



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS  
BIOLOGIA EVOLUTIVA

ESTRUCTURA GENÉTICA Y FILOGEOGRAFÍA DEL TIBURÓN  
MARTILLO (*SPHYRNA LEWINI*) EN EL OCÉANO PACÍFICO  
MEXICANO Y GOLFO DE MÉXICO, MEDIANTE MARCADORES  
MITOCONDRIALES Y NUCLEARES

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**EVANGELINA CASTILLO OLGUIN**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MANUEL URIBE ALCOCER  
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGIA

COMITÉ TUTOR: DR. LUIS MEDRANO GONZALEZ  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM  
DR. LUIS MEDRANO GONZALEZ  
INSTITUTO DE ECOLOGIA, UNAM

MÉXICO, D.F. AGOSTO, 2013.



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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS  
BIOLOGIA EVOLUTIVA

ESTRUCTURA GENÉTICA Y FILOGEOGRAFÍA DEL TIBURÓN  
MARTILLO (*SPHYRNA LEWINI*) EN EL OCÉANO PACÍFICO  
MEXICANO Y GOLFO DE MÉXICO, MEDIANTE MARCADORES  
MITOCONDRIALES Y NUCLEARES

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**EVANGELINA CASTILLO OLGUIN**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MANUEL URIBE ALCOCER  
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGIA

COMITÉ TUTOR: DR. LUIS MEDRANO GONZALEZ  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM  
DR. LUIS MEDRANO GONZALEZ  
INSTITUTO DE ECOLOGIA, UNAM

MÉXICO, D.F. AGOSTO, 2013.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/288/13

ASUNTO: Oficio de Jurado

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **15 de abril de 2013**, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** del (la) alumno (a) **CASTILLO OLGUÍN EVANGELINA** con número de cuenta **96576229** con la tesis titulada: "**ESTRUCTURA GENÉTICA Y FILOGEOGRAFÍA DEL TIBURÓN MARTILLO (*Sphyrna lewini*) EN EL OCÉANO PACÍFICO MEXICANO Y GOLFO DE MÉXICO, MEDIANTE MARCADORES MITOCONDRIALES Y NUCLEARES**", realizada bajo la dirección del (la) **DR. MANUEL URIBE ALCOCER**:

Presidente:	DRA. ELLA GLORIA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ
Vocal:	DR. JUAN JOSÉ MORRONE LUPI
Secretario:	DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU
Suplente:	DRA. MARÍA DE LOURDES MUÑOZ MORENO
Suplente	DR. LUIS MEDRANO GONZÁLEZ

De acuerdo con lo anterior, el(a) alumno(a) se acogió a la nueva normatividad, con base en el artículo QUINTO TRANSITORIO en apego a lo establecido en el Artículo 31 del Reglamento General de Estudios de Posgrado (9 octubre de 2006).

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F. a 3 de junio de 2013.

Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga  
Coordinadora del Programa

MCAA/MJFM/ASR/grf\*



## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Posgrado de Ciencias Biológicas de la UNAM, el cual me permitió continuar con mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca completa, otorgada del 2006-2010 para la realización de mi estudio doctoral.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, que financió los proyectos IN-208408 y IN-223206, a los cuales estuvo vinculado este trabajo de tesis.

Agradezco a mi tutor principal el, Dr. Manuel Uribe Alcocer, por su valioso apoyo académico, profesional y personal, para el desarrollo de este estudio y por haberme brindado la confianza para implementar nuevas técnicas en el laboratorio de genética del ICMyL, UNAM. Doctor, gracias por su calidez y amistad desde que llegue a su laboratorio.

Agradezco el gran apoyo que me otorgó mi comité tutorial, Dr. Luis Medrano González y Dr. Daniel Piñero Dalmau, quienes siempre se mostraron interesados en el proyecto mediante sus acertadas aportaciones, además de proporcionar siempre una gran disposición para apoyarme y orientarme en este trabajo.

## **AGRADEZCO:**

A el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, institución que me brindo el espacio para el desarrollo de este estudio. Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México, por haber sido pilar fundamental en mi formación profesional, académica y cultural de mi existencia.

A mi jurado revisor el Dr. Juan José Morrone Lupi, la Dra. Lourdes Muñoz Moreno y la Dra. Ella Vázquez Domínguez, por sus acertados comentarios al trabajo de tesis y su pronta respuesta a la revisión. Ya que sus comentarios contribuyeron a una mayor calidad del trabajo y edición de la tesis.

A Dios, por la vida y todo aquello que ha puesto en mi camino, bueno y no tan bueno, por que gracias a todo ello soy lo que soy y soy feliz.

A mi esposo Arturo Álvarez Aguilar, que ha sido mi luz constante, incansable y radiante, que me brinda su luz de amor para seguir en el camino a pesar de lo difícil que sea, siempre lo vuelve ameno y hermoso. Gracias mi corazón por estar allí para apoyarme, he impulsarme a seguir adelante en cada momento. TATT.

A mis padres Evangelina Olguín y Alfredo Castillo, por ser co-creadores de mi vida, por su gran amor, apoyo, paciencia, por ser un ejemplo de tenacidad, honestidad y trabajo. Por una infinidad de elementos, que me han proporcionado a lo largo de mi camino, para llegar hasta este momento. Los amo mis muñecos de sololoy.

A mi hermano, a mi cuñada y a mi pequeña Regina, por ser parte de mi familia y por su apoyo.

A mis tíos Lalo y Carmelita, por siempre estar presentes con palabras de ánimo para continuar en mi trabajo.

A Lulú, por su gran amistad y apoyo para la realización de tramites para culminar con esta etapa.

A mis colegas y compañeros del Laboratorio de Genética de Organismos Acuáticos, por compartir sus conocimientos, experiencias académicas y momentos de distracción, durante mi estancias en el "Lab".

A los colegas que colaboraron en la colecta de organismos estudiados en el presente trabajo, ya que fueron clave para su realización.

Y a todas aquellas personas, familiares (tíos y primos), amigos de antaño y reciente, conocidos, administrativos etc, que de una u otra manera me brindaron su apoyo o una palabra de aliento y ánimo durante el proceso de este trabajo.

A todos... Gracias.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>2</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
• La genética poblacional	3
• La filogeografía	6
<b>II. ANTECEDENTES</b>	<b>8</b>
• <b>EL TIBURÓN MARTILLO</b>	<b>8</b>
○ Taxonomía y Sistemática	8
○ Distribución	10
○ Biología y Etología	11
○ Aspectos Evolutivos y Ecológicos.	13
• <b>LA PESQUERÍA DEL TIBURÓN</b>	<b>13</b>
○ El tiburón martillo y su pesquería	17
• <b>GENÉTICA POBLACIONAL DE LOS TIBURONES</b>	<b>18</b>
• <b>ASPECTOS OCEANOGRÁFICOS DEL AREA DE ESTUDIO</b>	<b>21</b>
○ Características Oceanográficas en el Pacífico mexicano	21
○ Características Oceanográficas en el Golfo de México	24
○ Fenómeno “EL NIÑO”	25
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>28</b>
<b>IV. PLANTEAMIENTO DE ESTUDIO</b>	<b>29</b>
<b>V. HIPÓTESIS</b>	<b>30</b>
<b>VI. OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
• <b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>31</b>
• <b>OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>31</b>

---

<b>VII. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>32</b>
• MATERIAL BIOLÓGICO	32
• AISLAMIENTO DE DNA	34
• REGIÓN CONTROL mtDNA, MARCADOR MITOCONDRIAL	34
• MICROSATÉLITES, MARCADOR NUCLEAR	36
• ANÁLISIS DE DATOS	38
○ Análisis de Región Control mtDNA (SSCP's)	38
○ Análisis de Microsatélites	42
○ Análisis Filogeográficos	44
<b>VIII. RESULTADOS</b>	<b>45</b>
• DIVERSIDAD GENÉTICA	45
○ Región control mtDNA	45
○ Microsatélites	48
• DIVERGENCIA POBLACIONAL	56
• AISLAMIENTO POR DISTANCIA	64
• EXPANSIÓN POBLACIONAL Y FLUJO GENÉTICO	68
• DEMOGRAFÍA HISTÓRICA	69
• FILOGEOGRAFÍA	74
<b>IX. DISCUSIÓN</b>	<b>76</b>
• DIVERSIDAD GENÉTICA	76
• DIVERGENCIA POBLACIONAL Y FLUJO GENÉTICO	77
• EXPANSIÓN POBLACIONAL	81
<b>X. CONCLUSIONES</b>	<b>84</b>
<b>XI. REFERENCIAS</b>	<b>85</b>
<b>XII. APÉNDICES</b>	<b>103</b>
<b>XIII. ANEXOS</b>	<b>125</b>

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### FIGURAS

- Figura 1. La filogeografía como punto de unión entre la micro y macroevolución.
- Figura 2. Características cefálicas distintivas del subgénero *Sphyrna*.
- Figura 3. Tiburón martillo (*Sphyrna lewini*), (Griffith y Smith, 1834).
- Figura 4. Distribución geográfica de *S. lewini*, tomada de Fishbase.
- Figura 5. Principales grupos pesqueros a nivel mundial considerados por la FAO.
- Figura 6. Serie de captura mundial de elasmobranquios en 1950-2006.
- Figura 7. Serie histórica de la producción de Sphyrnidae (1991-2008).
- Figura 8. Serie histórica nacional de captura de tiburón y cazón.
- Figura 9. Serie de captura de la familia Sphyrnidae a nivel mundial y en México.
- Figura 10. Corrientes oceanográficas del Pacífico mexicano y Golfo de México.
- Figura 11. Ubicación geográfica de localidades muestras para *S. lewini*.
- Figura 12. Frecuencias haplotípicas del fragmentos de región control de mtDNA.
- Figura 13. Correlación de estimadores de diversidad genética de datos de mtDNA.
- Figura 14. Gráfica de componentes principales para datos de mtDNA.
- Figura 15. Gráfica de componentes principales para datos de microsatélites.
- Figura 16. Análisis Global de STRUCTURE y prueba de Evanno.
- Figura 17. Análisis para el Pacífico de STRUCTURE y prueba de Evanno.
- Figura 18. Gráfica de correlación entre valores de divergencia poblacional  $\Phi_{ST}$  y  $F_{ST}$ .
- Figura 19. Aislamiento por distancia para ambos marcadores.
- Figura 20. Dendrogramas de agrupamientos para datos de mtDNA.
- Figura 21. Dendrogramas de agrupamientos para datos de microsatélites.
- Figura 22. Gráficas del análisis de BEAT, para datos de mtDNA.
- Figura 23. Distribución de diferencias nucleotídicas para el total de datos de mtDNA.
- Figura 24. Distribución de diferencias nucleotídicas para localidades con más de un haplotipo.
- Figura 25. Genealogía de haplotipos de región control de mtDNA, mediante ML.
- Figura 26. Genealogía de haplotipos de región control de mtDNA, mediante distancias.
- Figura 27. Red de haplotipos, obtenidos de región control de un fragmento de mtDNA.

