 organismos por generación, entre las muestras de Baja California Sur con la muestra de Oaxaca y de Chiapas, mientras que el valor más bajo fue para la comparación entre Oaxaca y Chiapas de 3 organismos por generación.

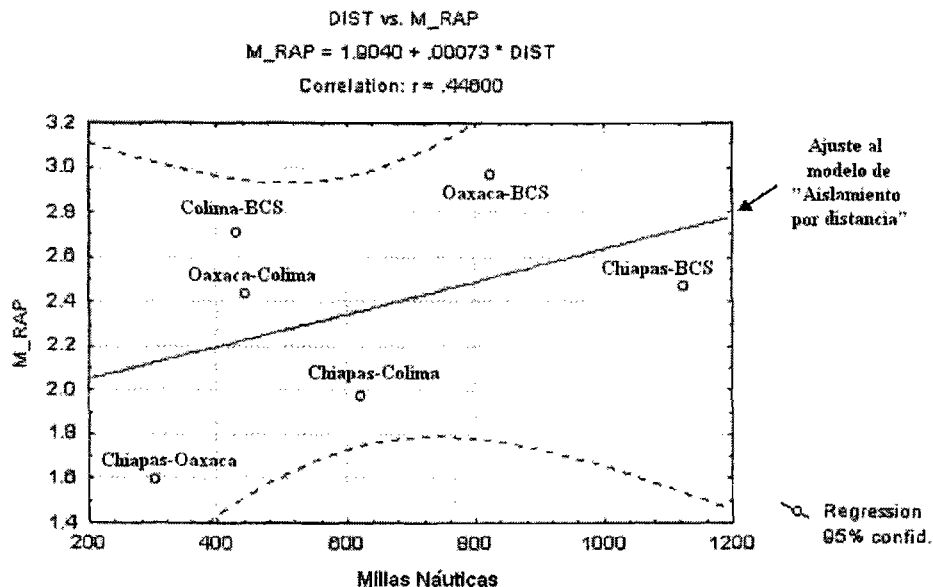


Figura 17.- Prueba de mantel para probar el ajuste al modelo de aislamiento por distancias para los datos de distancias genéticas y migrantes por generación obtenidos mediante RAPD's en *C. falciformis*.

Para analizar un posible aislamiento por distancia se correlacionaron las matrices de distancia genética de RAPD's con los valores de migrantes por generación entre pares de muestras, mediante una prueba de Mantel. Se encontró una correlación de  $r = 0.4429$  ( $P = 0.258$ ), lo que sugiere que no existe un aislamiento por distancia. También se realizó una correlación entre distancias geográficas y distancias genéticas de RAPD's, donde se obtuvo una correlación negativa de  $r = -0.6782$ , indicando que es compleja la relación de las muestras para *C. falciformis* (Figura 17).

Los valores obtenidos de la distancia genética ( $D$ ) mediante haplotipos presentan un intervalo de  $D = -0.002$  a  $0.014$  (Tabla 11) menor a los valores de distancias genética encontrados en el análisis de RAPD's. Se encontró un agrupamiento que presenta un arreglo diferente al de RAPD's, ya que este agrupan a Oaxaca y Colima, para después agregar las muestras de Chiapas y

Baja California Sur (Figura 18), esto nos indica una relación más estrecha de información genética mitocondrial y de flujo genético de hembras entre las muestras de Oaxaca y Colima.

Tabla 11.- Estimación de distancias genéticas de Nei (1978) de haplotipos entre pares de muestras de *C. falciformis*.

Poblaciones	CHIAPAS	OAXACA	COLIMA	BCS
CHIAPAS	*****			
OAXACA	0.0123	*****		
COLIMA	0.0060	0.0029	*****	
BCS	0.0101	0.0140	0.0078	*****

También se realizó la prueba de mantel para conocer el ajuste al modelo de aislamiento por distancia genéticas de los haplotipos, encontrando una correlación más alta que con RAPD's pero no significativa ( $r= 0.5906$ ,  $P=0.161$ ). En la correlación entre distancias genéticas de haplotipos y distancias geográficas de las muestras de *C. Falciformis*, presentó un valor negativo de correlación y no significativo ( $r=-0.7091$ ).

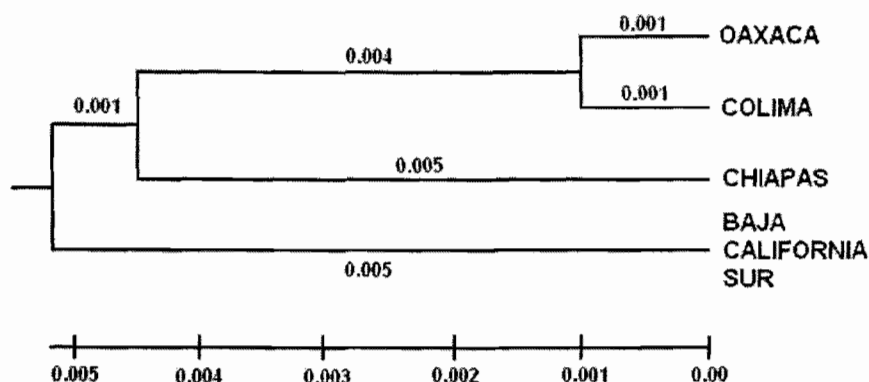


Figura 18.- Dendogramas con UPGMA para *C. falciformis* a partir de los datos de distancias genéticas de Nei, obtenidas mediante haplotipos.

Los valores de distancia genética de Slatkin (1995), obtenidos a partir de las secuencias de *citocromo b* presentaron valores relativamente bajos con un intervalo de 0 a 0.064 (Tabla 12), indicando que la composición molecular de las diferentes muestras de esta especie es muy similar, sin embargo cabe mencionar que la muestra de Oaxaca y Baja California Sur no presenta una distancia genética visible. Esto posiblemente se deba a que presentan frecuencias haplotípicas

muy similares, mientras que la muestra de Colima al ser comparada con el resto de las muestras, presento los valores más altos (Tabla 12). De forma gráfica esto se ve reflejado en el dendograma obtenido a partir de la distancia genética con bases en las secuencias analizadas de cada muestra, donde se observa un patrón similar al que se presentó en el análisis de RAPD's donde se agrupan principalmente Oaxaca y Baja California Sur para después agregarse Chiapas y Colima (Figura 19), estas dos últimas muestras no se agrupan según el patrón de RAPD's, posiblemente por la diferencia de nucleótidos de la secuencias de cada haplotipo en las dos muestras.

Tabla 12.- Número de migrantes por generación (valor de  $M=Nm$ ) obtenidos a partir de datos de secuencias, por debajo de la diagonal y valores de distancia genética (Slatkin, 1995) por arriba de la diagonal para *C. falciformis*.

	CHIAPAS	OAXACA	COLIMA	BCS
CHIAPAS	****	0.0226	0.0647	0.0042
OAXACA	22.08	*****	0.0344	0
COLIMA	7.71	14.51	*****	0.0523
BCS	118.48	Inf.	9.54	****

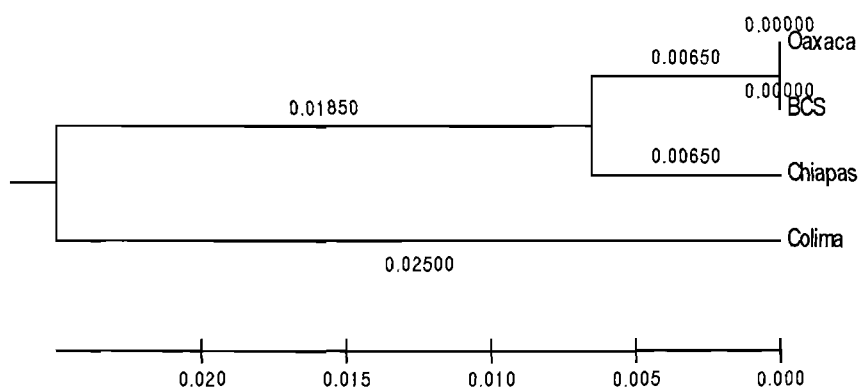


Figura 19.- Dendrograma con UPGMA obtenido a partir de la distancia genética de Slatkin, de las secuencias de los diferentes haplotipos de una región de *citocromo b* en diferentes muestras de *C. falciformis*, del Pacífico mexicano.

A partir de las secuencias de la región de *citocromo b* analizada, se obtuvo la cantidad de migrantes por generación donde encontramos los valores más altos de 118.48 migrantes para las poblaciones de Colima y Baja California Sur y el menor para las poblaciones de Colima y Chiapas de 7.71 (Tabla 12); El ajuste al modelo de aislamiento por distancia presentó una

correlación de  $r=0.6034$  no significativa ( $P=0.171$ ), indicando que no hay ajuste al modelo, de igual forma no se encontró una correlación entre distancias genéticas y distancias geográficas donde se presentó un valor de  $r=-0.5518$  (Figura 20).

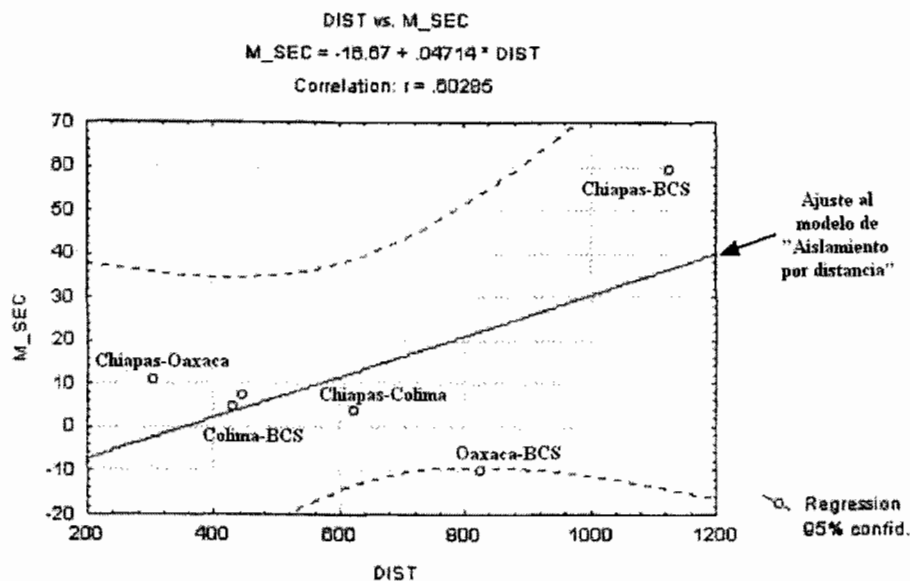


Figura 20.- Prueba de mantel para probar el ajuste al modelo de aislamiento por distancias para los datos de distancias genéticas y flujo genético obtenido mediante haplotipos en *C. falciformis*.

## Genealogía

Con base en las secuencias de *citocromo b* obtenidas de la técnica de SSCP's de las muestras de *C. falciformis*, se realizó una genealogía para los diferentes haplotipos encontrados y relacionar los agrupamientos con las diferentes localidades estudiadas, observando que los haplotipos comunes en las muestras, presentan una secuencia más reciente, como son el haplotipo A, B y G, que aquellos haplotipos que se presentan de manera específica en las poblaciones de Oaxaca (haplotipo D) y colima (haplotipo F) (Figura 21).

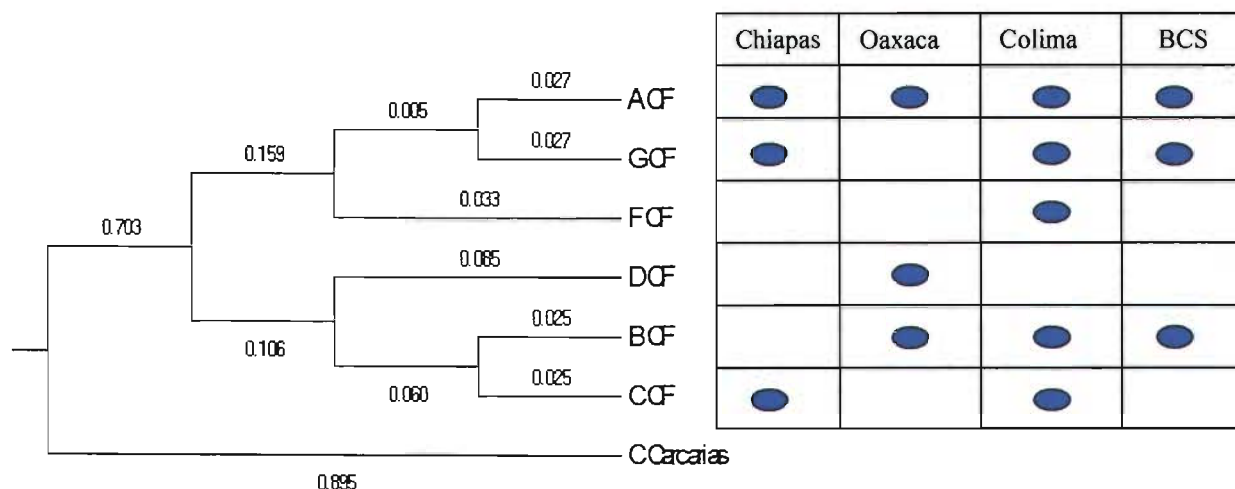


Figura 21.- Reconstrucción de la genealogía de los haplotipos de un fragmento de *citocromo b* en *C. falciformis* en diferentes localidades del Pacífico mexicano. mediante UPGMA.

De acuerdo a las diferencias entre las secuencias de los diferentes haplotipos se obtuvo la distribución de diferencias nucleotídicas significativa ( $P=0.028$ ), la cual no muestra una tendencia de acuerdo al modelo, en el que se espera una tendencia gradual, sino que se presentan dos picos importantes en esta especie, lo cual podría estar reflejando eventos evolutivos como cuellos de botella que sufrieron las poblaciones de estos organismos. (Figura 22).

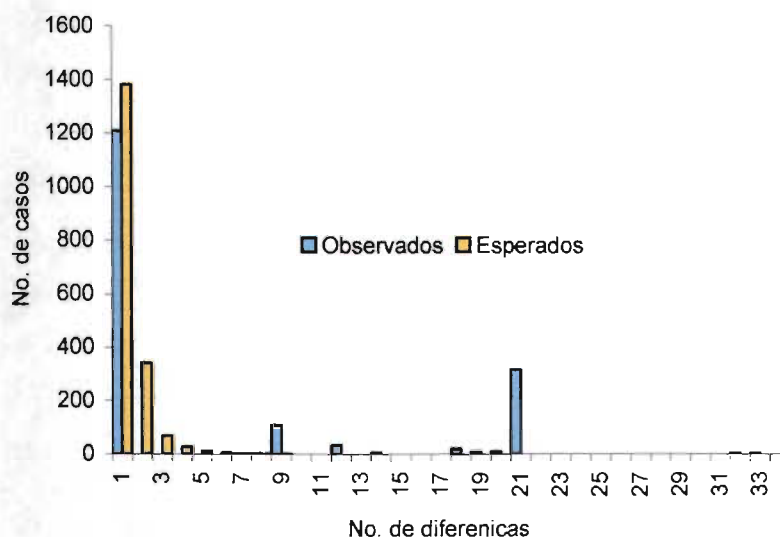


Figura 28.- Distribución de diferencias nucleotídicas para las secuencias de los diferentes haplotipos de *C. falciformis*.

*S. lewini***Diversidad Genética**

Para *S. lewini* se realizó también un ensayo con las diferentes series de “iniciadores”, de los cuales únicamente 4 “iniciadores” produjeron un número importante de bandas intensas y constantes en las muestras, produciendo un total de 28 loci amplificados, de los cuales 26 se utilizaron para el estudio de esta especie (Tabla 13).

Tabla 13.- “Iniciadores” seleccionados, secuencia nucleotídica, el número de fragmentos generados y loci analizados de cada “iniciador” para la especie de *S. lewini*.

Especie	Iniciadores	Secuencia	# de loci generados	# de loci analizados
<i>S. lewini</i>	OPF-1	5'-ACGGATCCTG-3'	9	9
	OPF-7	5'-CCGATATCCC3'	7	7
	OPF-13	5'-GGCTGCAGAA-3'	5	5
	OPF-15	5'-CCAGTACTCC-3'	7	5

Las frecuencias alélicas los loci analizados, las estimaciones de heterocigosis esperada y la probabilidad de la prueba exacta para cada locus, así como la heterocigosis total para cada muestra de *C. falciformis* se presentan en el anexo D.

Los valores de diversidad genética encontrados mediante el análisis de RAPD's en *S. lewini* presentaron un valor de diversidad elevado de  $He = 0.515$ , que se presentó en los loci F1.1 y F15.4 respectivamente, mientras que la diversidad más baja se observó en los loci F15.5 ( $He = 0.169$ ) y F13.4 ( $He = 0.215$ ). El valor de heterocigosis promedio más alto fue para la muestra de Nayarit, (0.378), mientras que el valor más bajo (0.273) se presentó en la muestra de Baja California Sur y de manera global el valor de diversidad total en la especie de *S. lewini*, fue de 0.386 (ver Anexo D).