## TABLAS

Tabla 1. Datos de las muestras de *S. lewini* colectadas.

Tabla 2. Pares de iniciadores para microsatélites probados para *S. lewini*.

Tabla 3. Diversidad genética para datos de haplotipos y secuencias de mtDNA.

Tabla 4. Pruebas de neutralidad para localidades que presentan diversidad.

Tabla 5. Número de alelos en los ocho *loci* amplificados, en cada población.

Tabla 6. Resumen estadístico de diversidad para *loci* de microsatélites.

Tabla 7. Análisis de rarefacción, alelos por *loci* observados y estandarizados

Tabla 8. Resumen estadístico de diversidad de microsatélites por población

Tabla 9. Valores de  $\Phi_{ST}$  entre pares de localidades para datos de mtDNA.

Tabla 10. Valores de  $F_{ST}$  entre pares de localidades para datos de microsatélites.

Tabla 11. Valores de  $R_{ST}$  entre pares de localidades para datos de microsatélites.

Tabla 12. Análisis de AMOVA para ambos marcadores.

Tabla 13. Migrantes entre pares de localidades para datos de mtDNA y microsatélites.

Tabla 14. Parámetros de demografía histórica.

Tabla 15. Parámetros de expansión espacial.

## RESUMEN

El tiburón martillo *Sphyrna lewini* es una especie sujeta a importantes niveles de explotación en el Pacífico Oriental. El conocimiento de sus niveles de diversidad y divergencia genéticas así como de los aspectos demográficos históricos de sus poblaciones en esta región, permitirá formular estrategias adecuadas para su conservación y explotación racional. En este estudio, se analizaron muestras provenientes de siete localidades pesqueras del Pacífico mexicano y dos del Golfo de México, mediante el análisis de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP's, por sus siglas en inglés) de un fragmento de la región control mitocondrial y de cinco *loci* de microsatélites. Se observó discrepancia entre los resultados del análisis de divergencia poblacional obtenidos mediante cada marcador, posiblemente como efecto de las diferentes tasas mutacionales de cada uno. Los resultados obtenidos mediante mtDNA, no mostraron divergencia poblacional histórica para las localidades del Pacífico mexicano, sin embargo, se observó una clara y marcada separación histórica entre cuencas oceánicas, que posiblemente sea reflejo de los eventos de separación entre localidades después del cierre del Istmo de Panamá. Asimismo, se observó un único haplotipo compartido entre ambas cuencas oceánicas, presente como reminiscencia de flujo genético o co-ancestría entre regiones oceánicas debido a colonizaciones previas al cierre del Istmo de Panamá. Los análisis de demografía histórica revelaron eventos de expansión espacial relacionados con posibles ciclos glaciales-interglaciales hace aproximadamente 450 000 años. Los datos de microsatélites de la población de Baja California presentaron una divergencia significativa, lo cual no es efecto de un tamaño de muestra pequeño, ya que el análisis de rarefacción no muestra diferencias significativas. La divergencia entre las localidades de Sinaloa y Nayarit con Baja California Sur, podrían ser resultado de un menor flujo genético entre estas poblaciones por tener una distribución relacionada a zonas de transición oceanográfica. Se sugiere que la divergencia de las localidades centrales del Pacífico mexicano debe ser considerada dentro de la administración pesquera y en las políticas de conservación de la especie en la región.

## ABSTRACT

The hammerhead shark, (*Sphyrna lewini*) is a species under a significant level of exploitation in the Eastern Pacific. Knowledge of levels of genetic diversity and divergence as well as the historical demography of their populations in this region might allow the development of appropriate strategies for exploitation. This study analyzed seven fishing locations in the Mexican Pacific and two in the Gulf of Mexico, using the single strand conformation polymorphism (SSCP) of a fragment of the mitochondrial control region and five microsatellite *loci*. There were discrepancies on the results of population divergence obtained by each marker, possibly as a result of different mutation rates. The results with mtDNA, showed historic population divergence of the Mexican Pacific but there is clear and strong historical separation between oceans, which possibly reflects the separation between locations events after closure of the Isthmus of Panama. Also, it was observed a single haplotype shared between the two oceans, present as a reminiscent of gene flow between ocean regions due to colonization prior to the closure of the Isthmus of Panama or as a result of inter-oceanic dispersal. The historical demography analysis revealed spatial expansion events related to possible glacial-interglacial cycles around 450 000 years ago. The microsatellite data showed a significant deviation of the population of Baja California, which is not effect of a sample size small, already that analysis of rarefaction not sample significant differences. Difference between the Sinaloa and Nayarit locations with southern Baja California may be a result of lower gene flow within these populations, which may be related to the distribution of these populations in ocean transition zones. It is suggested that the divergence of the central Mexican Pacific locations should be considered for future fisheries management and conservation of the species in the region.

## INTRODUCCIÓN

Los estudios de genética poblacional permiten relacionar la influencia de eventos geológicos y evolutivos en las condiciones actuales de divergencia de las poblaciones. En el ambiente marino los cambios en las características fisicoquímicas de las masas de agua y corrientes oceánicas, pueden limitar el desplazamiento de los organismos acuáticos, que aunado a las características biológicas de cada especie (e.g. el grado de dispersión, límites de distribución, periodos de reproducción y comportamientos filopátricos), favorecer procesos de diferenciación poblacional.

Dado que el éxito de las pesquerías, radica en establecer los límites de captura adecuados para cada especie explotada, permitiendo la conservación del recurso sin alterar las características propias de diversidad genética. Así como evitar que se altere la dinámica propia de las poblaciones bajo explotación. Los estudios de genética poblacional producen el conocimiento clave para mantener una producción pesquera estable, y permitir el diseño y la planeación de estrategias para la sustentabilidad y conservación de las especies de importancia en la industria pesquera.

## LA GENÉTICA POBLACIONAL

La conservación de las especies y su explotación sostenible tanto de aquellas que se encuentran ampliamente explotadas, como de las que significan un importante reservorio natural en el aspecto ecológico, tiene como punto de partida el análisis de la genética poblacional. Los análisis genéticos poblacionales permiten identificar el número de unidades de manejo, dentro de la administración pesquera de las especies dentro de su distribución (Palsbøll *et al.*, 2007, Ovenden *et al.*, 2009).

También este tipo de estudios pueden identificar los grupos de poblaciones que representan una parte significativa de la herencia evolutiva de la especie, conocidas como Unidades Evolutivamente Significativas (por sus siglas en inglés “Evolutionarily Significant Units”, ESUs, Ryder, 1986), que puede tener un estado de conservación mayor que otras poblaciones. (Moritz, 1994).

La importancia de la variación genética en las poblaciones es proporcionar plasticidad a la población para mantenerse estable bajo condiciones cambiantes en el ambiente en el que se desarrolla. Las variantes genéticas con mayor eficacia biológica proporcionan una mayor adecuación a las poblaciones permitiéndoles superar los cambios drásticos que afectan directamente la dinámica de la población. Asimismo, una menor variación genética en las poblaciones puede ser causada, por procesos como la deriva génica, y los cuellos de botella (Hedrick, 2000).

Por otro lado, la pesquería puede ser considerada como un factor de decremento de variación genética, se considera de manera similar al efecto de selección depuradora (negativa), pues las capturas se encuentran dirigidas a tallas y edades específicas que originan una eliminación continua de variantes genéticas. Estas variantes no serán heredadas a las siguientes generaciones, disminuyendo progresivamente la diversidad tanto a través de esta selección, como por efecto de la deriva génica (Palumbi, 2004; Palumbi y Hedgecock, 2005).

Las fuerzas evolutivas que han actuado a lo largo de la historia de una especie, pueden verse reflejadas en algunos rasgos genéticos como en los cambios en la variación genética, en los procesos de divergencia resultantes, así como en cambios en los tamaños efectivos poblacionales. El conocimiento de estos procesos es un elemento valioso para entender los eventos de su evolución, por lo que son de gran interés en el área de la genética poblacional, así como de la filogeografía.

Las técnicas moleculares son un elemento clave en estudios de genética de poblaciones. Los marcadores más empleados en estudios de poblaciones se encuentran el mtDNA. Sin embargo, el empleo de marcadores nucleares se ha incrementado significativamente (Carvalho y Hauser, 1998; Lui y Cordes, 2004), así como el uso de la secuencia masiva de organismos, también conocida como metagenómica que ha sido utilizada en estudios principalmente de microbiología y para la determinación de especies de comunidades microbianas e invertebrados coexistentes en un mismo habitat (Sleator *et al.*, 2008).

El uso de la información generada por éstos y otros marcadores mitocondriales y nucleares son de gran ayuda en los estudios de genética poblacional y filogeográficos, ya que integran información de regiones genéticas con diferentes

tasas evolutivas, lo que permite entender con mayor claridad la historia de vida de los organismos y las condiciones actuales de sus poblaciones.

Las técnicas moleculares más utilizadas en los inicios de los estudios de genética poblacional fueron los RFLP's (Restriction Fragment Length Polymorphism, Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción), AFLP's (Amplified Fragment Length Polymorphism, Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados) y los RAPD's (Random Amplified Polymorphic DNA, Amplificación aleatoria de DNA polimórfico). Sin embargo, a lo largo del tiempo las nuevas metodologías moleculares, permitieron el desarrollo de otras técnicas como los SSCP's (Single-strand conformation polymorphism, Polimorfismo de conformación de cadenas sencilla) los SNP's (Single Nucleotide Polymorphism, Polimorfismo de un nucleótido) y VNTR's (Variable Number Tandem Repeat, Repeticiones en tándem de número variable), también conocidos como minisatélites y microsátélites, así como el análisis de secuencias nucleotídicas tanto de marcadores mitocondriales como nucleares.

Por último y más recientemente, el uso de microarreglos y de la secuenciación masiva de organismos, han generado gran interés tanto clínicas como dentro de la ecología y conservación de hábitats. Por lo que todas estas técnicas han venido a generar una gran cantidad de información sobre la diversidad, divergencia poblacional y procesos evolutivos de especies tanto de importancia ecológica, como de aquellas altamente explotadas.