De los cinco haplotipos identificados en *S. lewini* a partir de una región de *citocromo b* se observó que también hay un solo haplotipo como el más común en esta especie (Tabla 14). Con los datos de haplotipos se obtuvo la diversidad haplotípica para cada muestra de *S. lewini* con un intervalo de  $He = 0.102$  a  $0.6275$ , en las muestras de BCS y Chiapas respectivamente y un valor de diversidad haplotípica total para la especie de  $He_T = 0.380$  (Tabla 14).

Tabla 14.- Frecuencias haplotípicas y valores de diversidad haplotípica para las muestras de *S. lewini*, obtenidas a partir de 5 diferentes haplotipos de una región de *citocromo b*.

Muestras <i>S. lewini</i>	(N)	Diversidad esperada $H_e$	# de Haplotipos	Frecuencias Hhaplotípicas					Diversidad Haplotípica
				A	B	C	D	F	
CHIAPAS	9	0.3124	3	0.444	0	0	0.111	0.444	0.6275
NAYARIT	30	0.3780	3	0.767	0	0.066	0.066	0	0.4000
SINALOA	33	0.3247	2	0.741	0.259	0	0	0	0.3913
BCS	20	0.2730	2	0.94	0	0	0	0.052	0.1024
<b>Total</b>	92	0.3866							0.3803

Una vez identificados los 5 diferentes haplotipos se secuenciaron y se obtuvo un fragmento de 380 a 390 pb que después de eliminar las regiones correspondientes a la secuencia de los “iniciadores” utilizados, solo se analizaron 344 pb de cada uno de los haplotipos encontrados en la especie (ver Anexo E). De la comparación entre cada una de las secuencias, se obtuvo la información general de la composición del fragmento de *citocromo b* estudiado en *S. lewini*, que fue la siguiente:

- Número de transiciones observadas: 12
- Número de transversiones observadas: 21
- Número de sustituciones: 33
- Sitios polimórficos: 51
- Sitios con transiciones: 10
- Sitios con transversiones: 21
- Sitios con sustituciones: 30
- Sitios con deleciones: 25

La diversidad nucleotídica obtenida a partir de las secuencias analizadas mostró que la muestra de Chiapas presentó los valores más altos de diversidad tanto genética como nucleotídica. Esto mismo se observó en las estimaciones de diversidad molecular, donde los índices  $\theta_{Hom}$ ,  $\theta_S$ ,  $\theta_{\pi}$  muestran que también Chiapas tiene los valores más altos. Posiblemente esto se debe a que esta muestra presenta dos haplotipos en altas frecuencias, mientras que las muestras de Baja California Sur presentaron los valores más bajos en todos los índices de diversidad, con excepción del índice  $\theta_S$ , ya que seguramente, aunque su diversidad es baja presenta mayor cantidad de sitios segregantes que las muestras de Nayarit y Sinaloa (Tabla 15).



Tabla 15.- Índices de diversidad nucleotídica y molecular de 5 haplotipos detectados en una región de *citocromo b* en *S. lewini*

Muestra	Diversidad Genética	Diversidad Nucleotídica	$\theta_{Hom}$	$\theta_S$	$\theta\pi$
CHIAPAS	0.6667	0.0454	1.5188	11.0381	15.6356
NAYARIT	0.4069	0.0231	0.5109	7.5725	7.9691
SINALOA	0.3989	0.0139	0.4940	7.7832	4.7940
BCS	0.1053	0.0074	0.0879	8.5834	2.5691

El análisis de correlación entre índices  $\theta_S$  y  $\theta\pi$  en *S. lewini*, presentó un valor de correlación de  $r = 0.798$  y se observó que la muestra de Baja California Sur y Chiapas una relación que indica un crecimiento poblacional, mientras que la muestra de Sinaloa y Nayarit refleja un decremento de flujo genético o un posible cuello de botella. (Figura 23).

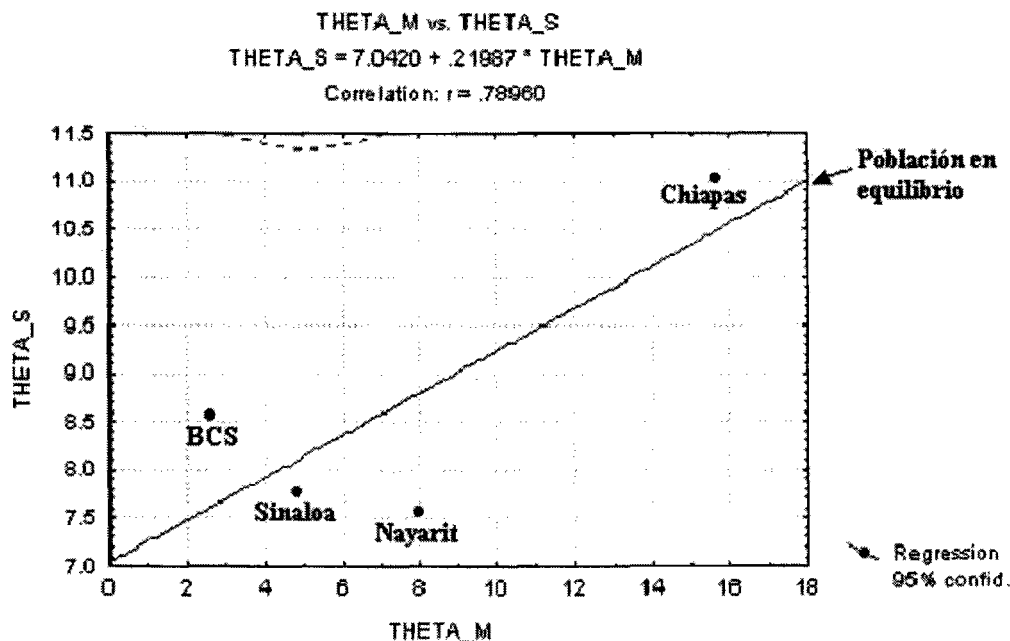


Figura 23.- Correlación de valores de diversidad nucleotídica e índice de sitios segregantes en las diferentes muestras analizadas de *S. lewini* en el Pacífico mexicano.

En las diferentes pruebas de Neutralidad, la prueba de Tajima presentó que las muestras de Nayarit y de Baja California presentan haplotipos fuera de neutralidad mientras que las otras dos muestras (Chiapas y Sinaloa) se encuentran con la una relación entre sitios segregantes y diversidad nucleotídica en equilibrio según la teoría del modelo concordando con la correlación de índices de  $\theta_S$  y  $\theta_\pi$ . Para la prueba de Ewens derivado por Slatkin, únicamente la muestra de Chiapas presentó valores significativos, ya que la frecuencia de los haplotipos en esta población se observó alta para dos de los tres que se presentaron. En la prueba de Chakraborty, también la muestra de Baja California Sur presentó valores significativos y de acuerdo con el análisis de esta prueba indica que esta muestra tiene una menor diversidad haplotípica que la esperada, posiblemente por la menor cantidad de haplotipos y por que uno de ellos presenta tendencia a fijarse. En las tres pruebas anteriores se sugiere que probables fuerzas selectivas puedan estar influyendo en la cantidad y frecuencia de haplotipos encontrados en estas poblaciones. Mientras que en la prueba de Fu, que, nos indica que existe neutralidad en esta especie, pues no se encontraron mayor número de electromorfos a los esperados (Tabla 17).

Tabla 17.-Valores de diferentes pruebas de neutralidad para una región de *citocromo b* de las muestras de *S. lewini*, con sus respectivos valores de significancia (\*).

Prueba de Neutralidad	Tajima		Ewens				Chakraborty			Fu	
	D	P	F-ob	F-ex	P-W	P-S	Hom-ob	P-1	P-2	F	P-F
<b>CHIAPAS</b>	1.52	0.958	0.4074	0.2707	1.00	0.030*	0.333	0.135	0.186	5.78	0.959
<b>NAYARIT</b>	-0.30	0.435	0.6066	0.3897	0.948	0.799	0.5931	0.059	0.080	13.16	0.988
<b>SINALOA</b>	1.77	0.971	0.6159	0.3818	0.937	0.871	0.6011	0.050	0.065	8.81	0.958
<b>BCS</b>	-2.44	0.000*	0.9002	0.3512	1.00	0.94	0.8947	0.0001*	0.0001*	2.63	0.703

### Estructura Poblacional

La prueba de homogeneidad de frecuencias de los loci analizados mediante RAPD's en *S. lewini*, mostró que el 30.76% de los loci analizados, presentaron estimaciones significativas ( $P \leq 0.05$ ); mientras que la prueba global para el análisis de las muestras presentó un valor de  $P$  notablemente significativo  $P \leq 0.00001$  (ver Anexo D). Los resultados de la misma prueba entre pares de muestras, también mostraron diferencias significativas en 50% de las comparaciones

mostrando heterogeneidad en la distribución de sus frecuencias alélicas, sólo en las comparaciones de Sinaloa con el resto de las muestras, mientras que en las demás comparaciones las frecuencias de los loci fueron homogéneas ( $P \geq 0.05$ ) (Tabla 18).

En la especie *S. lewini* el índice  $F_{ST}$ , obtenido mediante RAPD's presentó un intervalo de valores de 0.005 a 0.338 en los loci F1.7 y F13.3 respectivamente y al realizar la prueba de hipótesis para determinar la probabilidad de significancia de cada estimación de theta por locus, el 84.6% de los valores  $P$  de probabilidad resultaron significativos (ver anexo D). Los valores de  $F_{ST}$  entre pares de poblaciones de *S. lewini* presentaron un patrón de divergencia claro con diferencias importantes entre todas las comparaciones realizadas aunque resaltan las diferencias entre la muestra de Baja California Sur con el resto de las colectas y la de Sinaloa con la de Chiapas, mismas que proviene de regiones alejadas geográficamente, sin embargo, el 100% de las estimaciones entre pares de muestras fueron significativas a la prueba (Tabla 18), indicando así que con este marcador se observa una divergencia poblacional importante para la especie.

Tabla 18.- Estimaciones de probabilidad de heterogeneidad de frecuencias alélicas mediante la prueba exacta de comparaciones entre pares de muestras de *S. lewini* en el Pacífico mexicano por arriba de la diagonal \*valores significativos y valores de índice  $F_{ST}$  de RAPD's entre pares de muestras de *S. lewini*, debajo de la diagonal, con las desviaciones estándar \*valores significativos con  $P \leq 0.05$ .

Poblaciones	CHIAPAS	NAYARIT	SINALOA	BCS
<b>CHIAPAS</b>	*****	0.1561	0.0029*	0.0586
<b>NAYARIT</b>	0.1101* ± 0.0303	*****	0.0212*	0.0707
<b>SINALOA</b>	0.1690* ± 0.0456	0.0728* ± 0.0234	*****	0.0020*
<b>BCS</b>	0.1821* ± 0.0495	0.1220* ± 0.0252	0.1506* ± 0.0404	*****

La prueba de homogeneidad global para analizar la distribución de frecuencias haplotípicas en *S. lewini* resultó significativa, indicando heterogeneidad de las frecuencias en la especie, de igual forma la misma prueba entre pares de muestras de *S. lewini*, las comparaciones entre las muestras de Chiapas con las muestras de Nayarit, Sinaloa y Baja California y la comparación entre Baja California Sur con Sinaloa, resultaron con valores significativos, indicando heterogeneidad en la distribución de sus frecuencias haplotípicas, mientras que las comparaciones de Nayarit con Sinaloa y con Baja California Sur presentaron valores no significativos, por lo que se puede considerar como homogéneas (Tabla 18).

La estimación global del índice divergencia poblacional  $\Phi_{ST} = F_{ST}$  para los datos de haplotipo en la especie de *S. lewini*, mostraron que existe una divergencia poblacional, con un valor de  $\Phi_{ST} = 0.126$ , que corroboran una estructura genética poblacional como se observó con los datos de RAPD's. Las estimaciones de  $\Phi_{ST}$  entre pares de poblaciones mostraron que todas las comparaciones entre pares de muestras resultaron ser significativa, principalmente las comparaciones con la muestra de Chiapas y la comparación de Sinaloa con Baja California Sur, como se observó también en la prueba exacta (Tabla 18).

La correlación realizada para conocer la relación entre índices de divergencia poblacional de los diferentes marcadores RAPD's y *citocromo b* (nuclear y mitocondrial) en *S. lewini* presentó una relación significativa entre los valores, donde se observó una correlación de  $r=0.8037$ , indicando que las comparaciones se mantienen dentro de un margen de relación, que sugiere que las muestras Nayarit-Baja California Sur, Sinaloa-Baja California Sur y Chiapas-Sinaloa presentan una interrupción reciente de material genético y las muestras Nayarit-Sinaloa, Chiapas-Nayarit y Chiapas-Baja California Sur presentan mayor flujo genético de machos (Figura 24)

Tabla 19.- Valores de probabilidad de la prueba exacta de homogeneidad de frecuencias haplotípicas, por arriba de la diagonal y valores de  $\Phi_{ST}$  entre pares de poblaciones de *S. lewini* por debajo de la diagonal \*valores significativos con  $P < 0.05$ .

Poblaciones	CHIAPAS	NAYARIT	SINALOA	BCS
CHIAPAS	*****	0.0062*	0.00001*	0.01202*
NAYARIT	0.2132*	*****	0.1193	0.1768
SINALOA	0.2430*	0.0081*	*****	0.0123*
BCS	0.4017*	0.0478*	0.1359*	*****

En *S. lewini*, la prueba exacta global de homogeneidad de frecuencias para secuencias, presentó un valor significativo de heterogeneidad de  $P=0.00001$ ; de igual forma la misma prueba para el análisis de las comparaciones entre pares de muestras dio resultados significativos principalmente en la comparación entre la colecta de Chiapas con las demás muestras, patrón que se ha observado en todos los análisis entre pares de muestras, lo que indica que en este análisis de secuencias existe heterogeneidad de las frecuencias de las secuencias de los diferentes haplotipos

con excepción de las comparaciones de las muestras de Sinaloa y Baja California Sur con Nayarit que resultaron ser homogéneas (Tabla 20).

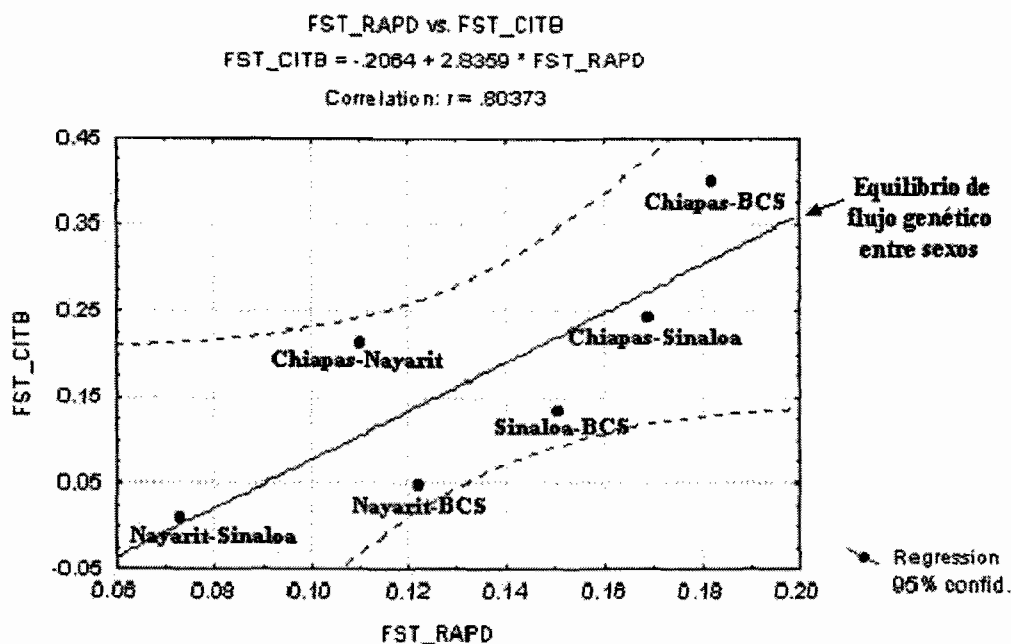


Figura 24.- Correlación de índices de divergencia poblacional  $F_{ST}$  entre pares de muestras de marcadores nuclear (RAPD's) y mitocondrial (*citocromo b*) para la especie de *S. lewini*.

De la misma forma se observa que el índice de divergencia poblacional obtenido mediante  $F_{ST}$  entre pares de poblaciones presentó, valores de subdivisión poblacional significativos entre todas las comparaciones de la población de Chiapas y la comparación de Baja California con Sinaloa, mismas que presentaron heterogeneidad de frecuencias haplotípicas en la prueba exacta, lo que confirma una vez más la presencia de una estructura poblacional para esta especie y principalmente para la muestras de Chiapas (Tabla 20).

Tabla 20.- Valores de  $F_{ST}$  entre poblaciones de *S. lewini*, obtenidos de secuencias, por arriba de la diagonal y valores de significancia de la prueba exacta para secuencias, por debajo de la diagonal. \*valores significativos de  $P \leq 0.05$ .

	CHIAPAS	NAYARIT	SINALOA	BCS
CHIAPAS	****	0.2131*	0.2429*	0.4016*
NAYARIT	0.0054*	****	0.0080	0.0478
SINALOA	0.0001*	0.1295	****	0.1359*
BCS	0.0044*	0.1821	0.0192*	****

Para la prueba de AMOVA en la especie de *S. lewini* mostró que hay diferencias significativas tanto dentro de las poblaciones como entre estas. Se obtuvo un índice de fijación de  $F_{ST}=0.1264$  y significativo ( $P=0.00196$ ), indicando que el 12.64% de las diferencias que se encuentran entre poblaciones se debe a factores genéticos y que hay un 87.36% de variación encontrada dentro de las poblaciones (Tabla 21). Todos los análisis anteriores concuerdan con los resultados de la prueba de AMOVA, sugiriendo una estructura genética poblacional para *S. lewini*, misma que se corrobora con el valor de la estimación de  $\Phi_{ST}$  para haplotipos 0.295,  $P=0.003$  y de  $F_{ST}$  para RAPD's 0.1199,  $P\leq 0.0005$  que presentaron estimaciones significativas y que ambos índices coinciden con las pruebas exactas de cada marcador. Lo anterior da indicios de una diferencia de las muestras de la parte norte (Nayarit, Sinaloa y Baja California Sur) con la del sur (Chiapas).

Tabla 21.-Varianza y porcentajes de variación entre poblaciones y dentro de poblaciones obtenidos mediante la prueba de AMOVA para una región de *citocromo b* de *S. lewini*.

Variación	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	2.136	0.02625 Va	12.64
Dentro de las poblaciones	14.699	0.18147 Vb	87.36
Total	16.835	0.20772	

### Flujo Genético y Aislamiento por Distancia

A diferencia de *C. falciformis*, los valores de distancia genética de (Nei 1978) obtenidos mediante RAPD's para la especie de *S. lewini* presentaron una concordancia, con las distancias geográficas, ya que el valor de distancia genética más alto (0.103) corresponde a la comparación de Sinaloa-Chiapas que son muestras alejadas entre si y el valor más bajo (0.042) se presentó en muestras cercanas geográficamente como Sinaloa-Nayarit (Tabla 22).

Con base en las distancias genéticas de Nei (1978) originadas de los datos de RAPD's se realizó un dendograma de las muestras mediante el método de UPGMA para confirmar gráficamente la relación entre las muestras cercanas y lejanas de acuerdo con lo mencionado anteriormente. Se encontró que los dendogramas de *C. falciformis* muestran una relación más estrecha entre muestras cercanas que entre muestras alejadas (Figura 25) corroborando lo encontrado a lo largo de los análisis.

En el caso de *S. lewini*, el número de migrantes por generación, presentó un intervalo de 2 a 6 migrantes por generación, más amplio que el que presentó *C. falciformis*, estos datos están relacionados con los análisis de divergencia poblacional realizados para la especie en este estudio, ya que muestras relativamente cercanas como Nayarit y Sinaloa presentaron el valor más alto de 6 migrantes, mientras que el valor más bajo, fue para Chiapas y Baja California Sur, que son poblaciones alejadas entre sí, lo cual resulta apegarse a la geografía.

Para probar el modelo de aislamiento por distancia con datos de RAPD's se realizó una prueba de Mantel con migrantes y distancias geográficas, encontrando un valor de correlación negativo de  $r=-0.6584$  y no significativo ( $P=0.156$ ), indicando que solo el 65% se ajusta al modelo y por lo tanto no existe tal ajuste. Se corroboró que existe una relación más estrecha entre distancias genéticas y geográficas con la prueba de mantel que se realizó entre distancia geográficas y genéticas, presentando el valor de correlación  $r= 0.7971$ , indicando que el modelo explica el 79.7% de relación entre las distancias genéticas de las muestras, con la distancia oceanográfica entre estas, sin embargo con los valores de  $F_{ST}$  se presentó una correlación positiva pero menor ( $r=0.6971$ ) a la de distancias genéticas (Figura 26).

Tabla 22.- Estimaciones de distancia genética de Nei (1978), por debajo de la diagonal y valores de identidad genética por arriba de la diagonal, obtenidos mediante RAPD's en *S. lewini* del Pacífico mexicano.

Poblaciones	CHIAPAS	NAYARIT	SINALOA	B. C. S.
CHIAPAS	*****	0.9293	0.9013	0.9067
NAYARIT	0.0733	*****	0.9583	0.9341
SINALOA	0.1039	0.0426	*****	0.9231
B. C. S.	0.0979	0.0682	0.0800	*****

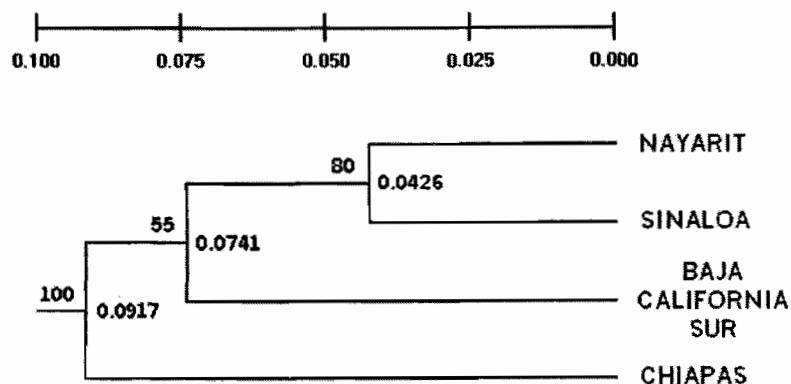


Figura 25- Dendrograma con UPGMA del agrupamiento de las muestras de *S. lewini* basados en distancias genéticas de Nei (1978) mediante RAPD's.

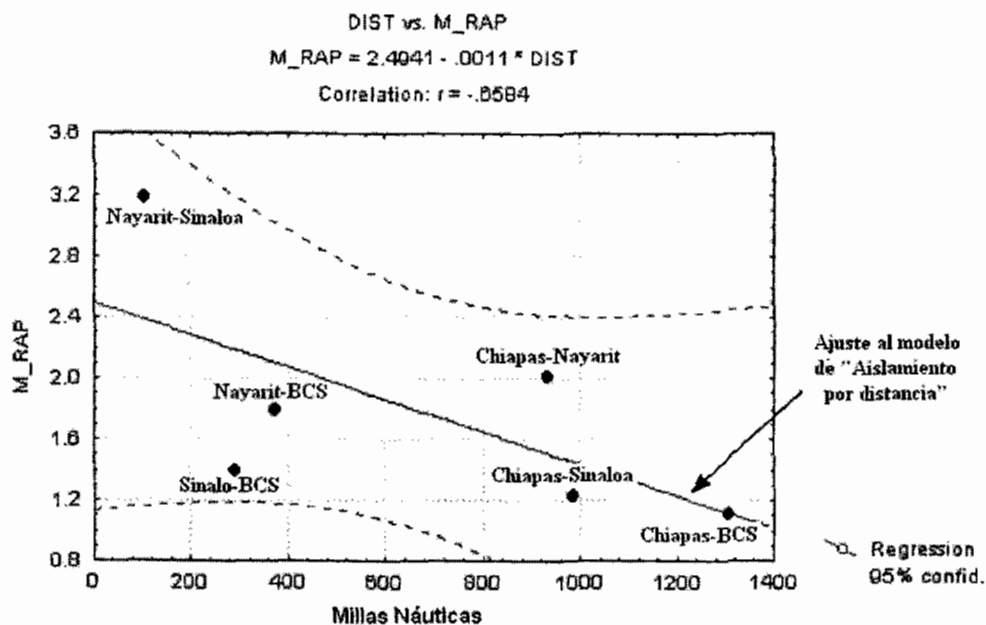


Figura 26.- Prueba de mantel para probar el ajuste al modelo de aislamiento por distancias para los datos de distancias genéticas y migrantes por generación obtenidos mediante RAPD's en *S. lewini*.

Los valores de distancia genética de Nei (1978), obtenidos mediante haplotipos de *S. lewini* presentaron un intervalo de  $D = 0.010$  a  $0.369$  (Tabla 23), más amplio que el que se observó en *C. falciformis*. Además de que se observa que los valores más bajos corresponden a las muestras que se encuentran cercanas geográficamente como son Nayarit, Sinaloa y Baja California Sur, mientras que los valores de distancia genética más altos se presentaron en las comparaciones de las muestras anteriores con la muestra de Chiapas, patrón que era de esperarse ya que en los análisis de divergencia de haplotipos también es la muestra de Chiapas la que muestra mayor divergencia de las demás.

Lo anterior se observó gráficamente mediante el dendograma con base en las distancias genéticas con el método de UPGMA, que mostró una tendencia similar a la de RAPD's donde se agrupan las poblaciones más cercanas geográficamente como Nayarit, Baja California Sur y Sinaloa, mientras que se deja en una rama separa del grupo anterior a la muestra de Chiapas (Figura 27).

El ajuste al modelo de aislamiento por distancia con los datos de haplotipos no presentó valores significativos ( $r = -0.6560$   $P = 0.079$ ), También la correlación de los valores de distancia genética del análisis de haplotipos y los datos de distancia geográfica mostró una correlación importante de información con un valor positivo para *S. lewini* ( $r = 0.881$ ), indicado que aunque



no hay un ajuste al modelo de aislamiento por distancias, existe una relación del 94% entre la divergencia poblacional con algunos elementos geográficos para la especie de *S. lewini*.

Tabla 23.- Estimaciones de distancias genéticas de Nei (1978) obtenidas a partir de haplotipos para pares de muestras de *S. lewini*.

Poblaciones	CHIAPAS	NAYARIT	SINALOA	BCS
CHIAPAS	*****			
NAYARIT	0.3060	*****		
SINALOA	0.3691	0.0175	*****	
BCS	0.2632	0.0103	0.0519	*****

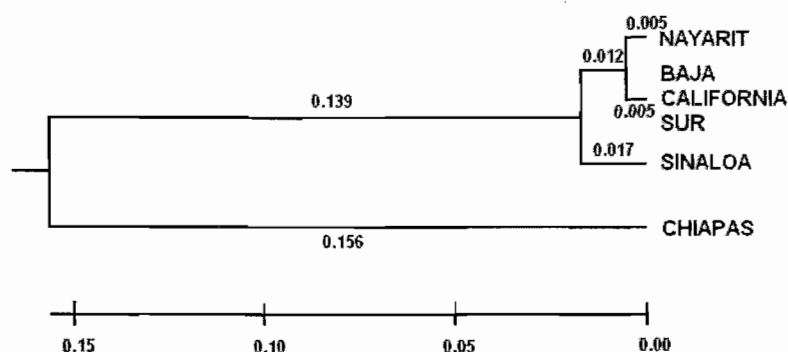


Figura 27.- Dendogramas con UPGMA para *S. lewini* con base en datos de distancias genéticas de haplotipos.

Los valores de distancia genética de Slatkin (1995) de las secuencias de los haplotipos, en *S. lewini*, fueron mayores que los observados en *C. falciformis*, presentando intervalos de  $D=0.008$  a  $0.671$  (Tabla 24), indicando que la diferencia en la composición molecular de la muestra de Chiapas de *S. lewini* es mayor que en el resto de las poblaciones, mientras que las muestras relativamente más cercanas geográficamente resultaron tener distancias genéticas menores. Con los valores de distancia a partir de secuencias se realizó un dendrograma para conocer gráficamente el agrupamiento de las muestras según sus secuencias, encontrando un patrón muy similar al obtenido en los otros análisis, muestras cercanas geográficamente se agrupan y dejan a la muestra de Chiapas separadas de las anteriores (Figura 28).

Tabla 24.- Número de migrantes por generación (valor de  $M=Nm$ ) por debajo de la diagonal y valores de distancia genética de Slatkin (1995) de secuencias para *S. lewini* por arriba de la diagonal.

	CHIAPAS	NAYARIT	SINALOA	BCS
CHIAPAS	****	0.2709	0.3209	0.6713
NAYARIT	1.84	*****	0.0081	0.0502
SINALOA	1.55	61.46	*****	0.1572
BCS	0.74	9.95	3.17	****

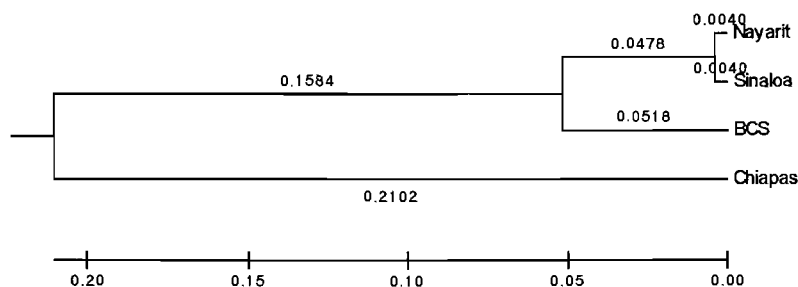


Figura 28.- Dendrograma con UPGMA obtenido a partir de la distancia genética de las secuencias de los diferentes haplotipos para una región de *citocromo b* en diferentes muestras de *S. lewini*.

Con base en las secuencias de *citocromo b* se obtuvo la cantidad de migrantes por generación, se encontró un patrón similar al de RAPD's, por lo que el mayor número de migrantes se da entre poblaciones cercanas como Nayarit y Sinaloa con 61.46 migrantes por generación y la menor cantidad de migrantes entre Baja California Sur y Chiapas, las muestras más lejanas entre sí, fue de 0.74 (Tabla 24). Con estos datos se probó el modelo de aislamiento por distancia y se encontró un valor de  $r = -0.6557$ , similar al de RAPD's y al de haplotipos por lo que se puede concluir que no hay ajuste al modelo. Sin embargo puede resultar compleja esta relación ya que las distancias genéticas muestran un valor menor de  $r = 0.4655$  (Figura 29).

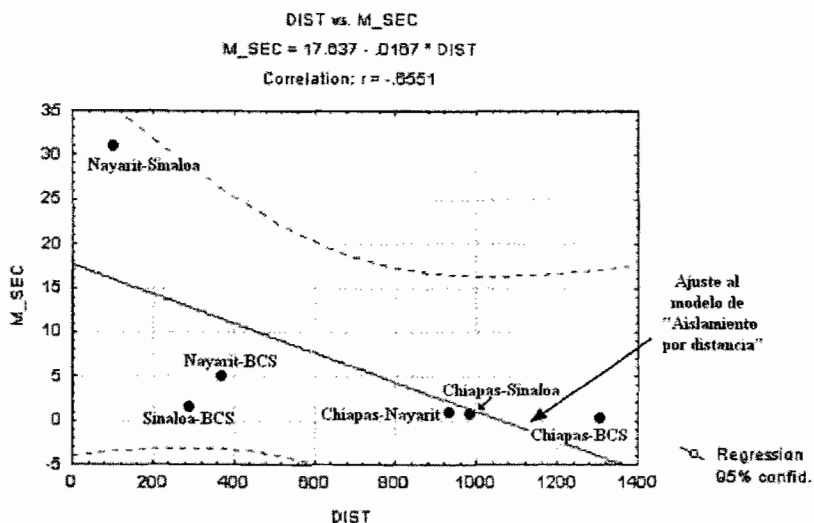


Figura 29.- Prueba de mantel para probar el ajuste al modelo de aislamiento por distancias para los datos de distancias genéticas y migrantes por generación obtenidos mediante secuencias para *S. lewini*.

### Genealogía

Con las secuencias de los cinco diferentes haplotipos de *citocromo b* analizado en *S. lewini* mediante la técnica de SSCP's, se realizó la genealogía de los haplotipos y se observó que el haplotipo A que es el más común en la especie de tiburón martillo presentó la secuencia más antigua a diferencia de los haplotipos que se presentan de manera esporádica como el C y B, que muestran una secuencia de origen más reciente, además de que se observa una genealogía con un patrón monofilético donde el posible ancestro común para estos haplotipos es el A (Figura 30).

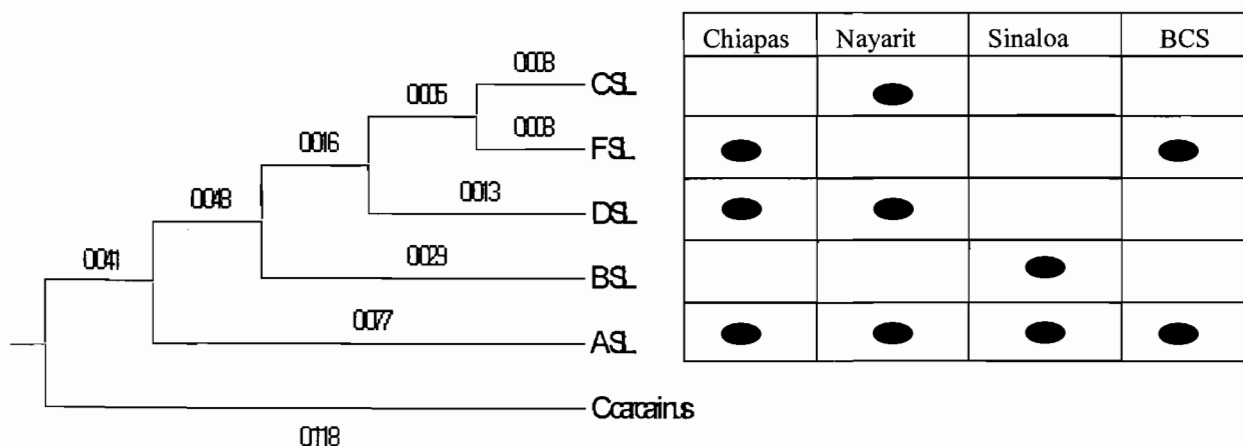


Figura 30.- Reconstrucción de la genealogía de los haplotipos de un fragmento de *citocromo b* de *S. lewini* en diferentes localidades del Pacífico mexicano, mediante UPGMA.