La técnica de SSCP's detecta estructuras secundarias en el DNA de cadena sencilla, para la evaluación de polimorfismos en diferentes marcadores o fragmentos específicos (Orita *et al.*, 1989). Esta técnica permite evaluar la variación intra e interpoblacional y tienen la ventaja de proporcionar datos de haplotipos y secuencias permitiendo realizar estudios con gran resolución (Orita *et al.*, 1989; Lessa y Applebaum, 1993). Por otra parte el estudio de las secuencias de DNA permite no sólo evaluar la variación nucleotídica y determinar la estructura genética de las poblaciones, sino también proporciona una gama muy amplia de información como tamaños poblacionales, diferenciación sexual de desplazamiento en el caso de usar marcadores mitocondriales y evaluación de tasas de mutación, entre otras (Sunnucks *et al.*, 2000).

Los microsatélites son marcadores actualmente muy empleados en estudios de genética poblacional, ya que su alta tasa de polimorfismo debida a su elevada tasa de mutación (Zhang y Hewitt, 2003), permite obtener mayor información de las poblaciones y de los niveles de diversidad y divergencias entre éstas. Aunque se ha afirmado que existen algunas desventajas en el uso de microsatélites para el análisis de genética poblacional como la presencia de homoplasias (Goldstein y Scholetterer, 1999), se ha demostrado que ello no representa un problema significativo en estudios poblacionales típicos (Estoup y Cornuet, 1999), donde los niveles de variación compensan los efectos de la evolución por homoplasia. Sin embargo, el efecto causado por el tamaño de los alelos en poblaciones con altas tasas de mutación y tamaños efectivos poblacionales grandes, es importante. (Estoup *et al.*, 2002). En los casos de presencia de alelos nulos, se han propuesto modelos de corrección de datos para evitar una sobreestimación de estos factores, la cual se presenta con frecuencia en los análisis de poblaciones con divergencia y tamaño poblacional con altas tasas de mutación en las regiones adyacentes (Chapuis y Estoup, 2007).

## **LA FILOGEOGRAFÍA**

La filogeografía se considera como el punto de unión entre la microevolución que comprende la genética poblacional, esto es, la variación de la frecuencia de los alelos dentro de las poblaciones, con la macroevolución que abarca las diferencias fijas entre especies y taxones de rango mayor (Figura 1, Hickerson *et al.*, 2010, Jablosnki, 2000). Al integrar conceptos de estas dos grandes áreas de estudio, surge una visión con la que se entienden las relaciones entre coancestría y el flujo genético en el espacio.

La filogeografía es definida como la relación entre los patrones que pueden presentar las genealogías intraespecíficas y los patrones geográficos de distribución de los organismos, o expresado de otra forma, es el estudio de las relación de los principios y procesos que determinan la distribución geográfica de los linajes de genes que se encuentran cercanamente relacionados dentro y entre especies (Avice, 2000; 2004).

Los estudios filogeográficos se han basado principalmente en secuencias de mtDNA por su alta tasa mutacional, por no recombinar y por ser de herencia materna (Lanteri y Confalonieri, 2003). Las diferencias o variantes encontradas en los haplotipos de las secuencias de mtDNA, registran la historia de eventos mutacionales en una historia matrilineal, lo que puede reflejarse en la estructura filogenética en un árbol de genes o dendrograma (Avise, 2000; 2008).

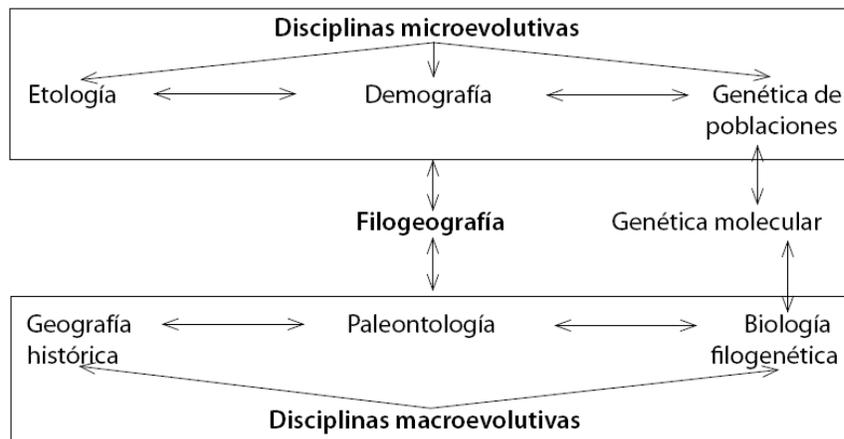


Figura 1. La filogeografía como punto de unión entre la micro y macro evolución, tomado de Vázquez-Domínguez (2007).

Sin embargo, se ha observado que el uso de mtDNA representa el análisis de un solo locus que puede encontrarse ligado a selección. En el caso de los marcadores nucleares empleados para análisis filogeográficos, pueden presentar algunas problemáticas de interpretación relacionadas con la característica recombinante y la posibilidad de que cada locus presente una historia evolutiva independiente. Por lo que cada vez, es más empleado el uso combinado y comparativo de genealogías obtenidas por datos de marcadores mtDNA y nucleares (Domínguez-Domínguez y Vázquez-Domínguez, 2009).

Los análisis filogenéticos al realizarse mediante estos dos tipos de marcadores, permite observar la congruencia de las genealogías obtenidas entre ellos, que debe corresponder más a la filogenia real de la especie y no del gen, e igualmente el análisis realizado en dos especies que comparten una distribución, lo que permite evaluar la congruencia entre sus patrones filogeográficos (Avise, 2000; 2008).

## ANTECEDENTES

### EL TIBURÓN MARTILLO

#### Taxonomía y sistemática

Los tiburones son un grupo faunístico sumamente antiguo datados de aproximadamente 423 millones de años (Ferretti *et al.*, 2010), con relativamente pocos cambios a través de su historia. Se conocen alrededor de 400 especies de tiburones vivientes, pero sólo algunas de éstas tienen importancia comercial.

Las 400 especies de tiburones descritas se componen en 8 órdenes, 30 familias y 100 géneros que viven actualmente en todos los mares del mundo (Compagno, 1988). El tiburón *S. lewini* o tiburón martillo se incluyen dentro de la familia Sphyrnidae, la cual pertenece al orden de los Carcharhiniformes mismo que cuenta con el mayor número de familias y especies de los tiburones dentro del Phylum Chordata.

La familia Sphyrnidae, se conforma de un solo género denominado *Sphyrna* Gill, 1872, el cual se caracteriza por tener la cabeza en forma de martillo. Este género comprende dos subgéneros: *Eusphyrna* y *Sphyrna*. *Eusphyrna* se encuentra compuesto de una sola especie (*E. blochii*) que presenta la parte cefálica en forma de tubo y muy angulosa, mientras que el subgénero *Sphyrna* se caracteriza por presentar la parte cefálica más plana y con mayor curvatura en la parte frontal del morro.

El subgénero *Sphyrna* está compuesto por 8 especies: *Sphyrna tiburo*, *Sphyrna tudes*, *Sphyrna corona*, *Sphyrna media*, *Sphyrna mokarran*, *Sphyrna zigaena*, *Sphyrna couardi* y *Sphyrna lewini* (Figura 2; Compagno, 1984).

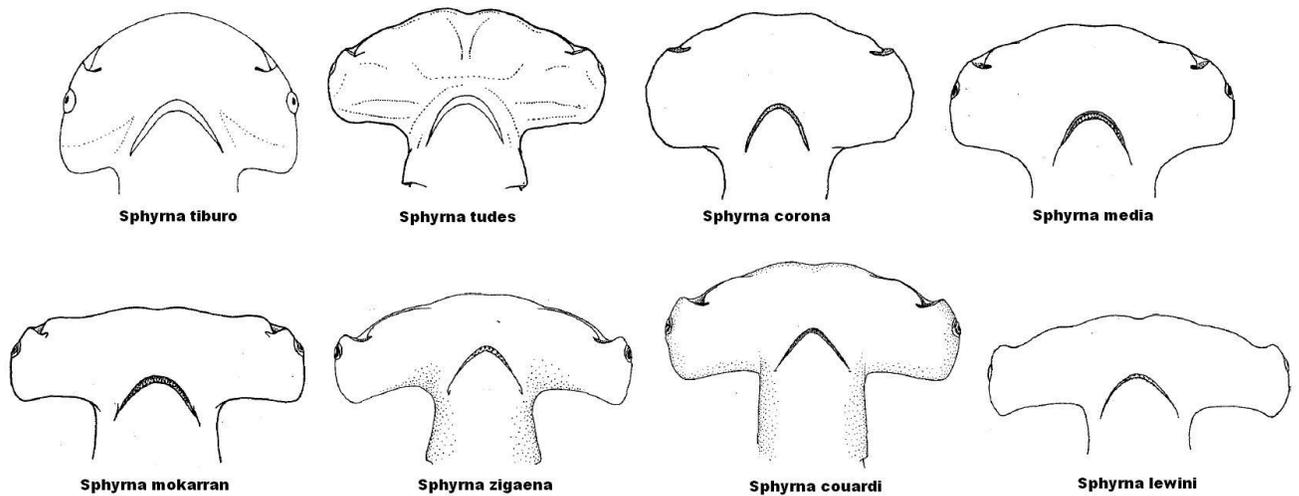


Figura 2. Características cefálicas distintivas del subgénero *Sphyrna*.

El tiburón *Sphyrna lewini* presenta la característica distintiva de la parte cefálica dividida por una hendidura cefálica central originando dos lóbulos frontales que se encuentran visiblemente divididos, además de presentar la curvatura frontal poco marcada, lo que la distingue de las otras especies. Esta especie es comúnmente llamada tiburón martillo y en algunas localidades de regiones del Pacífico se conoce como “cornuda prieta” (SAGARPA, 2001).

Clase: Elasmobranchimorphi

Subclase: Chondrichthyes

Infraclase: Elasmobranchii

Superorden: Euselachii

Orden: Carcharhiniformes

Familia: Sphyrnidae

Género: *Sphyrna*

Especie: *S. lewini*

Griffith y Smith, 1834.

*S. lewini* se caracteriza por presentar el origen de la primera aleta dorsal se encuentra por delante de la inserción de las aletas pectorales, la segunda aleta dorsal es pequeña y menor que la altura de la anal, el borde posterior más recto que cóncavo; las aletas pélvicas con bordes posteriores estrechos y apenas cóncavos. La aleta anal, es más larga que la segunda dorsal, el origen se encuentra por delante de la segunda dorsal y la base es el 4.3 al 6.4% del largo total (Figura 3).

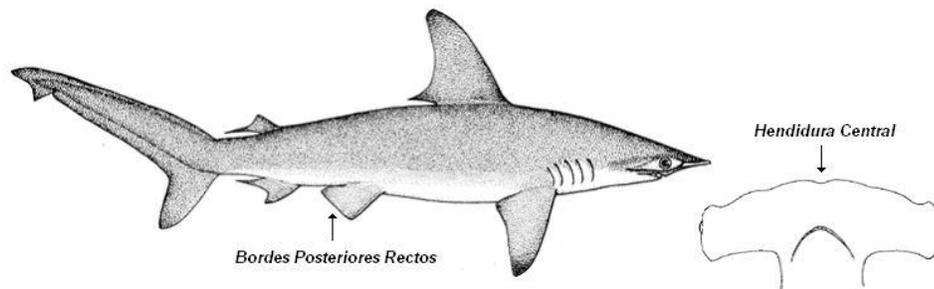


Figura 3. Tiburón martillo (*S. lewini*, Griffith y Smith, 1834).

Los organismos de esta especie presentan una coloración gris marrón a café en la parte dorsal y en los flancos, las puntas pectorales son oscuras a negras y la parte ventral es blanca (Compagno, 1984; Carrera, 1991). Se han observado organismos adultos de hasta 420 cm. de longitud total (LT) como máximo, sin embargo, las tallas más comunes son de alrededor de 300 cm. de LT (Compagno, 1984; Cervigón *et al.*, 1992), siendo para machos entre de 295 a 301 cm., y para hembras de los 309 a 331 cm. de LT (INP, 1996; Chen *et al.*, 1990).

### Distribución

Los tiburones *S. lewini* generalmente se encuentran en aguas tropicales, así como en aguas profundas adyacentes a la plataforma continental. Se pueden encontrar cerca de islas o de regiones costeras. Habitan zonas pelágicas, costeras y en algunas ocasiones regiones semi-oceánicas, se les puede encontrar con mayor frecuencia en aguas superficiales, aunque llega a profundidades de 275 m a 980 m. (Smith, 1997; Jorgensen *et al.*, 2009). Son considerados organismos cosmopolitas que

se distribuyen principalmente en regiones tropicales y subtropicales desde los 46° N a los 36° S (Figura 4).

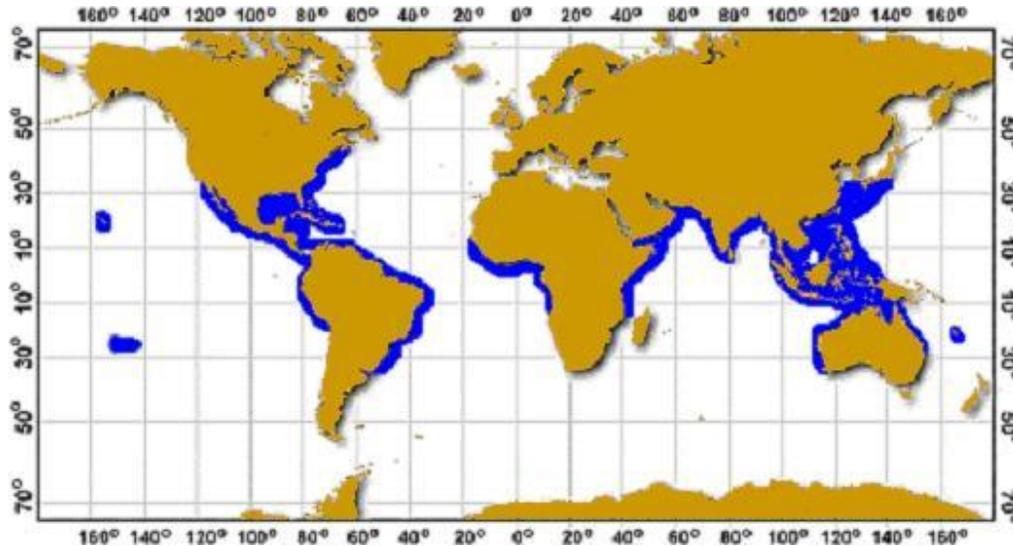


Figura 4. Distribución geográfica de *S. lewini*, tomada de Fishbase (<http://www.fishbase.org/summary/SpeciesSummary.php?id=912&lang=English>).

Se han encontrado organismos de *S. lewini* en la región occidental del Atlántico, desde Nueva Jersey hasta la parte sur de Brasil, incluyendo la región del Caribe y Golfo de México, mientras que en el este se le ha registrado en todo el Mar Mediterráneo hasta Namibia. En el Pacífico en la zona del Indo-oeste, se reporta desde el Sur de África, el Mar Rojo y el Océano Índico hasta Pakistán y en toda la región de islas asiáticas, así como desde Japón hasta Australia. En la zona del Pacífico Central se distribuyen en las costas de Hawai y Tahití, mientras que en el Pacífico Este, se encuentran desde California y Golfo de California hasta el Ecuador.

### **Biología y etología**

La reproducción de *S. lewini* es vivípara con saco vitelino y con períodos de gestación de 10 meses. Las hembras pueden llegar a tener de 10 a 48 embriones por preñez, dependiendo de la longitud total de cada hembra (Compagno, 1984; Anislado-Tolentino y Robinson-Mendoza, 2001). Se alimenta principalmente de peces como

*Sardinops caeruleus*, *Scomber japonicus*, *Synodus evermanni* y *Engraulis mordax*, así como de algunos cefalópodos como: *Dosidicus gigas*, *Stenoteuthis oualaniensis*, *Abralopsis affinis*, *Abralopsis falco* y *Onchotheuthis banksii* (Aguilar-Castro, 2003).

La proporción de sexos suele ser de 1:1.6 (machos: hembras), sin embargo, en las costas de Michoacán se ha registrado una proporción de 1:1.2 (Compagno, 1984; Carrera, 1991; Anislado-Tolentino y Robinson-Mendoza 2001). Las tallas de primera madurez sexual para machos está entre los 140 y 174 cm. de LT y para hembras alrededor de los 199 a 213 cm. (Compagno, 1984; Anislado-Tolentino y Robinson-Mendoza, 2001).

Los juveniles de *S. lewini* suelen encontrarse cerca de la costa agrupados por cohortes, mientras que en etapa adulta se llegan a ver solitarios, en parejas (Cervigón *et al.*, 1992) o en grupos (Compagno, 1984; Compango, 1998). Se ha sugerido que la segregación por cohortes de edad y sexo en estos organismos favorece la maduración y crecimiento rápido de las hembras, sin que exista competencia por alimento debido a que las hembras requieren de un mayor gasto energético que los machos, por lo que se puede observar a los machos solitarios y rara vez en agrupamientos de hembras (Klimley, 2003).

Los agrupamientos de tiburones jóvenes en zonas determinadas se conocen como guarderías y pueden representar una ventaja selectiva de alimentación y reproducción, ya que se cree que el agrupamiento de organismos de ciertas edades en zonas de alta productividad asegura una mayor sobrevivencia de los neonatos de la especie (Keeney *et al.*, 2005).

Se han registrado migraciones de grandes cardúmenes hacia latitudes altas durante el verano en el sureste de África (Compagno, 1984), y asimismo, se ha registrado una gran abundancia de estos organismos en el Golfo de California durante el verano, lo que ha sido atribuido a la presencia de alimento en la zona (Klimley *et al.*, 2005). En el Pacífico se ha observado el desplazamiento anual de tiburones martillo los cuales son afectados por la temperatura de las corrientes oceánicas, desplazándose hasta latitudes templadas en épocas de verano, donde las aguas van de cálidas a templadas y retornan a regiones locales o cálidas en periodos de invierno. Lo anterior sugiere un efecto filopátrico para esta especie (Klimley, 2003), como se ha

observado en algunas otras especies de tiburones (Hueter y Manire, 1994). Sin embargo, no se conoce un patrón específico de migración de esta especie en el Pacífico.

Es posible que el fenómeno de filopatría esté presente en las poblaciones de *S. lewini* en el Pacífico mexicano por sus características biológicas y etológicas y por las evidencias genéticas de algunas de las poblaciones que se han estudiado. La presencia de sitios particulares de alimentación, reproducción y sitios denominados guarderías, donde con frecuencia se observa la agrupación de cohortes por edad (Duncan y Holland, 2006), son un elemento clave que propiciaría la filopatría en *S. lewini*.

### **Aspectos evolutivos y ecológicos**

El género *Sphyrna* es de los géneros más recientes según algunas filogenias realizadas mediante diversos marcadores en tiburones, tanto taxonómicos como moleculares, ubicando el origen de este género en aproximadamente 10 a 16 millones de años, mientras que el origen aproximado del surgimiento de la especie *S. lewini* se estima en hace aproximadamente 7 millones de años (Martin *et al.*, 1992; Martin, 1995; Lim *et al.*, 2010).

*S. lewini* tiene gran importancia dentro de los ecosistemas marinos costeros, ya que al pertenecer al último nivel de la cadena trófica, interviene en el balance ecológico de los océanos, puesto que regula las poblaciones de otros organismos de menor tamaño, particularmente de peces pelágicos y calamares.

El tiburón martillo al presentar una longevidad de aproximadamente 25 años, genera un equilibrio permanente en su área de distribución. Sin embargo, el alto grado de explotación que comienza a sufrir, puede generar un desequilibrio importante en los ecosistemas marinos costeros donde se distribuye.

## LA PESQUERIA DEL TIBURÓN

Globalmente existe una alta diversidad de organismos con importancia comercial que la FAO ha ubicado en nueve grandes grupos de pesquerías, dentro de las cuales se encuentran (Figura 5).

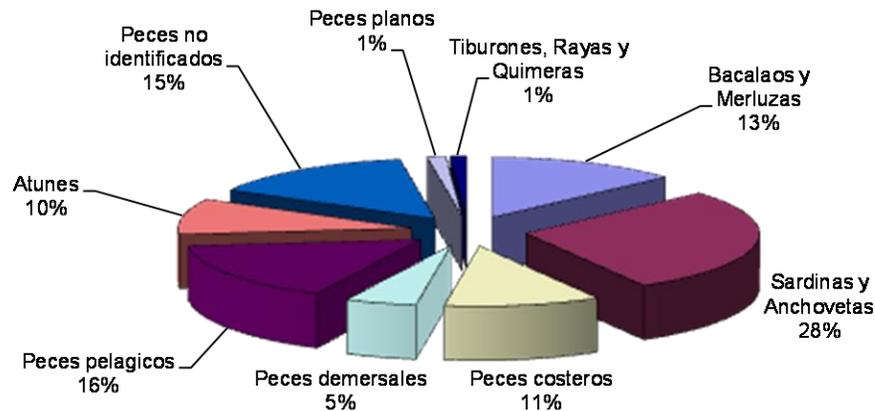


Figura 5. Principales grupos pesqueros a nivel mundial considerados por la FAO. Datos tomados de las bases estadísticas 2008 de la FAO, por volúmenes de captura total en toneladas ([www.fao.org](http://www.fao.org)).