Con base en las diferencias de las secuencias de *citocromo b* de *S. lewini*, se obtuvo una distribución de diferencias nucleotídicas significativa ( $P=0.027$ ), que presenta diversos picos de intensidad donde se agrupan las diferencias entre secuencias de cada muestra, observando cinco principales picos. Dos principales que pueden estar reflejando un importante evento evolutivo en las diferentes poblaciones de *S. lewini*, principalmente para las muestras de Sinaloa y Nayarit que presentan estos dos últimos picos. De acuerdo a la gráfica de distribución no se observa un modelo en el cual las diferencias presentan un gradiente, sin embargo es posible que el efecto de encontrar una serie de picos diferentes puede estar indicando algún error de muestro (Figura 31).

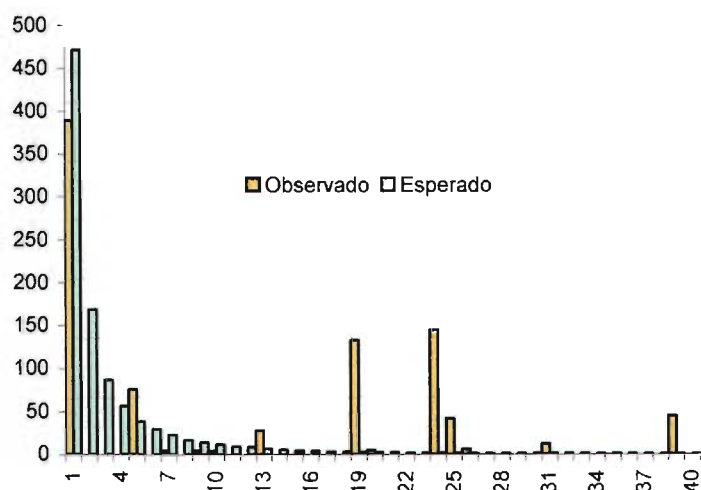


Figura 31.- Distribución de Diferencias nucleotídicas para las diferentes secuencias de los haplotipos de *citocromo b* para *S. lewini*.

## DISCUSIÓN

En cuanto a la filogenia, principalmente del orden de los Carcharhiniformes, mediante la región de *citocromo b* analizada en el presente trabajo, coincide con las reconstrucciones filogenéticas reportadas por Martín et al (1992) y Martín (1995), mediante información mitocondrial, en donde el género *Sphyrna* es de los más recientes dentro del grupo de tiburones. La especie de *Carcharodon carcharias* se presenta correctamente separado de los anteriores ya que esta especie pertenece al Orden de los Lamniformes.

### *C. falciformis*

La diversidad encontrada en *C. falciformis* con DNA nuclear resultó ligeramente mayor ( $He = 0.42$ ) que la encontrada en mtDNA ( $He_T = 0.331$ ). La razón por la que se observa una mayor diversidad con RAPD's se debe posiblemente a que estos analizan todo el DNA nuclear y por probabilidad se puede encontrar mayor cantidad de sitios polimórficos, mientras que del marcador mitocondrial analizado únicamente se obtuvo la diversidad contenida en un fragmento menor a 380 pb. Aunque el *citocromo b* es un gen funcional, acumula mutaciones a tasas menores que algunos genes nucleares como son las regiones de DNA no codificantes, que pudieron ser amplificadas con RAPD's.

De las diferentes muestras analizadas de *C. falciformis*, la muestra de Colima fue la que presentó la mayor diversidad con ambos marcadores (RAPD's: 0.40 y DNA mitocondrial: 0.55). También en el análisis de secuencias la muestra de Colima mostró los valores de diversidad molecular más altos, ya que presentó el mayor número de haplotipos y la mayor cantidad de diferencias entre nucleótidos de sus diferentes secuencias. Además de que fue la única muestra que presentó secuencias en condiciones de neutralidad, indicando que la población de Colima se encuentra en equilibrio, por lo que no presenta un factor de selección para la región analizada.

Los altos niveles de diversidad y condiciones de neutralidad en la muestra de Colima pueden deberse a que se ha mantenido un tamaño estable en esta población. También la ubicación de esta población en una zona de mezcla de corrientes, como la Corriente de California y la Contracorriente Norecuatorial, se puede favorecer el aporte de variación genética a la población, por el desplazamiento y la concentración de algunos organismos provenientes de zonas del norte y sur del Pacífico (ver Figuras 10 y 32).

La población de Baja California Sur presentó, de manera general, los valores más bajos de diversidad en todos los análisis, principalmente en el de secuencia de fragmentos del *citocromo b*.

Se puede pensar que las características oceanográficas que presenta el Golfo de California, sitio de origen de la muestra de Baja California Sur, funcionan como barreras en ciertos períodos estacionales. Esto puede ser una posible limitante, ya que aunque hay una gran cantidad de surgencias en la boca del Golfo de California, es posible que los movimientos de las masas de agua que originan las Corrientes de California y la Corriente Norecuatorial, impidan la libre migración de individuos al interior del Golfo de California (Ver figura 32).

Además de que los organismos de la especie de *C. falciformis* generalmente se mantienen en temperaturas de 23° a 26° C y durante la primera mitad del año cuando la Corriente de California presentar temperaturas de 15° a 20°, podría limitar el flujo genético de poblaciones del norte con las del sur. Sin embargo en la segunda mitad del año, cuando la Corriente de California es más débil se pueden originar migraciones de norte a sur, contribuyendo así a la diversidad de otras poblaciones, como las de Colima.

El resto de las muestras, se encontraron fuera neutralidad mediante algunas de las pruebas, principalmente la muestra de Baja California Sur. Además se observó un crecimiento poblacional reciente para las muestras de Baja California Sur y Oaxaca, mientras que la población de Chiapas posiblemente sufrió un cuello de botella, ya que presentó los valores más bajos de sitios segregantes a los esperados. Estos cambios en las poblaciones de *C. falciformis* se reflejan también en el análisis de distribución de diferencias nucleotídicas donde hay dos picos importantes registrados como alteraciones en los tamaños poblacionales.

Aunque los RAPD's y los haplotipos muestran un patrón de divergencia principalmente en las muestras de Chiapas y Baja California con el resto de las muestras, el análisis de secuencias presentó solo diferencias para la comparación de Chiapas-Colima, sin embargo el valor global de  $F_{ST}$  de secuencias no fue significativo, indicando que no existe una divergencia poblacional. Esto coincidió con la prueba de AMOVA donde solo se explica que el 3% de las diferencias encontradas se deben a factores genéticos. Por lo tanto, el análisis de mtDNA no permitió detectar una estructura genética poblacional en la especie.

Una posible explicación a las diferencias encontradas con RAPD's es el efecto de sorteo de linajes, indicando que las relaciones entre poblaciones de esta especie en el Pacífico Mexicano son complejas. En cuanto al análisis de haplotipos que presentó diferencias entre algunas muestras, puede deberse a una dispersión mayor en machos que en hembras en determinados periodos, ya que los períodos de reproducción simultáneos, en el Golfo de Tehuantepec como frente a las costas de Zihuatanejo y de Puerto Vallarta, sea una limitante tiempo y distancia que

origina menor flujo genético entre organismos de las regiones norte y sur del Pacífico Mexicano, como puede ser el caso de Chiapas y Baja California Sur.

El agrupamiento de *C. falciformis*, resultado del análisis de RAPD's, muestra claramente la presencia de un grupo formado por las muestras de Oaxaca y Baja California, al que se le adjuntan las poblaciones de Colima y Chiapas con mayor distancia genética. En el análisis de haplotipos se observó una agrupación diferente, formando un grupo por organismos provenientes de Oaxaca y Colima al que se le adjuntan las poblaciones de Chiapas y Baja California Sur. Estas diferencias se pueden deber al grado de heterogeneidad encontrada, al tipo de marcador, al tipo de herencia y a las posibles tasas de mutación de los loci analizados, sugiriendo así que el agrupamiento de haplotipos podría ser la representación más reciente considerando que su tamaño efectivo poblacional es menor debido al tipo de herencia, mientras que el agrupamiento por RAPD's podría estar reflejando las condiciones de agrupamiento y tiempos anteriores.

La prueba de Mantel en ambos marcadores no mostró ajuste al modelo de aislamiento por distancia, esto junto con los resultados de divergencias poblacional significativos para RAPD's y no significativos el caso de secuencias, sugieren una complejidad en el flujo genético de la especie que puede estar relacionada con las características de amplia dispersión y a la distribución semioceánica de *C. falciformis* con la influencia de Corriente Oceánicas en determinados períodos y épocas.

La genealogía de los haplotipos de la región de *citocromo b* analizada en *C. falciformis*, no concuerda mucho con la frecuencia de dichos haplotipos en las poblaciones, ya que permitiría pensar que el alelo más común en las muestras, sería el que podría tener más antigüedad en la especie, mientras que los menos comunes corresponderían a los polimorfismos más recientes y que por lo tanto su frecuencia en las poblaciones fuera baja.

### ***S. lewini***

En la especie *S. lewini*, la diversidad encontrada mediante RAPD's y haplotipos tuvo valores semejantes,  $H_e = 0.3866$  y  $\Phi = 0.3803$ . El valor más alto de diversidad encontrado en los haplotipos se presentó en la muestra de Chiapas, valor que puede estar sobreestimado debido a que el tamaño de esta muestra es únicamente de nueve organismos y se observó un contenido importante de haplotipos. Esto puede deberse a efectos de muestreo, que por azar se colectaron organismos con diferentes haplotipos, ya que de haber obtenido una mayor cantidad de muestras de esta localidad, posiblemente se encontrarían el mismo número de haplotipos y que al incrementar la muestra se originaría que la diversidad no fuera tan alta como la encontrada

mediante haplotipos. Sin embargo, en el análisis de RAPD's la muestra de Chiapas presentó valores de diversidad similares al resto de las muestras analizadas, probablemente debido a que en este análisis se evaluaron mayor cantidad de loci.

Los valores más bajos de diversidad, al igual que en *C. falciformis*, se presentaron en la muestra de Baja California Sur. Como ya se ha mencionado, en el caso de *C. falciformis* puede deberse a que las poblaciones cercanas al Golfo de California, que poseen mayor diversidad, no realicen migraciones importantes hacia el norte, debido a que la presencia de la Corriente de California que se desplaza de norte a sur, puede impedir el desplazamiento al interior del Golfo de California (ver Figura 32).

La diversidad nucleotídica presenta el mismo patrón detectado mediante el análisis de RAPD's y haplotipos, con la mayor diversidad en la población de Chiapas y Nayarit, mientras que la diversidad más baja fue para Baja California Sur. Esto posiblemente puede indicarnos que el tamaño efectivo de la muestra de Baja California Sur tienda a ser pequeño y por ello, fuerzas evolutivas como la deriva, pueden estar actuando sobre algunos de los haplotipos de la región del *citocromo b* de organismos de *Sphyrna lewini* de esta región, aunque la relación entre índices de diversidad molecular muestran de manera general hay cierto equilibrio poblacional en todas las muestras. Sin embargo como era de esperarse por la cantidad de haplotipos y la frecuencias de estos, algunas pruebas de neutralidad muestra fuera de neutralidad a la población de Baja California Sur y la de Chiapas que presentaron rangos de diversidad genética y nucleotídica diferente a la esperada.

En *S. lewini*, se observó una heterogeneidad de frecuencias importante en los diferentes datos obtenidos, de igual forma se presentaron notorios valores de subdivisión poblacional con ambos marcadores, mediante los tres análisis realizados (RAPD's, haplotipos, secuencias de fragmentos), confirmando la presencia de una estructura poblacional en esta especie en el Pacífico Mexicano. La diferenciación se presentó principalmente en las muestras de Chiapas y Baja California Sur. Es posible que los desplazamientos que realizan los organismos de estas muestras se limiten a determinadas zonas, lo que originaría que el flujo genético sea mayor sólo entre algunas poblaciones, propiciando así una heterogeneidad en el acervo genético analizado.

*S. lewini* mostró divergencia poblacional elevada con los datos mitocondriales, tanto en el análisis de haplotipos como en de secuencias mediante el análisis de AMOVA, indicando que ambos acercamientos metodológicos detectaron las diferencias poblacionales en esta especie. Esto indica un posible desplazamiento divergente entre hembras, lo que resulta congruente con los trabajos que actualmente se están realizando, que sugieren zonas de crianza particulares de las



hembras de esta especie relacionadas con zonas de mayor captura: la del Golfo de Tehuantepec y una región más al norte frente a las costas de Michoacán en el Pacífico mexicano (FAO, 1994a y 1994b).

La divergencia genética poblacional encontrar en las muestras de *Sphyrna lewini* puede estar relacionada con las características de distribución de los organismos de esta especie, ya que son más costeros que *C. falciformis* y por lo tanto se mantienen en aguas más cálidas, de tal forma que el desplazarse a otras regiones del Pacífico implica un mayor gasto energético el cual puede ser ahorrado si en las regiones más cercanas presentan las condiciones adecuadas para su desarrollo. Aunado a esto se puede observar un efecto de filopatria donde las hembras retornan a zonas de origen para reproducción y alumbramiento, además de que las agrupaciones en cohortes que se han observado en esta especie pueden contribuir también a la diferenciación poblacional.

De los resultados de la distribución de diferencias nucleotídicas (mismatch) se observaron diversos picos que principalmente corresponden a las muestras de Sinaloa y Nayarit, las cuales mostraron según la relación de sitios segregantes y diversidad de nucleótidos que han sufrido algún efecto de cuello de botella lo cual se confirma con la distribución de diferencias nucleotídicas.

El agrupamiento de *S. lewini* realizado con datos de RAPD's y haplotipos muestra una agrupación principal formada por los organismos de muestras cercanas entre sí como Nayarit, Sinaloa y Baja California Sur, mientras que la muestra de Chiapas se separa del grupo anterior de manera clara. Esto puede deberse a que es una población que se encuentra alejada geográficamente de las anteriores y a que se encuentra en una zona más cercana al Ecuador donde corrientes como la de Perú y la Costanera de Costa Rica, pueden estar realizando un aporte importante de organismos a la zona del Golfo de Tehuantepec para su reproducción y alimentación (ver Figura 32). Estos agrupamientos corresponden con la distribución geográfica, uniendo a las poblaciones cercanas entre sí en un grupo principal y a Chiapas agrupándola como el grupo más diferente, concordando con que es la muestra más alejada. Lo anterior coincide con los valores de correlación entre distancias genéticas y geográficas del 79% con datos provenientes de RAPD's y 88% con datos de haplotipos, sin embargo al no encontrar una probabilidad significativa al ajuste del modelo de aislamiento por distancia, se puede sugerir que el flujo genético que se presenta entre las muestras analizadas no presenta barreras completamente definidas.

Los resultados en la genealogía de haplotipos de *Sphyrna lewini*, mostraron que el haplotipo "A" fue el más antiguo y corresponde al más común en la especie ya que se encuentra

en todas las muestras, mientras que los haplotipos sugeridos como los más recientes se encuentran únicamente en las muestras de Chiapas y Baja California Sur (haplotipo "C") y en la muestra de Nayarit (haplotipo "F"), indicando así que las muestras con cambios más recientes corresponderían principalmente a las muestras de Baja California Sur como lo sugieren diversos resultados de este trabajo.

Es concluyente que existe una estructura poblacional en *Sphyrna lewini* que puede estar relacionada directamente con una dispersión diferencial de sexos, por efecto filopátrico, aunado a esto el efecto de influencia de las corrientes de California y Contracorriente Norecuatorial como barreras temporales en el desplazamiento de organismos de la especie.

En los aspectos biológicos, se ha observado que *C. falciformis* es un organismo más solitario y más oceánico que *S. lewini*, lo que puede facilitar su desplazamiento y por lo tanto, originar mayor homogeneidad en determinadas regiones; aunado a esto, factores como períodos reproductivos simultáneos en diferentes zonas, pueden influir en la divergencia poblacional sólo que no haya existido divergencia previa. Sin embargo, *S. lewini* que es una especie más costera, puede presentar desplazamientos más sujetos a factores oceanográficos, siendo esto un elemento que probablemente origina divergencia en la especie, ya que es posible que las variaciones de temperatura a lo largo de la costa los mantenga sobre regiones particulares, cercanas a zonas de alimentación. Además de que *S. lewini* tienen menor movimiento a lo largo de la columna de agua que *C. falciformis*, siendo nuevamente el factor temperatura una limitante que los mantienen dentro de la isoterma de los 24° dificultando su libre dispersión y originando cierta diferenciación.

De manera general las muestras que se ubicaron en la zona de mezcla de Corrientes presentaron mayor variación, como las poblaciones de Colima de *C. falciformis* y la de Sinaloa y Nayarit de *S. lewini*, puede ser efecto de su ubicación en zonas oceanográficas altamente productivas por la presencia de surgencias, que son importante fuente de alimentación. Otro de los factores que puede estar influyendo en la variación de las poblaciones de estas especies, es el aporte de nuevos genes a la zona por efecto del flujo genético de poblaciones que se encuentren más al sur del Pacífico. Los valores más bajos de diversidad encontrados en la población de Baja California Sur pueden deberse al efecto de deriva génica en *S. lewini* ya que se encontraron alelos y haplotipos con tendencia a la fijación, lo que puede ser resultado de un tamaño efectivo poblacional pequeño, así como de bajo flujo genético debido a la Corriente de California que puede limitar el desplazamiento al interior del Golfo de California.

Los estudios de variabilidad genética realizados en otras especies de tiburones mediante aloenzimas, presentan diversidades bajas comparadas con las observadas en el presente estudio, como el de Lavery y Shaklee (1989) que observaron una heterocigosis de 0.037 en *Carcharhinus sorrah* y *Carcharhinus tilstoni* y en la parte norte de Australia; Gaida (1997) encontró valores ligeramente mayores en *Squatina californica* (0.056). Sin embargo algunos estudios realizados con mtDNA mostraron valores muy amplios de variación, como el estudio de Ward y Gardner (1997) quienes informaron de un intervalo de valores de diversidad entre 0.001 y 0.096 en *Galeorhinus galeus* y *Mustelus antarcticus* respectivamente y Heist *et al.*, (1996b) reportaron una diversidad con un intervalo mucho mayor, de 0.507 a 0.969 en *Isurus oxyrinchus*, valores mucho mayores a los encontrados en las dos especies objeto de este trabajo. En cuanto a la diversidad nucleotídica en tiburones, Dunn y Morrissey (1995) reportaron un análisis con secuencias en elasmobranquios, un porcentaje de diferencias de nucleótidos para la región 12S del 29% de posiciones con variación en un fragmento de 303 pb, valor mayor al encontrado en el *citocromo b* de las dos especies objeto de nuestro estudio, probablemente por presentar una tasa de mutación menor a la de la región analizada en el trabajo de Dunn y Morrissey (1995).

En otras especies de tiburones también se ha encontrado divergencia poblacional, mediante análisis de aloenzimas y de mtDNA, en poblaciones tanto cercanas geográficamente como alejadas entre sí. Gaida (1997) detectó estructura poblacional mediante estudios aloenzimáticos en *Squatina californica*, en poblaciones relativamente cercanas en las islas de California, donde la distancia geográfica que existe entre las poblaciones divergentes es menor a los 100 km. Ward y Gardner (1997) reportaron divergencia poblacional en la especie de *Mustelus antarcticus* en el sur de Australia mediante aloenzimas y mtDNA, detectando dos poblaciones que se encuentran relativamente cercanas, una en el sur de Australia y otra en el oriente. Asimismo, Heist *et al.*, (1996b) encontraron estructura poblacional en *Isurus oxyrinchus* mediante análisis de mtDNA de poblaciones muy alejadas, del Atlántico y del sur del Pacífico.

Debido a que los tiburones son un recurso importante en las pesquerías de nuestro país y de muchos países del mundo y que son organismos vulnerables a la pesca, la información generada a partir de éste y otros estudios, pueden ser de gran ayuda, no sólo para profundizar en el conocimiento de las especies, sino para entender la dinámica de las poblaciones explotadas a fin de contribuir al establecimiento de políticas pesqueras y a la elaboración de leyes y modelos que permitan una adecuada explotación y conservación de nuestros recursos pesqueros.



Figura 32.-Ubicación de las colectas y de la corrientes oceánicas que pueden influir en el desplazamiento o favorecer la divergencia poblacional de *C. falciformis* y *S. lewini* en el Pacífico mexicano.

---

## CONCLUSIONES

- Las especies *C. falciformis* y *S. lewini* presentaron niveles altos de diversidad genética a comparación de otras especies de tiburones. Los niveles más altos se encontraron en las poblaciones de Colima de *C. falciformis* y en la de Nayarit de *S. lewini*, mismos que pueden deberse a que se encuentran en una zona de mezcla, tanto oceanográfica como genética que proporcione ingreso de nuevas variantes a su población mediante la emigración de organismos. En nuestro análisis, la población de Chiapas de *S. lewini* presentó los niveles más altos de variación mitocondrial, debido a un posible efecto metodológico resultante del pequeño tamaño en que se basó el estudio de la población.
- Los RAPD's mostraron divergencia en ambas especies. Sin embargo, el análisis de secuencias presentó estructura poblacional únicamente en la especie *S. lewini*, indicando la presencia de dos grupos o poblaciones en esta especie, uno en la parte norte del Pacífico mexicano y otro en la parte sur.
- Se observó una mayor complejidad en las poblaciones de *C. falciformis* pues la estimación de su divergencia mediante RAPD's mostró estructura poblacional, la que no fue detectada mediante el estudio de las secuencias de mtDNA. Es posible que la divergencia encontrada mediante el marcador de RAPD's refleje cambios de tiempos anteriores mientras que el marcador mitocondrial, refleja cambios relativamente recientes y sugiere una sola unidad generada por información materna. Estas interrogantes deben ser abordadas con otros estudios como marcajes y estudios moleculares con microsatélites.
- Se observó una correlación entre distancias geográficas con distancias genéticas únicamente en *S. lewini*, que corresponde con el efecto de estructura genética poblacional y los agrupamientos basados en distancias genéticas, encontrados en la especie mediante ambos marcadores. Esta correlación no fue detectada en las muestras de *C. falciformis*.
- Las técnicas utilizadas cumplen con el objetivo de este trabajo y demuestran que pueden ser marcadores adecuados para evaluación de variación genética y determinación de estructura poblacional en diferentes especies de tiburones.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adelman R., Saul R.L. y Ames B.N. (1988) Proc. Natn. Acad. Sci.USA. 85:2706-2708.
- Aguilar-Castro N. A. y Galvan-Magaña F. (2002) Hábitos alimenticios del tiburón martillo *Sphyrna lewini* (Griffith & Smith 1834) en el suroeste del Golfo de California. Memorias, Congreso Nacional de Ictiología 2002. 113p.
- Altukhov Y.P. (1981) The stock concept from the viewpoint of population genetics. Can. J. Fish. Aquat. Sci. Vol. 38: 1523-1538.
- Anger B., Estoup A. y Jarne P. (2000) Microsatellite size homoplasy, SSCP, and population structure: a Case study in the freshwater snail *Bulinus truncatus*. Mol. Biol. Evol. 17(12):1926-1932.
- Anislado-Tolentino V. y Robinson-Mendoza C. (2001) Edad y crecimiento del tiburón martillo *Sphyrna lewini* (Griffith y Smith 1834) en el Pacífico Central de México. Ciencias Marinas. 27(4):501-520.
- Applegate S.P., Soltelo-Macias F. y Espinosa-Arruberrena L. (1993) An Overview of Mexican shark fisheries, with suggestions for shark conservation in Mexico. Pp. 31-37. In S. Branstetter (ed.) Conservation biology of Elasmobranchs. NOAA Tech. Rep. NMFS 115.
- Asensio, L; Gonzalez, I; Fernandez, A; Rodriguez, M.A; Hernandez, P.E; Garcia, T. y Martin, R (2001) PCR-SSCP: a Simple Method for the Authentication of Grouper (*Epinephelus guaza*), Wreck Fish (*Polyprion americanus*), and Nile Perch (*Lates niloticus*) Fillets. Journal of Agricultural and Food Chemistry [J. Agric. Food Chem.]. Vol. 49, no. 4, pp. 1720-1723.
- Aubert H. y Lightner D.V. (2000) Identification of genetic populations of the Pacific blue shrimp *Penaeus stylirostris* of the gulf of California, Mexico. Marine Biology 137: 875-885.
- Ayala F.J. y Kiger Jr. J.A. (1989) Genética Moderna 3ª edición. Ediciones Omega S.A. Barcelona, España.
- Bastos E., Cravador A., Azevedo J. y Guedes-Pinto H. (2001) Single strand conformation polymorphism (SSCP) detection in six genes in Portuguese indigenous sheep breed "Churra da Terra Quente" Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 5(1): 7-15.
- Bonfil, R., Mena R. y de Anda D., (1993). Biological parameters of commercially exploited silky sharks, *Carcharhinus falciformis*, from the Campeche Bank, Mexico.. p. 73-86. In S. Branstetter (ed.) Conservation biology of Elasmobranchs. NOAA Tech. Rep. NMFS 115.
- Branstetter, S., (1987). Age, growth and reproductive biology of the silky shark, *Carcharhinus falciformis*, and the scalloped hammerhead, *Sphyrna lewini*, from the northwestern Gulf of Mexico.. Environ. Biol. Fish. 19(3):161-173.
- Breder, C.M. y D.E. Rosen, (1966). Modes of reproduction in fishes.. T.F.H. Publications, Neptune City, New Jersey. 941 p.
- Burke R.A., Reid D.E., Brooks J.M. y Lovoie A.M. (1983) Upper water column methane geochemistry in the Eastern Tropical North Pacific. Limnology Oceanography. 28(1):19-32.
- Carrera, R. (1991) The sharks of Uruguay: identification and biological aspects. Serie de Divulgacion (3):103
- Castillo-Genis, J.L. (1992). Diagnóstico de la pesquería de tiburón en México. Instituto Nacional de la Pesca. Secretaría de Pesca. México.
- Castillo-Genis J.L., A. Cid del Prado V., S. Soriano V., F. Sancho V. y C. Ramírez S. (1999). Descripción, evaluación y manejo de la pesquería artesanal de tiburón de Puerto Madero, Chiapas. Informe Técnico del Instituto Nacional de la Pesca.
- Castro-Aguirre, J.L., (1967). Contribución al estudio de los tiburones de México. Tesis de Biología. Esc. Nal. Ciencias Biológicas, IPN. México.
- Castro Aguirre, J.L; Cruz Agüero, J.De la. y Gonzalez Acosta, A.F, (2001) A second record of *Lampris guttatus* (Pisces: Lampridae) from the southwestern coast of the Gulf of California, Mexico. Investigaciones Marinas CICIMAR [Oceanides]. 16(2)139-141
- Cervigon, F; Cipriani, R; Fischer, W; Garibaldi, L; Hendrickx, M; Lemus, AJ; Marquez, R; Poutiers, JM. y Robaina, G; (1992) FAO species identification sheets for fishery purposes. Field guide to the commercial marine and brackishwater species of the northern coast of South America.. FAO, ROME (ITALY) 513 pp
- Chakraborty R.(1990) Mitochondrial DNA polymorphism reveals hidden heterogeneity within some Asian population. Am. J. Hum. Genet. 47:87-94.

- Chen, C.T., T.C. Leu, S.J. Joung y N.C.H. Lo (1990). Age and growth of the scalloped hammerhead, *Sphyrna lewini*, in northeastern Taiwan waters.. Pac. Sci. 44(2):156-170.
- Chow S., Okamoto H., Uozumi Y., Takeuchi Y. y Takeyama H. (1997) Genetic Stock structure of the swordfish (*Xiphias gladius*) inferred by PCR-RFLP análisis of the mitochondrial DNA control region. Marine Biology 127:359-367.
- Claro, R., (1994). Características generales de la ictiofauna.. p. 55-70. In R. Claro (ed.) Ecología de los peces marinos de Cuba. Instituto de Oceanología Academia de Ciencias de Cuba and Centro de Investigaciones de Quintana Roo.
- Cochrane L.K (2002) Fisheries management. In: Cochrane L.K. Fishery Manager's guide book – management measures and their application. (Eds.) FAO Rome.
- Compagno L.J.V. (1984a) FAO species catalogue Vol. 4 Shark of the world. An annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. Part. 1 lamniformes. FAO Fish Synop. 125:4 part 2, 665p.
- Compagno L.J.V. (1984b) FAO species catalogue Vol. 4 Shark of the world. An annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. Part. 2 Carcharhiniformes. FAO Fish Synop. 125:4 part 2, 665p.
- Compagno L.J.V. (1988) Shark of the order Carcharhiniformes. Princeton University Press, Princeton 489pp.
- Compagno, L.J.V., D.A. Ebert y M.J. Smale, (1989). Guide to the sharks and rays of southern Africa.. New Holland (Publ.) Ltd., London. 158 p.
- Compagno, L.J.V., (1998) Sphyrnidae. Hammerhead and bonnethead sharks. p. 1361-1366. In K.E. Carpenter and V.H. Niem (eds.) FAO identification guide for fishery purposes. The Living Marine Resources of the Western Central Pacific. FAO, Rome.
- Corro E., D. (1997). Análisis preliminar de la pesquería artesanal de tiburones en el norte de Nayarit y sur de Sinaloa. Informe Técnico. CRIP-Mazatlán. Informe Técnico del Instituto Nacional de la Pesca (inédito).
- Cromwell T. y Bennett (1959) Cartas de la deriva de superficie para el océano Pacifico Oriental Tropical. Bulletin Inter.-American Tropical Tuna Comisión Vol. III (5):217-235.
- De la Lanza Espino Guadalupe (1991), Oceanografía de Mares Mexicanos, AGT, México D.F. 569p
- Dinesh K.R., Lim,T.M., Chua, K.L., Chan, W.K. y Phang V.P.E. (1993) RAPD analysis; An efficient method of DNA fingerprinting in Fishes. Zoological Science 10:849-854
- Dobzhansky et. al. (1993) Evolución. Omega, Barcelona.
- Dunn K.A y Morrissey J.F (1995) Molecular phylogeny of elasmobranchs. Copeia 3: 526-531.
- Exadactylos, A; Geffen, AJ; Panagiotaki, P. y Thorpe, JP, (2003). Population structure of Dover sole *Solea solea*: RAPD and allozyme data indicate divergence in European stocks. Marine ecology progress series 246:253-264.
- Ewens W.J. (1972) The sampling theory of selectively neutral alleles. Theor. Popul. Biol. 3:87-112.
- FAO (1994a) Overview of world elasmobranch fisheries. by Bonfil R., Fisheries Technical Paper 341 Rome.
- FAO (1994b) Examen de la situación mundial de las especies altamente migratorias y las poblaciones transzonales, Documento Tecnico de Pesca 337 Rome..
- FAO (1999) A preliminary evaluation of the status of shark species. by Castro J.I, Woodley C.M. and Brudek, Fisheries Technical Paper 341 Rome
- Fu Y.X. (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics 147:915-925.
- Gaida H.I (1997) Population structure of the Pacific abigel shark, *Squatina californica* (Squatiniformes: Squatinidae), around the California channel islands. Copeia 4 : 738-744.
- Garfield P.C., Packard T.T., Friederich O.E. y Codispoti. (1983) A subsurface particle maximum layer and enhanced microbial activity in the secondary nitrite maximum of North-Eastern Tropical Pacific Ocean. Journal Marine Research 41:747-768.
- Gilbert, C.R. (1967) A revision of the hammerhead sharks (Family Sphyrnidae). Proc. U.S. Natn. Mus. 119:1-88.
- Hall T. (2001) BioEdit Sequence Alignment Editor, version 5.0.6 Copyright 1997-2004.
- Hedrick P.W. (2000) Genetics of population. 2a ed. Jones and Bartlett Publishers Sudbury Massachusetts.