Los elasmobranquios o peces cartilaginosos –tiburones, rayas y quimeras agrupan cerca de 1,000 especies, algunas no descritas aún. Dentro de este gran número de especies aproximadamente 400 corresponden a tiburones. Este grupo de organismos ocupa una amplia variedad de ambientes, desde regiones polares hasta tropicales, encontrándose tanto en zonas costeras como oceánicas, y en aguas someras como profundas. En México se encuentran más de 200 especies de las cuales únicamente se han registrado alrededor de 50 en la pesca comercial, siendo 12 las más capturadas.

La pesquería de los elasmobranquios tiene sus inicios a finales de la década de 1920, y uno de los periodos más importantes de captura ocurrió durante la segunda guerra mundial. De estos organismos se extraían altos niveles de Vitamina “A” pero

una vez que se logró sintetizar, la pesquería disminuyó aunque no perdió su importancia en la producción pesquera.

La pesquería de elasmobranquios, se encuentra dentro de las primeras 15 pesquerías a nivel mundial con un promedio aproximado de 695,000 toneladas de captura anual en los años 1990's. La producción pesquera de este grupo se ha incrementado significativamente en los últimos diez años, alcanzando su máxima producción de 900,000 toneladas en 2003. Sin embargo, se observó un ligero decremento en 2006 con una producción de 750,000 toneladas. Esta pesquería se encuentra conformada por una gran diversidad de organismos como son tiburones, rayas y quimeras. Sin embargo, más del 50% de su producción se encuentra representada por los tiburones, con producciones anuales de hasta 500,000 toneladas (Figura 6).

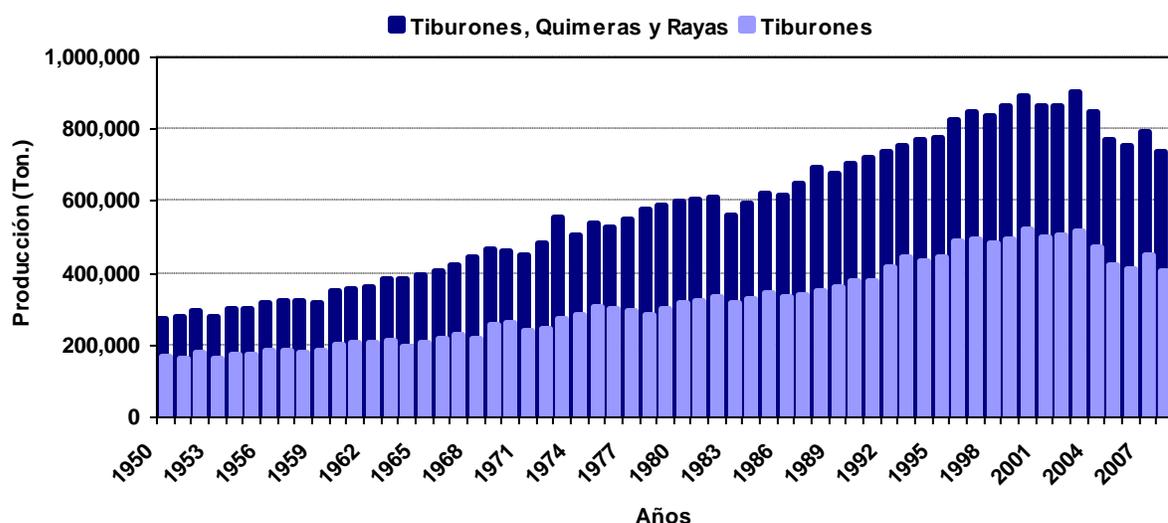


Figura 6. Serie de captura mundial de elasmobranquios (Tiburones, Rayas y Quimeras) y de Tiburones (1950-2009), datos tomados de bases estadísticas de la FAO ([www.fao.org](http://www.fao.org)).

Gran parte de las especies de tiburones de importancia pesquera, pertenecen al orden de los Carcharhiniformes que contiene el mayor número de especies de tiburones, y dentro del cual se encuentra la familia Sphyrnidae que cuenta con especies de importancia comercial. Los Sphyrnidae representan un recurso que ha incrementado su producción en los últimos diez años (Figura 7), principalmente

*Sphyrna lewini*, especie que en 1999 era considerada por la FAO (1999) como una especie dentro de la categoría de recurso con alto nivel de explotación. Actualmente esta especie está integrada a la lista roja de especies bajo amenaza (en A2bd+4bd; IUCN, 2010), lo que implica que a pesar de ser una especie con características biológicas que podrían permitir un equilibrio en las poblaciones explotadas, las estrategias administrativas para esta especie no han sido las adecuadas.

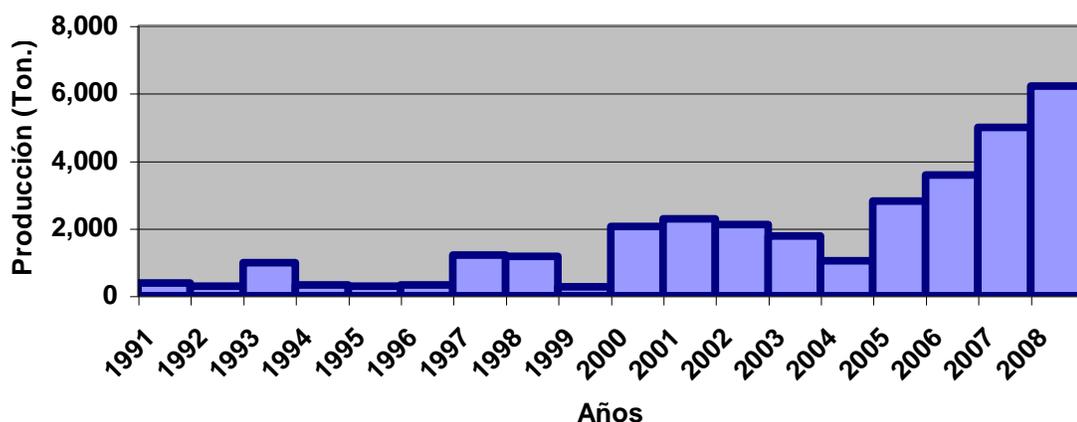


Figura 7. Serie histórica de la producción de Sphyrnidae (1991-2008), datos tomados de bases estadísticas de la FAO ([www.fao.org](http://www.fao.org) ).

Gracias a que México cuenta con aproximadamente 11,122 Km. de litoral marítimo, la productividad pesquera juega un papel importante en la economía nacional. Dentro de las principales pesquerías nacionales se encuentra el grupo de los tiburones, los cuales se ubican dentro de las 10 principales pesquerías a nivel nacional, con aproximadamente 20,000 a 36,000 toneladas de captura anual ([www.sepesca.gob.mx](http://www.sepesca.gob.mx)). Estos niveles de producción se han visto disminuidos en los últimos años (Figura 8), y es por ello que se ha centrado la atención en mejorar y aumentar la captura por especie, así como en incrementar la cantidad de estudios sobre estos organismos, en diversas áreas del conocimiento para proporcionar la información requerida a las instituciones encargadas de generar planes de administración pesquera y conservación del recurso.

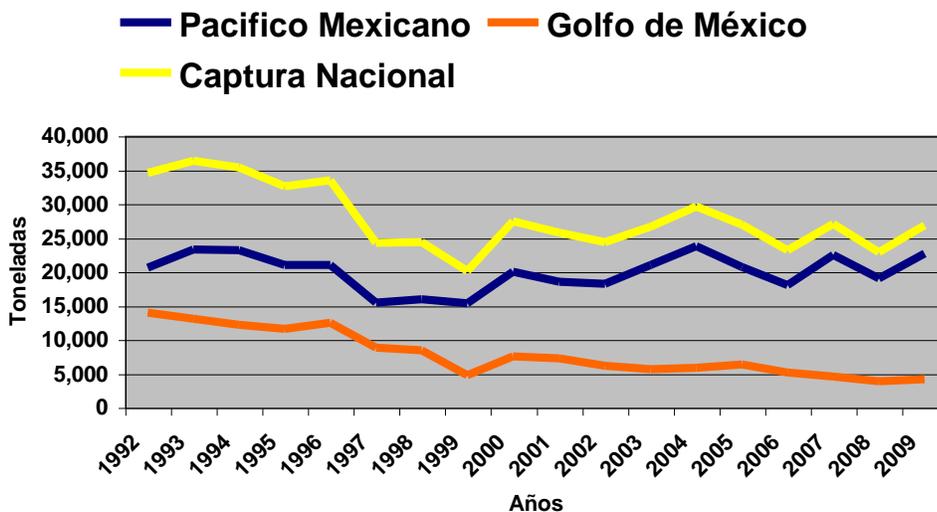


Figura 8. Serie histórica nacional de captura de tiburón y cazón (1992-2010), datos tomados de Anuarios estadístico de acuicultura y pesca [http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario\\_2009\\_capitulo\\_i\\_preliminar](http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario_2009_capitulo_i_preliminar)).

### El tiburón martillo y su pesquería

Se ha mencionado la importancia de *S. lewini* como una especie con grandes volúmenes de producción pesquera nacional, principalmente en regiones del Pacífico como el Golfo de Tehuantepec, donde se registra una pesquería soportada por únicamente dos especies, *C. falciformis* y *S. lewini* (Soriano-Velásquez *et al.*, 2001). Asimismo, en la región del Golfo de Baja California (Márquez-Farias, 2001; Corro-Espinosa, 1997), en el litoral occidental de Baja California y en la región de Jalisco, Colima y Manzanillo, *S. lewini* es una de las especies de tiburones de mayor importancia comercial (Santana-Hernández, 1997; Mendizábal *et al.*, 2001).

También en la región del Golfo de México esta especie es de gran importancia pesquera (Zárate-Borrego, 1996). Los volúmenes de captura por especie determinados por la FAO a nivel mundial para *S. lewini*, sólo han sido determinados en los últimos 20 años por la colaboración de algunos países y muestran una tendencia al incremento en la producción pesquera de esta especie. Los registros obtenidos únicamente para esta especie, se encuentran representados por un número reducido

de pesquerías nacionales, ya que sólo se cuentan con registros de los últimos 7 años donde se pueden observar condiciones estables de captura (Figura 9).

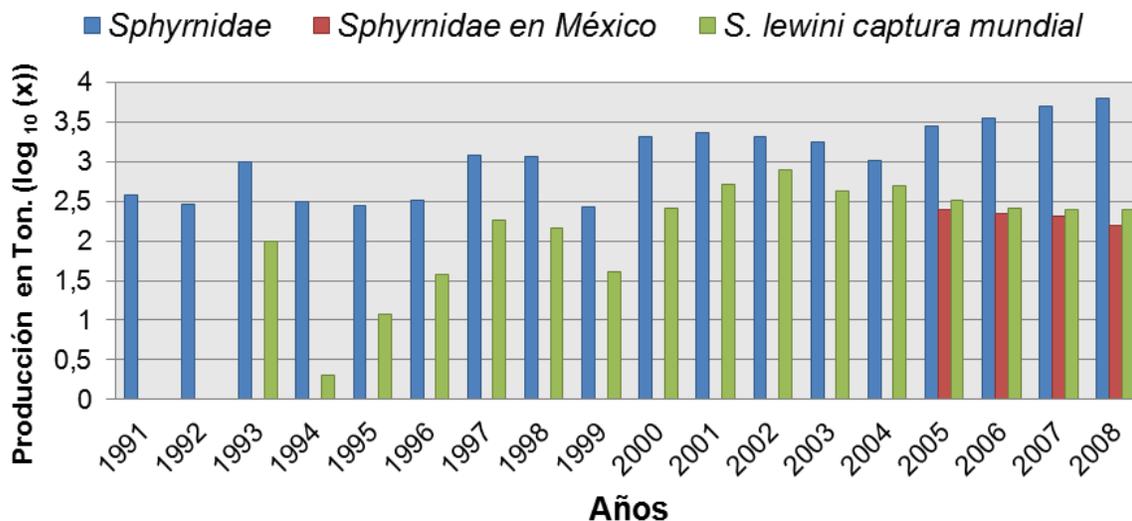


Figura 9. Serie de captura de la familia Sphyrnidae a nivel mundial y nacional y de la captura de *S. lewini* a nivel mundial, datos tomados de la FAO. (<http://www.fao.org/fishery/species/2028/en>). Nota: los datos observados en la gráfica son únicamente de algunas pesquerías a nivel mundial y los valores de producción se encuentran en escala logarítmica.

## GENÉTICA POBLACIONAL DE LOS TIBURONES

Las investigaciones realizadas en tiburones han proporcionado información relevante para entender mejor algunas características, así como eventos y procesos evolutivos e interacciones con otras especies. Sin embargo, la mayor cantidad de estudios corresponden a trabajos enfocados a conocer y comprender sus aspectos biológicos (edad y crecimiento, reproducción y alimentación) y fisiológicos (mecanismos de complejos de histocompatibilidad), con la finalidad de ser utilizados en la industria pesquera y farmacéutica. Mientras que en menor proporción se han realizado estudios de carácter genético y evolutivo.

Los estudios genéticos realizados en tiburones se han enfocado principalmente en aquellas especies de importancia en la industria pesquera (Feldheim *et al.*, 2001; Lewallen *et al.*, 2007; Pereyra *et al.*, 2010), empleando diversas técnicas para la

evaluación de diversidad genética y determinación de estructura poblacional. Se ha observado que a pesar de que los tiburones son un grupo con una gran diversidad de especies, sus niveles de variación genética son bajos respecto a otros organismos marinos.

Martin *et al.*, (1992) reportaron una baja tasa mutacional en tiburones (siete veces menor a la de mamíferos). Esto en las poblaciones puede implicar niveles bajos de diversidad, que aunado a una madurez tardía y una explotación de tallas juveniles, puede originar el colapso pesquero de algunas especie de tiburones (Musick *et al.*, 2000). Estas características genéticas pueden tener un fuerte impacto en la población de estos organismo, pues los efectos de la sobre pesca, pueden reducir drásticamente la variabilidad poblacional mediante la eliminación de genotipos y cohortes particulares (Stevens *et al.*, 2000; Dulvy y Reynolds 2002). Sin embargo a pesar de los reportes de bajas tasas de mutación en tiburones, se considera que en las condiciones actuales, de algunas especies no se encuentran en peligro, mientras que otras con características biológicas vulnerables a la sobreexplotación, requieren una administración más cuidadosa (Musick *et al.*, 2000 a; 2000 b; Cochrane, 2002).

La composición de los volúmenes de las capturas de tiburones es de gran importancia para la industria pesquera. Por ello, algunos de los estudios genéticos realizados en este grupo, han tenido como propósito la identificación de las especies mediante marcadores genéticos, debido a que algunas especies presentan estrecha similitud morfológica. Se han empleado marcadores aloenzimáticos, que permiten un grado aceptable de discriminación de especies, de forma rápida, sencilla y a un bajo costo. Algunos marcadores mitocondriales como el *citocromo b*, han sido empleados mediante la técnica de RFLP's para la comparación entre algunas especies del género *Carcharhinus* de la costa del Atlántico, ya que permite una identificación entre especies de tiburones con mayor grado de certidumbre (Heist y Gold, 1999). También se ha empleado la técnica de PCR múltiplex de regiones ribosómicas para la diferenciación de *Carcharhinus plumbeus* y *Carcharhinus obsesus* (Pank *et al.*, 2001) y de regiones mitocondriales parciales del gen COI para identificar *Rhizoprionodon lalandii* y *Rhizoprionodon porosus* las cuales son muy similares morfológicas (Mendonça *et al.*, 2009).

Existen algunos estudios de genética poblacional en tiburones donde no se ha encontrado estructura poblacional con diversas técnicas como el uso de los AFLP empleados para evaluar el aislamiento poblacional y la diversidad genética en *Carcharias taurus* en Australia, donde se encontraron niveles bajos de diversidad y un aislamiento de las poblaciones del oriente (Stow *et al.*, 2006). Los RAPD han revelado ser útiles en la identificación de especies como el caso de dos especies de rayas, *Dasyatis americana* y *D. controura* las cuales presentaban una problemática de identidad dentro del género *Dasyatis*, (Farías *et al.*, 2012).

Otros casos de estructura poblacional es el caso de *Carcharhinus Sorrah* y *Carcharhinus Tilstoni* que no muestran diferencias significativas en las frecuencias alélicas, en un estudio de aloenzimas realizado en la región norte de Australia (Lavery y Shaklee, 1989). En otros estudios realizados con diferentes marcadores (Heist *et al.*, 1995; 1996a) en los que se realizaron análisis de aloenzimas y DNA mitocondrial (mtDNA) de *C. Plumbeus* y *Rhizoprionodon terranova* del Atlántico y del Golfo de México, tampoco se encontraron diferencias significativas en la distribución de la frecuencia de los alelos, ni entre los haplotipos analizados. Sin embargo, existen otros estudios en los que se ha encontrado estructura poblacional de algunas especies de tiburones como *Isurus oxirhincus*, *Squatina californica*, *Mustelus antarcticus* y *Sphyrna lewini* (Heist *et al.*, 1996b; Gaida, 1997; Ward y Gardner, 1997; Feldheim *et al.*, 2001; Duncan *et al.*, 2006; Nance *et al.*, 2011), mediante diversos marcadores, desde aloenzimas, hasta mtDNA y microsatélites.

Los estudios genéticos poblacionales realizados en tiburones se han incrementado paulatinamente gracias a nuevas metodologías desarrolladas para la determinación y evaluación de la variación y de la estructura poblacional con mayor grado de certidumbre. Asimismo, estos estudios se han enriquecido mediante la adición de análisis de carácter ecológico como evolutivo (Duncan *et al.*, 2006; Schultz *et al.*, 2008), lo que amplía el marco de conocimiento de las condiciones tanto actuales como ancestrales de las poblaciones. Tal es el caso del estudio en *Mustelus schmitti* especie de importancia ecológica, donde se evaluó la diversidad y estructura genética mediante secuencias de mtDNA, en las costas de Uruguay (Pereyra *et al.*, 2010) y el trabajo de Nance *et al.*, (2011) para evaluar la estructura poblacional global en *S.*

*lewini*, bajo el punto de vista de los procesos demográficos, entre otros muchos estudios que se han realizado en otras especies de tiburones mediante este tipo de técnicas y marcadores.

## **ASPECTOS OCEANOGRÁFICOS DEL AREA DE ESTUDIO**

Las características oceanográficas como los cambios de temperatura y salinidad en las aguas superficiales pueden determinar el establecimiento de los organismos y modificar su desplazamiento, funcionando como barreras oceanográficas que pueden alterar la dinámica de las poblaciones a lo largo del tiempo, dando como resultado procesos de diferenciación o estructuración poblacional (Heather *et al.*, 2006; Grant, 2006; Fontaine *et al.*, 2007).

Algunos peces pelágicos y mamíferos marinos con afinidad a zonas costeras, presentan divergencia poblacional que está relacionada con los patrones de corrientes oceanográficas (Fontaine *et al.*, 2007). La distribución de *S. lewini* en el área de estudio podría presentar una mayor divergencia poblacional en el Pacífico mexicano que en el Golfo de México, dadas las características de cada cuenca oceánica.

El Pacífico mexicano tiene características oceanográficas heterogéneas muy particulares, debido a los patrones de corrientes temporales bien identificados, que pueden favorecer o limitar el desplazamiento estos organismos. Por otra parte el Golfo de México es una región más dinámica y altamente compleja que puede originar una menor estructura poblacional, como se ha observado en algunos estudios en tiburones de la parte norte del Golfo de México, donde únicamente se han observado diferencias significativas con poblaciones que se encuentran en el Atlántico, fuera del Golfo de México (Gold y Ricardson, 1998; Keeney *et al.*, 2003).

### **Características Oceanográficas en el Pacífico Mexicano**

El Pacífico mexicano se extiende desde la región norte de la costa occidental de Baja California, pasando por la entrada del Golfo de California (GC) hasta la frontera sur de México. Presenta características oceanográficas diferentes del resto de las

regiones norte y sur del Pacífico oriental. La frontera norte del Pacífico Mexicano se determina mediante la posición de la isoterma de 25°C y la temperatura promedio anual de las aguas superficiales en el Pacífico mexicano fluctúa generalmente entre los 15 y los 31° C, (NOAA, 1980-1990) presentando un incremento hacia el sur.

El Pacífico mexicano cuenta con tres zonas oceanográficas particulares (Golfo de California, Costa Occidental del Golfo de California y Pacífico mexicano tropical) y cada una presenta patrones de corrientes específicos (De la Lanza, 2001). Estas zonas se encuentran principalmente bajo la influencia estacional de diferentes corrientes como: la corriente de California (CC), la corriente Norecuatorial (CN), la contra corriente Norecuatorial (CCN) y la corriente costanera de Costa Rica (CCC) (Figura 10) (Wyrski, 1966; Badan, 1997). Se han descrito tres principales patrones de corrientes estacionales en el Pacífico mexicano (Wyrski, 1965):

- a) De agosto a diciembre la CCN con dirección hacia la costa, se une a la CCC en su flujo hacia el norte y posteriormente entra en la región de la CN entre 10 y 20°N. En el norte, la CC se separa de la costa de Baja California (25°N), alimentando también la CN.
- b) De febrero a abril la CC se intensifica y penetra hacia el sur hasta 20°N, mientras que la CCC está ausente. En el Golfo de Tehuantepec existe un flujo de aguas superficiales hacia afuera de la costa por el efecto local de vientos, como los ocurridos en periodos de Norte.
- c) De mayo a julio la Contracorriente Ecuatorial se forma y la mayor parte de sus aguas fluyen hacia el norte, cerca de la costa, para alimentar la CCC.