- Heist E.J., Graves J.E. y Musick J.A. (1995) Population genetics of the sandbar shark (*Carcharhinus plumbeus*) the Gulf of Mexico and Mid-Atlantic Bight. *Copeia* 1995:555-562.
- Heist E.J., Musick J.A. y Graves J.E. (1996a) Genetic population structure of the shortfin mako (*Isurus oxyrinchus*) inferred from restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 53:583-588.
- Heist E.J., Musick J.A. y Graves J.E. (1996b) Mitochondrial DNA diversity and divergence among sharpnose sharks *Rhizoprionodon terraenovae*, from the Gulf of Mexico and Mid-Atlantic Bight. *Fishery Bulletin* 94:664-668.
- Heist E. J y Gold J.R. (1999) Genetic identification of sharks in the U.S Atlantic large coastal shark fishery. *Fishery Bulletin* 97:53-61.
- Hellberg M.E. (1994) Relationships between inferred levels of gene flow and geographic distance in a philopatric coral, *Ballanophyllia elegans*. *Evolution* 48(6):1829-1854.
- INP, Instituto Nacional de Pesca (1995) Sustentabilidad y pesca Responsable en México, Evaluación y Manejo. Secretaria de medio ambiente, recursos naturales y pesca.
- INP, Instituto Nacional de Pesca (1996) Pesquerías relevantes de México 1962-1992. Tomo 1. Secretaria del medio ambiente, recursos naturales y pesca.
- INP, Instituto Nacional de Pesca (2000) Sustentabilidad y Pesca Responsable en México, Evaluación y Manejo 1997-1998. Reporte Técnico Instituto Nacional de Pesca.
- INP, Instituto Nacional de Pesca (2001) Sustentabilidad y Pesca Responsable en México, Evaluación y Manejo 1999-2000, Reporte Técnico Instituto Nacional de Pesca.(inedito)
- Kato, S. y A.H. Carvallo. (1967). Shark tag in the eastern Pacific ocean, 1962-1965. En: Gilbert, P.W., R.F. Mathewson & D.P. Rall. (eds.). *Sharks, Skates and Rays*. John Hopkins Press, Baltimore. pp:93-109.
- Kato, S. (1964). Sharks of the genus *Carcharhinus* associated with the tuna fishery in the Eastern Tropical Pacific Ocean. *US Fish. Wild. Serv. Cir.*172: 1- 22.
- Kato, S., S. Springer. y M.H. Wagner. (1967). Field guide to Eastern and Hawaiian sharks. *Circ. U.S. Fish. Wild. Serv.* 271: 1-47.
- Kenchington (2001) The effects of fishing on species and genetic diversity. Reykjavik Conference on responsible fisheries in the marine ecosystem. Reykjavik, Iceland, 1-4.
- Klimley A. P., Richert J. E. y Jorgensen S. J. (2005) The home of blue water fish. *American Scientist* 93 pp. 42-49.
- Kocher T.D., Thomas W.K., Meyer A., Edwards S.V., Paabo A., Villablanca F.X. y Wilson A.C. (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86:6196-6200.
- Kumar S., Tamura K. Jakobsen I. B. y Nei M. (2001) Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) versión 2.1
- Lavery S. y Shaklee J.B. (1989) Population genetics of two tropical sharks, *Carcharhinus tilstoni* and *C. Sorrah* in Northern Australia. *Australian Journal of Marine and freshwater Research*. 40:541-557.
- Le Corre V., Dumolin-Lapegue S. y Kremer A. (1997) Genetic variation at allozyme and RAPD loci in sessile oak *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. The role of history and geography. *Mol. Ecol.* 6:519-529.
- Lessa, E.P. y Applebaum, G. (1993) Screening techniques for detecting allelic variation in DNA sequences. *Molecular Ecology* 2(2):119-129.
- Lewontin R.C. y Hubby J.L (1996) A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural population of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 54:595-609.
- Litman G.W. (1996) Sharks and the origins of vertebrate immunity. *Scientific American*. November 47-51.
- Lynch M. y Milligan B.G. (1994) Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91-99
- Mamuris Z., Apostolidis A.P., Theodorou A.J. y Triantaphyllidis C. (1998) Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to evaluate intraspecific genetic variation in red mullet (*Mullus barbatus*)
- Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.
- Martín A. (1990) Molecular evolution in shark. *Pacific Science* 44(2)



- Martin A.P. (1995) Metabolic rate and directional nucleotide substitution in animal mitochondrial DNA. *Molecular Biology Evolution* 12: 1124-1131.
- Martin A.P., Naylor G.J.P. y Palumbi S.R. (1992) Rates of mitochondrial DNA evolution in sharks are slow compared with mammals. *Nature*. Vol. 357: 153-155.
- Martin A.P. y Palumbi S.R. (1993) Protein evolution in different cellular environments: Cytochrome *b* in shark and mammals. *Molecular Biology Evolution* 10(4): 873-891.
- Miller M. (1997) Tools for population genetic analyses (TFPGA) versión 1.3.
- Mendizábal O., D., R. Vélez, F. Valdez, A. Ramírez, E. Bejarano y A. Vega. (1990). Información y representación gráfica de los datos estadísticos de captura y esfuerzo de la flota palangrera de Manzanillo, Colima (1983-1988). CRIP-Manzanillo. Informe Técnico del Instituto Nacional de la Pesca
- Mendizábal O., D. (1995). Biología reproductiva, crecimiento, mortalidad y diagnóstico de *Alopias vulpinus* (tiburón zorro) y *Carcharhinus limbatus* (tiburón volador) de la boca del Golfo de California al Golfo de Tehuantepec (período 1986-1987). Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Mendizábal O., D. R. Vélez, J. Valdez, J. Fajardo y C. Castillo. (2000). Información biológica, distribución y abundancia relativa del tiburón cornuda, *Sphyrna lewini*, en el océano Pacífico de México (1986-1995).
- Menni, R.C. (1976) Presence of *Sphyrna lewini* (Griffith and Smith, 1834) in Uruguay (Chondrichthyes, Sphyrnidae). *Stud. Neotrop. Fauna*. 11(4):199-203.
- Menni R.C., Cousseau M.B. y Gosztonyi A.R. (1986) Sobre la biología de los tiburones costeros de laprovincia de Buenos Aires. *Anales de la Sociedad Científica de Argentina* 213:3-27.
- Murphy R.W., Sites J.M.J., Buth D.G. y Haufler. (1996) Proteins: isozyme electrophoresis, in *Molecular Systematics*. Hillis D.M., Moritz C. y Mable B.K., Eds. Sinauer Associates, Sunderland, M.A. 51-120.
- Nei M. (1978) The theory of genetic distance and evolution of human races. *Jap. J. Hum. Genet.* 23 pp. 341-369.
- Orita M., Iwahana H., Kanasawa H. Hayashi K. y Sekita T. (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2766-2770.
- Palumbi S.R., Martín A.P., McMillan W.O., Romano S.R., Grabowsky G. y Stice L. (1991). The simple fool's guide to PCR, Version 2 Department of Zoology. University of Hawaii. Honolulu.
- Pank M., Stanhope M., Natanson L., Kohler N. y Shivji M. (2001) Rapid and simultaneous identification of body parts from the morphologically similar sharks *Carcharhinus obscurus* and *Carcharhinus plumbeus* (Carcharhinidae) using multiplex PCR. *Marine Biotechnology* 3:231-240.
- Policansky D. (1993) Evolution and management of exploited fish population. In: Kruse G., Eggers D.M., Marasco R.J., Pautzke C. y Quin II J. (eds.). *Proceedings of the International Symposium on Management strategies for exploited fish populations*. Alaska Sea grant College Program Report No. 93-02, University of Alaska Fairbanks.
- Pope J. (2002) Input and output controls: the practice of fishing effort and catch management in responsible fisheries. In: Cochrane L.K. *Fishery Manager's guide book – management measures and their application*. (Eds.) FAO Rome.
- Posada, D. (2005) MODELTEST: A tool to select the best-fit model of nucleotide substitution. Current versión 3.7.
- Powers D.A., Lauerment T., Crawford D., Smith M., Gonzalez-Villaseñor I. y Michele L.D. (1991) The evolutionary significance of genetic variation at enzyme synthesizing loci in the teleost *Fundulus heteroclitus*. *Journal of Fish Biology*. 39: suplemento "A" 169-184.
- Quinn W.H. (1974). Monitoring and predicting El Niño invasions. *Journal Appl. Methodology*. 13:825-830.
- Ryman N. (1991) Conservation genetics considerations in fishery management. *J. Fish Biol.* 39 (Supplement A): 211-224.
- Raymond, M.L. y Rousset F. (1995) An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1280-1283.
- SAGARPA, Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación. (2001) Guía para la identificación de las especies de tiburones de importancia comercial del océano pacífico. Subsecretaría de Pesca, Instituto Nacional de la Pesca.

- Sanatana-Hernandez H., Macías-Zamora R. y Valdez-Flores J.J. (1998) Selectividad de palangre utilizado por la flota mexicana en la Zona Económica Exclusiva. *Ciencias Marinas* 24(2): 193-210.
- Schneider S., Roessli D. y Excoffier L. (2000) Arlequin ver.2.0 A Software for population genetics data análisis.
- SEMARNAP, Secretaria del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (2000). Anuarios Estadísticos de Pesca 1995-1999. SEMARNAP, México.
- SEPESCA. (1995). Anuario estadístico de pesca 1994. México.
- Shaffer, HB; Fellers, GM; Magee, A. y Voss, SR. (2000) The genetics of amphibian declines: population substructure and molecular differentiation in the Yosemite Toad, *Bufo canorus* (Anura, Bufonidae) based on single-strand conformation polymorphism analysis (SSCP) and mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Ecology* [Mol. Ecol.]. Vol. 9, no. 3, pp. 245-257.
- Silva E.P. y Russo C.A.M. (2000) Techniques and statistical data analysis in molecular population genetics. *Hydrobiología* 420 pp. 119-135.
- Slatkin M. (1991) Inbreeding coefficients and coalescence times. *Genet. Res. Camb.* 58:167-175.
- Slatkin M. (1993) Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium population. *Evolution* 47(1) 264-279.
- Slatkin M. (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*. 139:457-462.
- Small, M.P. y Gosling, E.M. (2001) Population genetics of a snail species complex in the British Isles: *Littorina saxatilis* (Olivi), *L. neglecta* Bean and *L. tenebrosa* (Montagu), using SSCP analysis of cytochrome-b gene fragments. *Journal of Molluscan Studies* [J. Molluscan Stud.]. Vol. 67, no. 1, pp. 69-80.
- Smith, C.L. (1997) National Audubon Society field guide to tropical marine fishes of the Caribbean, the Gulf of Mexico, Florida, the Bahamas, and Bermuda. Alfred A. Knopf, Inc., New York. 720 p.
- Smith P.J., Benson P.G. y McVeagh S.M. (1997) A comparison of three genetic methods used for stock discrimination of orange roughy *Hoplostethus atlanticus*: allozymes, mitochondrial DNA, and random amplified polymorphic DNA. *Fishery Bulletin* 95(4): 800-809.
- Smith P.J. y Fujio Y. (1982) Genetic variation in marine teleosts: high variability in habitats specialists and low variability in habitats generalists. *Mar. Biol.* 69 pp. 7-20.
- Strickberger, Monroe W. (2000) *Evolution* 3rd ed. Sudbury, Massachusetts : Jones and Bartlett, 722p
- Sunncks P. (2000) Efficient genetic markers for population biology. *Tree* 15(5):199-203.
- Sunncks P., Wilson A.C.C., Beheregaray L.B., Zenger K., French J. y Taylor A.C. (2000) SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular Ecology* 9:1699-1710.
- Sweijid N.A., Bowie R.C.K., Evans B.S. y Lopata A.L. (2000) Molecular genetics and the management and conservation of marine organisms. *Hidrobiologia* 420: 152-164.
- Swofford, D. L. 1998. PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods) Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Swofford, D.L. y G.J. Olsen. (1990). Phylogeny Reconstruction. En: Hillis, D.M. y C. Moritz (eds). *Molecular Systematics*. Sinauer Associates Inc., Sunderland.
- Tajima F. (1983) Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*. 105:437-460.
- Tajima F. (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595.
- Tajima F. (1996) The amount of DNA polymorphism maintained in a finite population when the neutral mutation rate varies among sites. *Genetics*. 143(3) 1457-1465.
- Tamura, K. y M. Nei. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10:512-526.
- Todd C.D., Walker A.M., Wolff K., Northcott S.J., Walker A.F., Ritchie M.G. Hoskins R., Abbott R.J. y Hazon N. (1997) Genetic differentiation of populations of copepod sea louse *Lepeophtheirus salmonis* (Kroyer) ectoparasitic on wild and farmed salmonids around the coasts of Scotland: Evidence from RAPD markers. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 210:251-274

- Utter F.M. (1986) Validity of electrophoresis in identifying fish populations structures. In: D. Hedgecock (editor). Workshop on identifying fish subpopulations. p 14-19. Calif. Sea Grant Coll. Program Publ. T-CSGCD-013.
- Utter F.M. (1991) Biochemical genetics and fishery management: an historical perspective. *J. Fish Biol.* 39 (Supplement A): 1-20.
- Velez M., R., O. Mendizábal, F. Valdez y A. Venegas. (1989). Prospección y pesca exploratoria de recursos pesqueros en la Zona Económica Exclusiva del Océano Pacífico. INP/CRIP-Manzanillo, Colima. México. Informe Técnico del Instituto Nacional de la Pesca (inédito).
- Waldman J.R. (1999) The importance of comparison studies in stock analysis. *Fisheries Research* 43: 237-246.
- Ward R.D. (2000) Genetics in fisheries management. *Hidrobiologia* 420: 191-2001.
- Ward R.D. y Gardner M.G. (1997) Stock structure and species identification of school and gummy sharks in Australian waters. CSIRO, Hobart, Tasmania.
- Weir B.S. y Cokerham C.C. (1984) Estimating F statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38 pp. 1358-1370.
- Welsh J. y McClelland M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids. Res.* 18 pp. 303-306.
- Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak J., Rafalaski J.A. y Tingey S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18 pp. 6531-6535.
- Wright S. (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution.* 19:395-420.
- Wyrski K. (1965) Surface currents of the Eastern Tropical Pacific Ocean. *Bulletin Inter.-American Tropical Tuna Comisión.* Vol. IX (5):269-304.
- Wyrski K. (1973) Teleconnections in the Equatorial Pacific Ocean. *Science.* 180:66-68.
- Wyrski K. (1975) Fluctuations of the dynamic topography in the Pacific Ocean. *Journal Physics Oceanography.* 5:450-459.
- Yen F.C y Yang R.C (1999) Genetics Population Analysis (GenePop) version 1.32 A joint Project Development. University of Alberta and Tim Boyle, Center for International Forestry Research.
- Zouros E. (1979) Mutation rates, population sizes and amounts of electrophoretic variation of enzyme loci in natural population. *Genetics.* 92:623-646.

---

## ANEXOS

### Anexo A

#### Extracción de DNA según protocolo promega

- ❖ Se tomaron aproximadamente 100 a 200 mg. de tejido muscular, procurando que el tejido tuviera la menor cantidad posible del amortiguador de transporte; se realizó la fragmentación del tejido en una caja de Petri en trozos pequeños, con ayuda de un bisturí.
- ❖ Una vez fragmentado el tejido, se transfirió a un tubo eppendorf con 400 µL de solución de lisis y 17.5 µL de proteinasa K (Gibco BRL 25530-015) (20 mg/mL.) Para incubarse a 56° C durante toda la noche.
- ❖ Posteriormente se agregaron 3 µL de RNAsa y se incubó a 38° C durante 15 min.
- ❖ Pasado este tiempo se colocó los tubos en hielo durante 5 min. y después se agregaron 600 µL de solución precipitadora de proteínas, grasas y restos celulares. Los tubos fueron invertidos suavemente e incubados 5 min. más en hielo para después ser centrifugarlos a 1300 revoluciones por minuto (rpm) durante 4 min. en una microcentrífuga Eppendorf (modelo 5410), para eliminar proteínas, lípidos y restos celulares.
- ❖ La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo, al cual le fueron agregados 600 µL de alcohol isopropanol (Sigma), se invirtieron suavemente hasta observar un pequeño precipitado (DNA) y se centrifugó durante 1 min. a 1300 rpm, para obtener un pequeño botón de DNA en el fondo del tubo.
- ❖ La fase acuosa se decantó y el botón de DNA se lavó con alcohol etílico al 70% y se centrifugó nuevamente durante 1 min.
- ❖ Transcurrido este tiempo se decantó el alcohol y se secó el botón en una centrífuga de vacío (Vacufuge o concentrador 5301 Eppendorf) a temperatura ambiente de 5 a 10 min.
- ❖ Finalmente se agregaron 100 µL de solución hidratante y se incubó a 65° C durante una hora, hasta homogenizar por completo el botón en la solución.
- ❖ Se almacenó el stock de DNA a una temperatura de -20° C, para su posterior análisis.

## Anexo B

Frecuencias alélicas y heterisogosis esperada ( $He$ ) para los loci analizados, heterocigosis total ( $He_T$ ) para cada muestra y heterosigosis global ( $He_G$ ) para la especie *C. falciformis* estudiadas mediante RAPD's; valores de probabilidad ( $P$ ) de la prueba exacta, índices de divergencia poblacional ( $F_{ST}$ ) y estimaciones demigrantes por generación ( $M(F_{ST})$ ) para cada loci de RAPD de *C. falciformis*.

\*  $P \leq 0.05$  \*\*  $P \leq 0.005$  y \*\*\* con  $P \leq 0.0005$ .

LOCI (n)	CHIAPA S (50)	OAXACA (30)	COLIMA (30)	BAJA CALIF. SUR (20)	$He$	$P$ de prueba exacta	$F_{ST}$ de RAPD	$M(F_{ST})$
A-1.1 p	0.5102	0.4167	0.3750	0.4808	0.4997	0.5360	0.0027	184.69
A-1.1 q	0.4694	0.5833	0.5893	0.5192				
A-1.2 p	0.8265	0.6833	1.0000	1.0000	0.2884	0.1032	0.1577***	2.67
A-1.2 q	0.1531	0.3167	0.0000	0.0000				
A-1.3 p	0.8265	1.0000	0.7679	1.0000	0.2884	0.6417	0.1334***	3.25
A-1.3 q	0.1531	0.0000	0.1964	0.0000				
A-1.4 p	0.5102	0.2000	0.3750	0.4423	0.4879	<b>0.0048*</b>	0.0720***	6.44
A-1.4 q	0.4694	0.7667	0.5893	0.5577				
A-1.5 p	0.8265	0.5167	0.3750	0.6538	0.4899	<b>0.0005*</b>	0.1299***	3.35
A-1.5 q	0.1531	0.4833	0.5893	0.3462				
A-1.6 p	0.8265	0.8000	1.0000	1.0000	0.2223	1.0000	0.0894***	5.09
A-1.6 q	0.1531	0.2000	0.0000	0.0000				
A-1.7 p	0.8265	0.3000	0.4643	0.7115	0.4951	<b>0.0000*</b>	0.2094***	1.89
A-1.7 q	0.1531	0.7000	0.5357	0.2885				
A-1.8 p	1.000	0.5833	0.5893	0.7885	0.3972	<b>0.0032*</b>	0.2471***	1.52
A-1.8 q	0.000	0.4167	0.3750	0.2115				
A-1.9 p	0.7857	0.3167	0.4286	0.6538	0.4986	<b>0.0005*</b>	0.1310***	3.32
A-1.9 q	0.2143	0.6500	0.5714	0.3462				
A-1.10 p	0.4082	0.4000	0.2679	0.6538	0.4953	<b>0.0078*</b>	0.0698***	6.66
A-1.10 q	0.5918	0.6000	0.7321	0.3462				
B-12.1 p	0.5857	0.0000	0.4828	0.2273	0.4974	<b>0.0029*</b>	0.1068***	4.18
B-12.1 q	0.4143	1.0000	0.4828	0.7727				
B-12.2 p	0.5286	0.1250	0.3793	0.5227	0.5064	<b>0.0186*</b>	0.0629***	7.45
B-12.2 q	0.4429	0.8750	0.6207	0.4773				
B-12.3 p	0.4143	0.3125	0.3276	0.5682	0.4949	0.1839	0.0284***	17.11
B-12.3 q	0.5857	0.6875	0.6724	0.4318				
B-12.4 p	0.3429	0.1250	0.3276	0.2273	0.4312	0.3828	0.0058**	85.71
B-12.4 q	0.6571	0.8750	0.6724	0.7273				
B-12.5 p	0.4429	0.1667	0.3621	0.3043	0.4599	0.2524	0.0193	25.41
B-12.5 q	0.5571	0.8333	0.6379	0.6957				
B-12.6 p	0.1571	0.6667	0.3276	0.2292	0.3896	<b>0.0067*</b>	0.1210*	3.63
B-12.6 q	0.8429	0.3333	0.6724	0.7708				
B-12.7 p	1.0000	0.3333	0.6207	0.3958	0.4853	<b>0.0001*</b>	0.3672***	0.86
B-12.7 q	0.0000	0.5556	0.3793	0.6042				
B-12.8 p	0.3000	0.1667	0.0690	0.6458	0.3992	<b>0.0000*</b>	0.2720***	1.34
B-12.8 q	0.7000	0.8333	0.9310	0.3542				

Continúa.....

B-12.9 p	0.0857	0.4444	0.2069	0.3542	0.3468	<b>0.0003*</b>	0.1234***	
B-12.9 q	0.9143	0.4444	0.7931	0.6458				3.55
B-18.1 p	0.7708	0.7500	0.7241	0.7115	0.3703	0.8965	-0.0109	
B-18.1 q	0.2083	0.2500	0.2759	0.2885				- 46.37
B-18.2 p	0.8438	0.4167	0.7333	0.5577	0.4508	<b>0.0015*</b>	0.1388***	
B-18.2 q	0.1563	0.5833	0.2667	0.4423				3.10
B-18.3 p	0.6771	0.5278	0.7333	0.4038	0.4842	<b>0.0245*</b>	0.0731***	
B-18.3 q	0.3229	0.4722	0.2667	0.5962				6.34
B-18.4 p	0.7708	0.7500	0.6833	0.5577	0.4243	0.2126	0.0320**	
B-18.4 q	0.2083	0.2500	0.3167	0.4423				15.13
B-18.5 p	0.7292	0.4722	0.7333	0.5192	0.4653	<b>0.0261*</b>	0.0632***	
B-18.5 q	0.2500	0.5278	0.2667	0.4808				7.41
B-18.6 p	0.7083	0.5278	0.4500	0.5192	0.4934	0.0643	0.0500***	
B-18.6 q	0.2917	0.4722	0.5500	0.4808				9.50
B-18.7 p	0.7708	1.0000	0.5833	1.0000	0.3682	<b>0.0523*</b>	0.2086***	
B-18.7 q	0.2083	0.0000	0.4167	0.0000				1.90
F-9.1 p	0.8333	0.8000	0.5862	0.5500	0.4320	<b>0.0131*</b>	0.0880***	
F-9.1 q	0.1667	0.2000	0.4138	0.4500				5.18
F-9.2 p	0.4667	0.3167	0.3393	0.3000	0.4710	0.1655	0.0167*	
F-9.2 q	0.5111	0.6500	0.6607	0.7000				29.44
F-9.3 p	1.0000	1.0000	1.0000	0.8000	0.1770	0.6647	0.1953***	
F-9.3 q	0.0000	0.0000	0.0000	0.2000				2.06
F-9.4 p	1.0000	1.0000	0.7241	1.0000	0.2354	<b>0.0485*</b>	0.2765***	
F-9.4 q	0.0000	0.0000	0.2759	0.0000				1.31
F-9.5 p	0.2000	0.2000	0.3947	0.1500	0.3670	0.2455	0.0237**	
F-9.5 q	0.8000	0.7667	0.6053	0.7500				20.60
F-9.6 p	0.6000	0.6333	0.3947	0.2250	0.5019	<b>0.0009*</b>	0.1112	
F-9.6 q	0.4000	0.3667	0.6053	0.7750				4.00
F-9.7 p	1.0000	0.8000	0.6207	0.5500	0.4111	<b>0.0011*</b>	0.2305***	
F-9.7 q	0.0000	0.2000	0.3793	0.4500				1.67
F-14.1 p	0.7333	0.7593	1.0000	0.5417	0.4025	0.0637	0.1362***	
F-14.1 q	0.2667	0.2037	0.0000	0.4583				3.17
F-14.2 p	0.8333	0.6667	0.7391	0.7083	0.3702	0.4190	0.0170*	
F-14.2 q	0.1667	0.3333	0.2174	0.2917				28.91
F-14.3 p	0.4000	0.3333	0.6000	0.6458	0.4993	<b>0.0224*</b>	0.0679***	
F-14.3 q	0.6000	0.6667	0.4000	0.3542				6.86
F-14.4 p	0.5778	0.4630	0.5227	0.5417	0.4992	0.8507	-0.0097	
F-14.4 q	0.4222	0.5000	0.4773	0.4583				- 52.05
F-14.5 p	0.5111	0.6663	0.3636	0.5417	0.5004	0.2069	0.0280**	
F-14.5 q	0.4667	0.3333	0.5909	0.4583				17.36
F-14.6 p	1.0000	1.0000	0.6190	0.7083	0.3325	<b>0.0128*</b>	0.2936***	
F-14.6 q	0.0000	0.0000	0.3810	0.2917				1.20
F-14.7 p	0.5778	0.6667	0.6190	0.6458	0.4840	0.9122	-0.0101	
F-14.7 q	0.4222	0.3333	0.3810	0.3542				- 50.00
F-14.8 p	0.3000	0.7222	0.5238	0.5833	0.5094	<b>0.0007*</b>	0.1366***	
F-14.8 q	0.7000	0.2778	0.4286	0.4167				3.16
F-14.9 p	0.7000	0.5000	0.4762	0.7708	0.4691	0.0993	0.0530***	
F-14.9 q	0.3000	0.4630	0.4762	0.2292				8.93
Total	He=	He=	He=	He=	He <sub>T</sub> =	<b>0.0000*</b>	0.0992*** D.S= 0.0140	4.54
	0.3404	0.3742	0.4095	0.3921	0.4248			

## Anexo C

Secuencias nucleotídicas de 6 haplotipos resueltos en el fragmento del *citocromo b* analizado en *C. falciformis*.

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	5	15	25	35	45	55
Alelo A-Cf	ATCATGCGGA	GCGCTTGGCA	TCCCAATCAA	GGAATTATGC	CTCGTAGGAG	ATTGAGAGCG
Alelo B-Cf	ATCAGCTG--	GTGAATGGTA	TAATAAT-AA	GGAATAAGGC	AAAGTAGGAG	ATTGAG-GCG
Alelo C-Cf	ATCAGCTG--	GTGAATGGTA	TAATAGATAA	GGAATAAGGC	GAAGTAGGAG	ATTGAG-GCG
Alelo D-Cf	AGCAGGTG--	GTGAATGGTA	TAATAAT-AA	GGAATAAGGC	AAAGTAGGTG	ATTGAG-GCG
Alelo F-Cf	ATCATGCG-A	GCGCCTGGCT	TCCCCATCAC	GGAATTATGT	CTCGTAGTGA	GATGGGAGCG
Alelo G-Cf	ATCTGCGG-A	GCGCATGGCT	TCCCCATCA-	GGAATTATGC	CTAGTAGGAG	ATTGAG-GCG
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	65	75	85	95	105	115
Alelo A-Cf	ATTTGTCCTA	CTATAATAAA	TGGTTGTTCT	ACTGGTTGGC	CTCCAATTCA	AGTTAGAATA
Alelo B-Cf	ATTTGTCCTA	CTATAATAAA	TGGTTGTTCT	ACTGGTTGGC	CTCCAATTCA	AGTTAGAATA
Alelo C-Cf	ATTTGTCCTA	CTGTAATAAA	TGGTTGTTCT	ACTGGTTGGC	CTCCAATTCA	AGTTAGAATA
Alelo D-Cf	ATTTGTCCTA	CTATAATAAA	TGGTTGTTCT	ACTGGTTGGC	CTCCAATTCA	AGTTAGAATA
Alelo F-Cf	ATTTGTCCTA	CTATAATAAA	TGGTTGTTCT	ACTGGTTGGC	CTCCAATTCA	AGTTAGAATA
Alelo G-Cf	ATTTGTCCTA	CTATAATAAA	TGGTTGTTCT	ACTGGTTGGC	CTCCAATTCA	AGTTAGAATA
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	125	135	145	155	165	175
Alelo A-Cf	ATTGAGTTGG	CTACGAGAAG	T-CAGAAGAA	GATTTGTGTT	ATGGGTCGAA	AGATGGTGCT
Alelo B-Cf	ATTGAGTTGG	CTACGAGAAG	T-CAGAAGAA	GATTTGTGTT	ATGGGTCGAA	AGATGGTGCT
Alelo C-Cf	ATTGAGTTGG	CTACGAGAAG	TGCAGAAGAA	GATTTGTGTT	ATGGGTCGAA	AGATGGTGCT
Alelo D-Cf	ATTGAGTTGG	CTACGAGAAG	T-CAGAAGAA	GATTTGTGTT	ATGGGTCGAA	AGATGGTGCT
Alelo F-Cf	ATTGAGTTGG	CTACGAGAAG	T-CAGAAGAA	GATTTGTGTT	ATGGGTCGAA	AGATGGTGCT
Alelo G-Cf	ATTGAGTTGG	CTACGAGAAG	T-CAGAAGAA	GATTTGTGTT	ATGGGTCGAA	AGATGGTGCT
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	185	195	205	215	225	235
Alelo A-Cf	TCGTTGTTTG	GAGGTGTGGA	GGAGAGGAAC	CAATATGAGG	ATGAAGAT-A	GAGAATAGGA
Alelo B-Cf	TCGTTGTTTG	GAGGTGTGGA	GGAGAGGAAC	CAATATGAGG	ATGAAGAT-A	GAGAATAGGA
Alelo C-Cf	TCGTTGTTTG	GAGGTGTGGA	GGAGAGGAAC	CAATATGAGG	ATGAAGATTA	GAGAATAGGA
Alelo D-Cf	TCGTTGTTTG	GAGGTGTGGA	GGAGAGGAAC	CAATATGAGG	ATGAAGAT-A	GAGAATAGGA
Alelo F-Cf	TCGTTGTTTG	GAGGTGTGGA	GGAGAGGAAC	CAATATGAGG	ATGAAGAT-A	GAGAATAGGA
Alelo G-Cf	TCGTTGTTTG	GAGGTGTGGA	GGAGAGGAAC	CAATATGAGG	ATGAAGAT-A	GAGAATAGGA
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	245	255	265	275	285	295
Alelo A-Cf	G-AGCTAGGA	CTCCTCCTAG	TTT-ATTAGG	AATTGAGCGT	AAGATTGCGT	AAGCGAATAA
Alelo B-Cf	G-AGCTAGGA	CTCCTCCTAG	TTT-ATTAGG	AAT-GAGCG-	ACG--TCCAT	AA-CGAA---
Alelo C-Cf	GGAGCTAGGA	CTCCTCCTAG	TTTGATTAGG	AATTGAGCGT	AAGATTGCGT	AAGCGAATAA
Alelo D-Cf	G-AGCTAGGA	CTCCTCCTAG	TTT-ATTAGG	AATTGAGCGT	AAGATTGCGT	AAGCGAATAA
Alelo F-Cf	G-AGCTAGGA	CTCCTCCTAG	TTT-ATTAGG	AATTGAGCGT	AAGATTGCGT	AAGCGAATAA
Alelo G-Cf	G-AGCTAGGA	CTCCTCCTAG	TTT-ATTAGG	AATTGAGCGT	AAGATTGCGT	AAGCGAATAA
Alelo A-Cf	G					
Alelo B-Cf	-					
Alelo C-Cf	G					
Alelo D-Cf	G					
Alelo F-Cf	G					
Alelo G-Cf	G					

## Anexo D

Frecuencias alélicas, herocigosis esperada y valores de probabilidad de la prueba exacta para cada locus analizado y heterocigosis total para cada muestra de *S. lewini*.

\*valores significativos  $P \leq 0.05$ .

LOCI (n)	CHIAPAS (8)	NAYARIT (30)	SINALOA (20)	BAJA CALIF. SUR (30)	$He$	$P$ de prueba exacta	$F_{ST}$ de RAPD's	$M (F_{ST})$
F-1.1 p	0.4167	0.3958	0.5357	0.7105	0.5159	0.0605	0.0704**	6.60
F-1.1 q	0.5833	0.6042	0.4643	0.2368				
F-1.2 p	0.5833	0.7708	0.6607	1.0000	0.3871	0.2885	0.1314***	3.31
F-1.2 q	0.4167	0.2292	0.3393	0.0000				
F-1.3 p	0.5833	1.0000	1.0000	0.7105	0.2825	<b>0.0475*</b>	0.2928***	1.21
F-1.3 q	0.4167	0.0000	0.0000	0.2368				
F-1.4 p	0.5833	0.7708	1.0000	1.0000	0.2825	0.0930	0.2479***	1.52
F-1.4 q	0.4167	0.2292	0.0000	0.0000				
F-1.5 p	0.4167	0.7708	0.3393	0.6579	0.5149	<b>0.0036*</b>	0.1704***	2.43
F-1.5 q	0.5833	0.2292	0.6607	0.3421				
F-1.6 p	0.4167	0.6458	0.6964	1.0000	0.4269	0.0773	0.1718***	2.41
F-1.6 q	0.5833	0.3542	0.2679	0.0000				
F-1.7 p	0.1667	0.3542	0.4286	0.4474	0.4888	0.4204	0.0059	84.25
F-1.7 q	0.8333	0.6458	0.5714	0.5526				
F-1.8 p	0.0833	0.5000	0.5357	0.2368	0.4866	<b>0.0105*</b>	0.0981***	4.60
F-1.8 q	0.9167	0.5000	0.4643	0.7105				
F-1.9 p	0.4167	0.5833	0.6964	1.0000	0.4414	0.0597	0.1924***	2.10
F-1.9 q	0.5833	0.4167	0.2679	0.0000				
F-7.1 p	0.1667	0.3947	0.3958	0.2222	0.4341	0.2155	0.0271*	17.95
F-7.1 q	0.8333	0.6053	0.6042	0.7778				
F-7.2 p	0.6667	0.5000	0.4167	0.6667	0.5010	0.3603	0.0348*	13.87
F-7.2 q	0.3333	0.4474	0.5833	0.3333				
F-7.3 p	0.0000	0.1842	0.2083	0.1389	0.2668	0.1834	0.0158	31.15
F-7.3 q	1.0000	0.8158	0.7917	0.8611				
F-7.4 p	0.0000	0.1842	0.1875	0.1944	0.2668	0.2292	0.0105	47.12
F-7.4 q	1.0000	0.8158	0.8125	0.8056				
F-7.5 p	1.0000	0.6579	1.0000	1.0000	0.2955	0.2692	0.3231***	1.05
F-7.5 q	0.0000	0.3421	0.0000	0.0000				
F-7.6 p	0.3333	0.3947	0.1250	0.1389	0.3552	<b>0.0350*</b>	0.0840***	5.45
F-7.6 q	0.6667	0.6053	0.8750	0.8611				
F-7.7 p	0.0556	0.0526	0.2826	0.2222	0.2798	<b>0.0305*</b>	0.0693***	6.72
F-7.7 q	0.9444	0.9474	0.7174	0.7778				
F-13.1 p	0.4444	0.5000	0.2000	0.7105	0.4945	<b>0.0000*</b>	0.1898***	2.13
F-13.1 q	0.4444	0.4630	0.7667	0.2368				
F-13.2 p	0.6663	0.7593	1.0000	1.0000	0.2885	0.1716	0.2066***	1.92
F-13.2 q	0.3333	0.2037	0.0000	0.0000				
F-13.3 p	1.0000	0.6111	0.4000	1.0000	0.5030	<b>0.0043*</b>	0.3381***	0.98
F-13.3 q	0.0000	0.3889	0.6000	0.0000				
F-13.4 p	1.0000	0.7679	1.0000	1.0000	0.2156	0.6569	0.1869***	2.18
F-13.4 q	0.0000	0.1964	0.0000	0.0000				
F-13.5 p	1.0000	0.5000	0.4000	0.6053	0.5144	0.1162	0.1431***	2.99
F-13.5 q	0.0000	0.4630	0.6000	0.3947				



Continuación.....