El Golfo de California se caracteriza por un clima oceanográfico subtropical, con temperaturas de agua superficial que van de los 14 a los 30° C, presentándose las aguas más cálidas (24 a 30° C) en la región sur del GC. Los vientos del noreste que se hacen presentes en esta región, originan la formación de surgencias costeras fenómeno muy marcado en la boca del GC, donde la incursión de la CC, favorece el incremento de la productividad primaria (Bernal *et al.*, 2001). Este fenómeno de surgencia se sugiere que se estableció durante el pleistoceno temprano, ya que las condiciones de su clima oceanográfico, no han presentado grandes cambios desde su formación hace 5 millones de años aproximadamente (Molina, 1986).

La Costa Occidental de California se encuentra influenciada por la CC principalmente, que se caracteriza por ser de aguas frías entre los 15 y 20° C. La CC se presenta a lo largo de la costa de Baja California desde los 38 a los 25° N, con dirección al sur. La mayor fuerza esta corriente se observa en la primera mitad del año, donde puede desplazarse hasta los 15 a 20° N (cerca del estado de Chiapas) en primavera (Wyrki, 1965). Se ha registrado que la influencia superficial de la CC al interior del GC, se ve limitada en verano por la presencia de la masa de agua del Pacífico tropical oriental proveniente del sureste (Robinson, 1973).

La región del Pacífico mexicano tropical se caracteriza por verse influenciada por varias corrientes como la CNE, la CCC, CCN y en menor influencia pero que se observa en la primera mitad de año la CC. La CNE está alimentada por la CC principalmente en la primera mitad del año, de marzo a junio. En la segunda mitad del año, de julio a diciembre, por masas de aguas del Pacífico Oriental Tropical procedentes del sur y se le encuentra entre los 110° O, y de los 15 a los 20° N (del Golfo de Tehuantepec a Cabo Corrientes) (Cromwell y Bennett, 1959). En el caso de la corriente costanera de Costa Rica (CCC) procedente de la CCN, corre de sur a norte con un flujo estacional que acarrea aguas de baja salinidad. Se observa una mayor presencia de julio a diciembre. Su flujo es a lo largo de la costa de centro América hasta el GT, donde una vez que pasa esta región se incorpora a la CN. Esta última es resultado de la convergencias de la CC y CCC y se caracteriza por tener un flujo en dirección oeste a la altura del ecuador lo que genera un efecto de contra corriente (CCN), de aguas sub-superficiales que se desplazan con una dirección este hacia el continente.

La presencia y convergencia de masas de aguas superficiales que proceden de zonas ricas en nutrientes, generan condiciones ideales para la formación de surgencias que generalmente se asocian a regiones de gran producción pesquera (Fiedler, 1992; Tomczak y Godfrey, 1994). Estas áreas de surgencias, pueden limitar la dispersión de algunos organismos marinos, al originar una mayor permanencia en estas zonas de productividad para procesos de alimentación y alumbramiento, lo que puede propiciar una mayor estructura poblacional (White *et al.*, 2010).

En la costa del Océano Pacífico de la Península de Baja California, se encuentra una de las regiones de surgencias costeras con mayor productividad primaria por unidad de área a nivel mundial (Hutching *et al.* 1995). Así como en la región de la Boca del Golfo de California, donde hay una influencia más directa de la CC en los procesos de surgencias, en la formación de "frentes oceánicos- y en el incremento de la productividad primaria (Molina, 1986). Se ha observado que también las mareas pueden originar un aumento de la productividad primaria cuando se origina una mezcla de la columna de agua en zonas poco profundas o por la interacción con las islas (Merino y Monreal, 2004).

Otra región en el Pacífico mexicano con una alta productividad primaria es el GT, este se caracteriza por la presencia de aguas cálidas provenientes de la CCC, tiene una importante influencia de los vientos que atraviesan el Istmo de Tehuantepec para generar un decremento de temperatura en las aguas superficiales y que junto con las aguas frías de la CC favorecen la formación de surgencias (Trasviña *et al.*, 2004).

### **Características Oceanográficas en el Golfo de México**

El Golfo de México se caracteriza por presentar una temperatura media superficial de 24° C en la zona meridional, mientras que en la septentrional la temperatura es menor (18° C). La Corriente del Golfo, es una de las corrientes de mayor importancia en esta cuenca oceánica. Lleva agua templada que entra al Golfo de México por el canal de Yucatán y sale al Atlántico por el estrecho de Florida. La corriente de lazo es otra de las corrientes oceanográficas importantes en esta zona por generar importantes zonas de surgencias y por ello permite una alta diversidad faunística (Bagma y Haedrich, 2008).

El Golfo de México es un ecosistema marino formado con características oceanográficas, que originan un sistema costero de gran heterogeneidad ambiental y diversidad biológica (Salas-Pérez y Granados, 2008). Sin embargo, se ha observado que los organismos marinos con mayor dispersión en el Golfo de México, presentan poblaciones homogéneas, como resultado de las características oceanográficas denominadas Corrientes de Lazo, que se caracterizan por homogeneizar las regiones

más oceánicas del Golfo de México (Figura 2; Sánchez-Gil, 1985; Keeney *et al.*, 2003; Gold y Richardson, 1998).

El Golfo de México es una cuenca oceánica cerrada que, a diferencia de otras cuencas cerradas como el Mediterráneo, presenta una alta movilidad de masas de agua, las cuales tienen gran influencia de vientos estacionales superficiales, que generan movilidad de aguas de norte a sur durante la época de otoño-invierno y en sentido contrario, de primavera-verano (De La Lanza, 1991; Caso *et al.*, 1979). Superpuesto a los movimientos anteriores se observa un movimiento asociado a la presencia de giros, originados por la Corriente de Lazo que entra al Golfo de México en la plataforma de la parte norte.

Esos giros generalmente tienen un sentido anticiclónico (como las manecillas del reloj), que se desplazan hacia el oeste del Golfo hasta chocar con la plataforma continental en la región de Tamaulipas, donde por conservación de masa y continuidad, se divide en dos giros: uno que se desplaza hacia el norte, sobre la plataforma continental de los Estados Unidos, y otro que toma dirección hacia el sur, sobre la plataforma continental de Veracruz. Este sistema de circulación general puede interactuar con las características topográficas de la zona costera e inducir una circulación local, abundante en giros a menores escalas (Caso *et al.*, 1979).

Se ha sugerido que las variables de los parámetros meteorológicos así como de los oceanográficos, pueden ayudar a entender la dinámica de los sistemas marinos. Aunque se conoce poco sobre la estructura de las corrientes locales, los movimientos oceanográficos tienen gran influencia en la distribución de otras variables marinas como: temperatura, salinidad y concentración de nutrientes (silicatos, fosfatos, nitratos, entre otros; Salas-Pérez y Granados, 2008), las que a su vez regulan la evolución de los sistemas ecológicos marinos y modifican la dinámica poblacional de las comunidades marinas.

### **Fenómeno “EL NIÑO”**

Se ha denominado como fenómeno de “El Niño” al proceso de calentamiento de las aguas superficiales del Océano Pacífico Central y Oriental (Trenberth, 1997).

Calentamiento que irradia hacia las zonas de mayor profundidad, originando una acumulación de aguas cálidas y que incrementa el nivel del mar en el Pacífico Oriental. Cuando estas características se presentan, la CC gira al Oeste y se hace más débil. (Quinn, 1974), asimismo, la CN se ensancha latitudinal y longitudinalmente (Wyrcki, 1973; 1975).

La presencia de estos cambios afectan los volúmenes de producción primaria, que producen, a su vez, alteraciones en las poblaciones de peces (Trigueros, 2002), como el decremento en el reclutamiento a sus poblaciones (Lenarz *et al.*, 1995). Los eventos “El Niño” se han asociado con marcadas alteraciones en los patrones de reproducción, distribución, abundancia y disminución de diversos organismos. Se ha observado que *Sphyrna lewini*, se desplaza a regiones más profundas por el incremento de temperatura en la capa superficial y también se ha visto que los juveniles pueden usar zonas más al norte como áreas de crianza durante este fenómeno (Lea y Rosenblatt, 2000; Shane, 2001). No obstante, cada evento presenta particularidades que modifican su impacto sobre cada ecosistema.



Figura 10. Corrientes oceanográficas del Pacífico mexicano y Golfo de México que pueden contribuir a la estructura genética de *Sphyrna lewini* en esta zona.

## JUSTIFICACIÓN

Las normas actuales de la administración pesquera en nuestro país, ordinariamente carecen de información de carácter genético de las especies bajo explotación. Esto, puede llevar a un conocimiento incompleto para la toma de decisiones sobre el establecimiento de las cuotas de captura adecuadas a los niveles de diversidad genética existentes en las poblaciones explotadas.

Se ha comprobado que los tiburones son vulnerables al proceso de sobre-explotación, debido a las características propias del grupo como baja tasa de crecimiento, de reproducción y a una madurez sexual tardía, aunada a la selectividad ocasionada por lo tamaños de captura cada vez más pequeños, puede desembocar en decrementos poblacionales y, con ello, en colapsos pesqueros.

*S. lewini*, es una de las especies de mayor importancia pesquera dentro del grupo de los elasmobranquios y actualmente es considerada alrededor del mundo como una especie amenazada. Aunado a lo anterior, se carece de estudios sobre la diversidad y la estructura genética de las poblaciones de esta especie en las principales áreas de captura nacional.

Los estudios de genética poblacional permitirán evaluar la diversidad genética y estructura de las poblaciones naturales. Adicionalmente el uso de diferentes marcadores (mtDNA y nuclear), permitirá realizar inferencias sobre los tamaños efectivos poblacionales, así como determinar las probables fuerzas evolutivas y el tiempo aproximado en el que se modificó esa estructura poblacional.

Esto permitirá entender mejor la dinámica de desplazamiento de las poblaciones dentro de su área de distribución, en el Pacífico mexicano y proporcionará mayor información sobre las condiciones actuales e históricas de las poblaciones de esta especie, lo cual que ayudará a tomar correctas decisiones para su manejo y conservación del tiburón martillo en nuestro país.

## PLANTEAMIENTO DE ESTUDIO

La preservación de los recursos genéticos es actualmente un tema de preocupación mundial ya que la economía de muchos países puede verse afectada por una disminución en la explotación de sus recursos. Los procesos de sobreexplotación en pesquerías vulnerables como es el caso de algunas especies de tiburones, pueden resultar en decrementos de los tamaños poblacionales que lleve al colapso de la pesquería.