<b>F-15.1 p</b>	0.3333	0.1852	0.2857	0.4118	0.4145	0.1251	0.0340*	
<b>F-15.1 q</b>	0.6667	0.8148	0.7143	0.5294				14.21
<b>F-15.2 p</b>	0.6667	0.6667	0.6607	0.4118	0.4835	0.1550	0.0363**	
<b>F-15.2 q</b>	0.3333	0.3333	0.3393	0.5882				13.27
<b>F-15.3 p</b>	0.1667	0.0741	0.1071	0.2353	0.2271	0.2441	0.0200	
<b>F-15.3 q</b>	0.8333	0.9259	0.8929	0.7647				24.50
<b>F-15.4 p</b>	0.2778	0.6667	0.3750	0.7353	0.5155	<b>0.0023*</b>	0.1413***	
<b>F-15.4 q</b>	0.7222	0.3333	0.6250	0.2647				3.04
<b>F-15.5 p</b>	0.2778	0.0556	0.0536	0.1176	0.1691	0.1056	0.0559**	
<b>F-15.5 q</b>	0.7222	0.9444	0.9464	0.8824				8.44
<b>Total</b>	He= 0.3124	He= 0.3780	He= 0.3247	He= 0.2730	He <sub>1</sub> = 0.3866	<b>0.0000*</b>	0.1199*** D.S= 0.0190	3.67

## Anexo E

Secuencias nucleotídicas de los alelos del fragmento de *citocromo b* de *S. lewini*.

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	5	15	25	35	45	55
Alelo A-S1	TTATATGGAC	CCCCAGTCC-	---TTCGGAT	GAAATAATTT	TGTCTTCGCA	TCTGGTCG--
Alelo B-S1	-TATA-GGAC	CCCAACTAGC	--TTTAGGCT	GA--GAATTT	TGTTTTTCGCA	TCAGCTGGCG
Alelo C-S1	TTAGTTAAGC	CACCAAAACT	AGTTTAGGCT	GA--GAATTT	TGTTTTTCGCA	TCAGCTGGCG
Alelo D-S1	TTAGTTAAGC	CACCAAAACT	AGTTTAGGCT	GA--GAATTT	TGTTTTTCGCA	TCAGCTGGCG
Alelo F-S1	TTAGTTAAGC	CACCAAAACT	AGTTTAGGCT	GA--GAATTT	TGTTTTTCGCA	TCAGCTGGCG
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	65	75	85	95	105	115
Alelo A-S1	AATGGTATAA	TGATAAGAAA	TAGAGAGAAG	TAGGAGATTG	AGGCGATTTG	TCCTACTGTA
Alelo B-S1	AATGGTATAA	TGATAAGAAA	TAGAGAGAAG	TAGGAGATTG	AGGCGATTTG	TCCTACTGTA
Alelo C-S1	AATGGTATAA	TGATAAGAAA	TAGAGAGAAG	TAGGAGATTG	AGGCGATTTG	TCCTACTGTA
Alelo D-S1	AATGGTATAA	TGATAAGAAA	TAGAGAGAAG	TAGGAGATTG	AGGCGATTTG	TCCTACTGTA
Alelo F-S1	AATGGTATAA	TGATAAGAAA	TAGAGAGAAG	TAGGAGATTG	AGGCGATTTG	TCCTACTGTA
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	125	135	145	155	165	175
Alelo A-S1	ATAAATGGTT	GTTCTACTGG	TTGGCCTCCA	ATTCAAGTTA	GGATAATTGA	GTTGGCTACG
Alelo B-S1	ATAAATGGTT	GTTCTACTGG	TTGGCCTCCA	ATTCAAGTTA	GGATAATTGA	GTTGGCTACG
Alelo C-S1	ATAAATGGTT	GTTCTACTGG	TTGGCCTCCA	ATTCAAGTTA	GGATAATTGA	GTTGGCTACG
Alelo D-S1	ATAAATGGTT	GTTCTACTGG	TTGGCCTCCA	ATTCAAGTTA	GGATAATTGA	GTTGGCTACG
Alelo F-S1	ATAAATGGTT	GTTCTACTGG	TTGGCCTCCA	ATTCAAGTTA	GGATAATTGA	GTTGGCTACG
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	185	195	205	215	225	235
Alelo A-S1	AGAAGTCAGA	AGAAGATTTG	TGTTAGTGGT	CGGAAGATGT	TACTTCGTTG	TTTGGAGGTG
Alelo B-S1	AGAAGTCAGA	AGAAGATTTG	TGTTAGTGGT	CGGAAGATGT	TACTTCGTTG	TTTGGAGGTG
Alelo C-S1	AGAAGTCAGA	AGAAGATTTG	TGTTAGTGGT	CGGAAGATGT	TACTTCGTTG	TTTGGAGGTG
Alelo D-S1	AGAAGTCAGA	AGAAGATTTG	TGTTAGTGGT	CGGAAGATGT	TACTTCGTTG	TTTGGAGGTG
Alelo F-S1	AGAAGTCAGA	AGAAGATTTG	TGTTAGTGGT	CGGAAGATGT	TACTTCGTTG	TTTGGAGGTG
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	245	255	265	275	285	295
Alelo A-S1	TGAAGTAGTG	GAAC TAGTAT	AAGGATAAAG	ATTGAGAATA	AAAGGGCTAA	GACTCCT-CC
Alelo B-S1	TGAAGTAGTG	GAAC TAGTAT	AAGGATAAAG	ATTGAGAATA	AAAGGGCTAA	GACTCCT-CC
Alelo C-S1	TGAAGTAGTG	GAAC TAGTAT	AAGGATAAAG	ATTGAGAATA	AAAGGGCTAA	GACTCCT-CC
Alelo D-S1	TGAAGTAGTG	GAAC TAGTAT	AAGGATAAAG	ATTGAGAATA	AAAGGGCTAA	GACTCCTACC
Alelo F-S1	TGAAGTAGTG	GAAC TAGTAT	AAGGATAAAG	ATTGAGAATA	AAAGGGCTAA	GACTCCT-CC
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	.....	
	305	315	325	335		
Alelo A-S1	TAGTTTGTTA	GGAATAGA-G	CGTAAGATTG	CATAGGCGAA	TAGG	
Alelo B-S1	TAGTTTGTTA	GGAATAGA-G	CGTAAGATTG	CATAGGCGAA	TAGG	
Alelo C-S1	TAGTTTGT-A	GGAATAGA-G	CG-AAGAT-G	CATA-----	----	
Alelo D-S1	TAGTTCGTCA	GGAATAGAAG	CGTGCTCCCC	CATTCTCGA-	TA--	
Alelo F-S1	TAGTTTGTTA	GGAATAGA-G	CG-AACCTCC	CATAGC----	----	

## Anexo F

Secuencias nucleotídicas de los alelos del fragmento de *citocromo b* y de las diferentes especies de tiburones analizadas para la filogenia.

	5	15	25	35	45	55
P_glauca	-----	-----	-----	-----	-----GTA	GGAGATTGAG
C_carcharia	-----	-----	-----	-----	-----	-----
C_plumbeus	-----	-----	-----	-----	-----GTA	GGAGATTGAG
S_lewini	-----	-----	-----	-----	-----GTA	GGAGATTGAG
C_porosus	-----	-----	-----	-----	-----GTA	GGAGATTGAG
S_tiburo_t	-----	-----	-----	-----	-----GTA	GGAGACTGAG
S_tiburo_v	-----	-----	-----	-----	-----GTA	GGAGATTGAG
G_cuvier	-----	-----	-----	-----	-----GTA	GGAGATTGA-
N_breviros	-----	-----	-----	-----	-----GTA	GGAGATTGA-
C_monstros	-AGATATCTC	AACAGCCTTT	TCCTCAGTTA	TCCATATCTG	CCGAGATGTA	AATATATGGAT
	65	75	85	95	105	115
P_glauca	-GC-AATTTG	TCCTACTATC	ATGAATGGTT	G TTC-----T	ACTGGTTGGC	CTCCAATTCA
C_carcharia	-----	-----A	ATAAATGGTT	G TTC-----A	ACTGGTTGGC	CTCCGATTCA
C_plumbeus	-GC-AATTTG	TCCTACTATA	ATGAATGGTT	G TTC-----T	ACTGGTTGAC	CTCCAATTCA
S_lewini	-GC-GATTTG	TCCTACTGTA	ATAAATGGTT	G TTC-----T	ACTGGTTGGC	CTCCAATTCA
C_porosus	-GC-AATTTG	TCCTACTATA	ATGAATGGTT	G TTC-----T	ACTGGTTGAC	CTCCAATTCA
S_tiburo_t	-GC-GATTTG	TCCTACTGTA	ATAAATGGTT	G TTC-----T	ACTGGTTGGC	CTCCAATTCA
S_tiburo_v	-GC-GACTTG	TCCTACTGTA	ATAAATGGTT	G TTC-----T	ACTGGTTGGC	CTCCAATTCA
G_cuvier	AGC-AATTTG	TCCTACTGTA	ATAAATGGTT	G TTC-----T	ACTGGTTGTC	CTCCAATTCA
N_breviros	AGC-GATTTG	TCCTACTATA	ATAAATGGTT	G TTC-----T	ACTGGTTGGC	CTCCAATTCA
C_monstros	GACTAATACG	TAATATTCAT	GCCAATGGGG	CCTCCTTATT	TTTTATTTGC	CTTACCTTC
	125	135	145	155	165	175
P_glauca	AGTTAGAATT	AGAAAGTTAG	CTACAAGAAG	T-CAGAAGAA	GATTTGTGTT	ATAGGTCGAA
C_carcharia	AGTCAGAACT	AGTATGTTGG	CTACAAGAA	T-CAGAAAAA	GACTTGTGTA	AGGGGGCGGA
C_plumbeus	AGTTAAAATG	ATTGAGTTAG	CTACGAGGAA	T-CAGAAGAG	GATTTGTGTT	ATTGGTCGGA
S_lewini	AGTTAGGATA	ATTGAGTTGG	CTACGAGAAG	T-CAGAAGAA	GATTTGTGTT	AGTGGTCGGA
C_porosus	AGTTAAAATG	ATTGAGTTAG	CTACGAGGAA	T-CAGAAGAG	GATTTGTGTT	ATTGGTCGGA
S_tiburo_t	GGTTAGGATA	ATTGAGTTAG	CCACGAGGAG	T-CAGAAAAA	GATTTGTGTT	AGTGGTCGAA
S_tiburo_v	GGTTAGGATA	ATTGAGTTAG	CCACGAGGAG	T-CAGAAAAA	GATTTGTGTT	AGTGGTCGAA
G_cuvier	GGTTAAAATA	ATTGAGTTAG	CTACGAGAAG	T-CAGAAGAA	GATTTGTGTA	AGTTGTTCGGA
N_breviros	AGTTAAAATA	ATTGAGTTAG	CTACAAGAAA	T-CAGAAGAA	GATTTGTGTG	AGAGGTTCGGA
C_monstros	ATGTAGGACG	AG-GTATTTA	TTATGGGTCT	TATTTATTTA	AAGAACATAG	AAACGTTCGGA
	185	195	205	215	225	235
P_glauca	AGATGGTGCT	TCGTTGTT-T	AGAGGTA---	-----TGTAG	AAGAGGCACT	AATATGAGGA
C_carcharia	AGGTGCTGCT	ACGTTGTT-T	GGAGGTG---	-----TGAAG	AAAGGGGACT	AATATAAGAA
C_plumbeus	AGATGGTACT	TCGTTGTT-T	AGAAGTG---	-----TGGAG	GAGAGGAACT	AATATAAGGA
S_lewini	AGATGTTACT	TCGTTGTT-T	GGAGGTG---	-----TGAAG	TAGTGGAACT	AGTATGAGGA
C_porosus	AGATGGTACT	TCGTTGTT-T	AGAAGTG---	-----TGGAG	GAGAGGAACT	AATATAAGGA
S_tiburo_t	AGATGTTACT	TCGTTGTT-T	GGAGGTG---	-----TGGAG	TAATGGAACG	AGTATGAGGA
S_tiburo_v	AGATGTTACT	TCGTTGTT-T	AGAAGTG---	-----TGGAG	TAATGGAACG	AGTATGAGGA
G_cuvier	AGGTGCTGCT	TCGTTGTT-T	AGAGGTG---	-----TGGAG	AAGAGGAATT	AGTATGAGGA
N_breviros	AGATGATACT	TCGTTGTT-T	TGAGGTG---	-----TGGAG	AAGGGGGACT	AGTATGAGGA
C_monstros	GTAGTCCTCC	TTATCCTTGT	AATAATAACA	GCCTTCGTAG	GCTATGTACT	GCCATGAGGA

	245	255	265	275	285	295
P_glauca	TAAAAAT-AG	AGAATAGGAG	-AGCTAGGAC	TCCT--CCTA	GTTT--ATTA	GGGATGGA-T
C_carcharia	TGAGGAT-GG	AAAATAGAAG	-GGCTAAGAC	TCCT--CCTA	ATTT--ATTA	GGAATGGA-T
C_plumbeus	TAAAAAT-AG	AAAATAGGAG	-GGCTAGGAC	TCCT--CCTA	GTTT--GTTA	GGGATTGA-G
S_lewini	TAAAGAT-TG	AGAATAAAAAG	-GGCTAAGAC	TCCT--CCTA	GTTT--GTTA	GGAATAGA-G
C_porosus	TAAAAAT-AG	AAAATAGGAG	-GGCTAGGAC	TCCT--CCTA	GTTT--GTTA	GGGATTGA-G
S_tiburo_t	TAAAGAT-AG	AAAATAGGAG	-GGCTAGGAC	TCCT--CCTA	GTTT--GTTG	GGGATAGA-A
S_tiburo_v	TAAAGAT-GG	AGAATAGGAG	-GGCTAAGAC	TCCT--CCTA	ATTT--GTTG	GGGATAGA-A
G_cuvier	TGAAAAT-AG	AGAATACTAG	-GGCTAGAAC	TCCT--CCTA	GTTT--ATTG	GGGATAGA-A
N_breviros	TGAAAAT-GG	AGAATAGGAG	-GGCTAGGAC	TCCT--CCTA	GTTT--GTTA	GGAATAGA-G
C_monstros	CAAATAT-CC	TTTTGAGGTG	CTACCGTTAT	TACTAACCTA	TTATCTGCTA	TCCCTTTCAT
	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....		
	305	315	325	335		
P_glauca	CGGAGGATGG	C--ATA-GGC	AAATAGGAAG	TATCATTC--		
C_carcharia	CGGAGGATGG	C--GTA-GGC	AAATAGGAAG	TATCATTC--		
C_plumbeus	CGTAAGATTG	C--ATA-GGC	GAATAAGAAG	TATCATTC--		
S_lewini	CGTAAGATTG	C--ATA-GGC	GAATAGGAAG	TATCATTC--		
C_porosus	CGTAAGATTG	C--ATA-GGC	GAATAAGAAG	TATCATTC--		
S_tiburo_t	CGTAGAATTG	C--ATA-AGC	GAATAAGAAG	TATCATTC--		
S_tiburo_v	CGTAGAATTG	C--GTA-AGC	GAATAAGAAG	TATCATTC--		
G_cuvier	CGTAAGATTG	C--ATA-AGC	AAATAAGAAG	TATCATTC--		
N_breviros	CGTAGGATTG	C--ATA-GGC	AAATAAGAAG	TATCATTC--		
C_monstros	CGGAGACTTA	TTAGTACAAT	GAATCTGAGG	TGGTTTTTC-		