La pesquería de tiburón en México está enfocada a un número limitado de especies, dentro de las cuales se encuentra el tiburón martillo (*Sphyrna lewini*), la cual representa más del 30% de la captura de tiburones a nivel nacional. Recientemente el estatus de *S. lewini* ha sido modificado y de ser una especie con alto potencial de explotación, ha pasado a ser una especie amenazada (en A2bd+4bd; IUCN, 2010).

Se espera que la evaluación de la diversidad genética y estructura poblacional de esta especie, permita determinar las condiciones actuales de las poblaciones bajo explotación. De esta forma, se podrán definir las unidades independientes de pesca y las unidades evolutivamente significativas, que servirán como referencia para elaborar estrategias de administración adecuadas, para la captura de esta especie en las costas de nuestro país.

Para ello el presente estudio plantea realizar un estudio sobre *S. lewini*, enfocado a responder a las siguientes preguntas: ¿Cuáles son los niveles de diversidad genética de la especie en las cuencas de nuestro país? ¿Existe estructura poblacional en las poblaciones capturadas en el Pacífico mexicano? La posible estructura genética, ¿Está relacionada con procesos de aislamiento por distancia? ¿Cuáles son los tamaños poblacionales de las poblaciones analizadas en el Pacífico mexicano? ¿La demografía histórica de las poblaciones analizadas se ve reflejada en los patrones filogeográficos de la especie?

## HIPÓTESIS

Se presentará una divergencia entre las poblaciones de *Sphyrna lewini* en zonas insulares y de surgencias de la boca del Golfo de California y el Golfo de Tehuantepec, consideradas áreas de alimentación y crianza para esta especie en el Pacífico mexicano. Así mismo se espera observar un patrón filogeográfico en las poblaciones de *S. lewini*, caracterizado por la presencia de dos unidades evolutivamente significativas (ESUs), una ubicada en el Pacífico mexicano y otra en el Golfo de México, debido a las características biológicas de la especie y a las características físicas y geológicas de ambas cuencas oceánicas.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Determinar, evaluar y analizar la diversidad genética, la estructura poblacional y la filogeografía de *Sphyrna lewini* mediante el análisis de marcadores nucleares y mitocondriales en poblaciones representativas de *S. lewini* capturadas en el Pacífico mexicano y en el Golfo de México, para determinar si la presencia de una estructura poblacional se debe a procesos de aislamiento por distancia o a la existencias de hábitats que favorecen la permanencia en zonas de surgencias. Ello permitirá establecer unidades independientes de manejo para su a administración pesquera y conservación.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Estimar y comparar la diversidad genética y estructura poblacional de *S. lewini* en el Pacífico mexicano y Golfo de México, mediante marcadores mitocondriales y nucleares.
- Comparar la diversidad genética y divergencia poblacional estimada en las localidades analizadas, con los datos de reportes previos para la especie (Duncan *et al.*, 2006; Nance *et al.*, 2011).
- Comprobar si existe una relación de aislamiento por distancia en el Pacífico mexicano, de acuerdo con el modelo de Slatkin (Wright, 1943).
- Estimar los parámetros de la demografía histórica de las poblacionales de *S. lewini* en el Pacífico mexicano y estimar los tiempos de divergencia de ambos marcadores, así como los tamaños efectivos poblacionales.
- Determinar si las características biológicas de *S. lewini*, aunadas a las características físicas y geográficas del Pacífico mexicano y Golfo de México, han dado lugar al establecimiento de un patrón filogeográfico de sus poblaciones.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MATERIAL BIOLÓGICO

La obtención de las muestras de *S. lewini* se realizó en campos pesqueros tanto del Pacífico Mexicano como del Golfo de México (Figura 11), de 2001 al 2008. Para tratar de obtener un mayor número de muestras se realizaron colectas en dos o más puntos diferentes del mismo estado en el mismo año de colecta, como en el caso de la población de Sinaloa, localidad compuesta por organismos de Barra de Piaxtla, Mazatlán y Teacapán (Tabla 1). Algunos de los muestreos se realizaron con la ayuda del personal del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR) de La Paz, Baja California Sur; de la Universidad de Baja California; del Centro Regional de Investigaciones Pesqueras (CRIP) de Tabasco; de la Universidad del Mar de Puerto Escondido y del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICMyL), UNAM, así como de pescadores de cada localidad, a quienes se les solicitó que los organismos llegaran completos a la costa para su identificación. La identificación de cada uno de los organismos colectados, se realizó con las claves de Compango (1984), NOAA (2001) y con la guía rápida de SAGARPA (2001).

Cada muestra consistió de una pequeña porción de tejido muscular de aproximadamente 2 cm<sup>3</sup>, extraída principalmente de la parte cefálica o ventral de cada organismo. Las muestras fueron colocadas en tubos de transporte y preservadas con un amortiguador a base de DMSO saturado con NaCl (20% DMSO, 0.25 M EDTA pH 8.0, NaCl, 30 gr/100 ml.). Las muestras colectadas en cada localidad, cuyo número varió entre 9 y 42, fueron posteriormente transportadas al Laboratorio de Genética de Organismos Acuáticos del ICMyL de la UNAM, donde se les asignó una clave de acuerdo a su localidad geográfica de origen, y donde se procesaron. Actualmente estas muestras forman parte de la colección de tejidos del ICMyL.



Figura 11. Ubicación geográfica de las localidades de colecta de las muestras de *S. lewini* en el Pacífico Mexicano y Golfo de México.

Tabla 1. Datos de las muestras colectadas de *S. lewini*, en Pacífico mexicano y Golfo de México.

Región	Estado	Localidad	Clave	N	Año	
Pacífico Mexicano	Baja California	Ensenada	BC	7	2007	
	Baja California Sur	Todos Santos	BCS	18	2001	
	Sinaloa	Mazatlán, Barras de Piaxtla y Teacapán	SIN	28	2002	
	Nayarit	San Blas	NAY	29	2003	
	Michoacán	Caleta de Campo	MICH	17	2006	
	Oaxaca	Puerto Ángel	OAX	9	2007	
	Chiapas	Puerto. Madero	CHIP	12	2003	
	Golfo de México	Campeche	San Pedro	CAM	11	2008
	Tabasco	Frontera	TAB	18	2008	
Total	9	10		149		

## **AISLAMIENTO DE DNA**

El aislamiento de DNA genómico de cada una de las muestras obtenidas en campo, se realizó mediante la técnica de Buffer Chris-Lysis (100 mM Tris, HCL pH 8.5, 5 mM EDTA, 0.2% SDS, 200 mM NaCl) y proteinasa K (Laird *et al.*, 1991; ver apéndice A). Una vez extraído el DNA genómico, se verificó la calidad de DNA, mediante una electroforesis de agarosa al 1% y tinción de bromuro de etidio. Posteriormente se homogenizó la concentración de los extractos de DNA mediante ensayos de amplificación realizados con diferentes diluciones (1:20, 1:50 y 1:100) para determinar la concentración óptima de amplificación de cada las muestras. Se seleccionó la dilución de 1:20 como la mejor para la amplificación de ambos marcadores.

## **REGIÓN CONTROL mtDNA, MARCADOR MITOCONDRIAL**

La técnica de SSCP's es muy eficiente para la detección de polimorfismos en estructuras secundarias de cadena sencilla. Esta técnica emplea fragmentos de DNA de 200 a 400 pares de bases (pb) ya que entre menor longitud, el fragmento presenta mayor sensibilidad en la detección de diferencias nucleotídicas. Sin embargo, se ha sugerido que la técnica es igualmente eficiente en fragmentos de gran tamaño (800-1000 pb); únicamente se requiere de la estandarización en la concentración de acrilamida empleada en los geles, en tiempo de electroforesis y en algunos casos, en modificar el pH del amortiguador para el corrimiento. Por esta razón, se empleó exitosamente un fragmento de mtDNA de la región control, de aproximadamente 1000 pb, para el análisis de SSCP's.

El fragmento de la región control mitocondrial de *S. lewini*, fue amplificado mediante PCR, con iniciadores diseñados para elasmobranquios, ElasmCR15642F (5'-TTGGCTCCCAAAGCCAARATTCTG-3') y ElasmCR16638R (5'-CCCTCGTTTTWGGGTTTTTCGAG-3') (Stoner *et al.*, 2003) (condiciones de PCR, ver apéndice B). Una vez obtenidos los productos de PCR, se comprobó la amplificación mediante una electroforesis de agarosa al 1% y tinción con bromuro de

etidio mezclando 5  $\mu$ L de producto de PCR, con 5  $\mu$ L de buffer de carga (65% sucrosa, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 0.3% w/v Azul de bromofenol). Verificadas las amplificaciones del fragmento, el producto restante de PCR se empleó en la técnica de SSCP's, mezclándolo en proporción 1:1 con buffer de carga y formamida (95% w/v formamida, 10 mM EDTA 0.05% azul de bromofenol).

Posteriormente se desnaturalizaron por 5 min. a 95°C, e inmediatamente después se pasaron, a un recipiente con hielo para generar las estructuras secundarias de DNA de cadena sencilla o SSCP's. Las estructuras secundarias se separaron en geles no desnaturalizantes de acrilamida al 8% a 380 volts, con un tiempo de electroforesis de 24 horas a 4°C (ver detalles apéndice C). En cada corrimiento electroforético, se incluyeron carriles con marcadores de 100 pb, así como una muestra no desnaturalizada, para corroborar cada uno de los haplotipos.

Realizada la electroforesis, los geles fueron teñidos con la tinción de nitrato de plata, empleando el método descrito por Creste *et al.*, (2001) con algunas modificaciones (ver apéndice D). Posteriormente cada gel se fotografió con una cámara digital (8 mpx). A partir de las fotografías digitales, se identificaron los patrones electroforéticos de cada uno de los fragmentos amplificados tomando como referencia los marcadores de peso molecular y la muestra no desnaturalizante. Una vez identificados los polimorfismos del total de muestras en cada población, se mandaron secuenciar dos muestras de cada uno de los electromorfos identificados, en ambos sentidos. Los polimorfismos detectados se secuenciaron en un secuenciador automático (ABI3730 x1 Applied Biosystems) por la empresa Macrogen Inc. en Seúl, Corea.

Se corroboró el origen de cada una de las secuencias de cada haplotipo mediante un Blast, realizado en la página Web del Centro Internacional de Información Biotecnológica (NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), posteriormente se corroboró manualmente cada una de las secuencias con su respectivo electroferograma. Una vez identificados los haplotipos, se asignó la secuencia correspondiente a cada muestra de acuerdo a la variante detectada mediante SSCP's. Posteriormente se alineó el total de secuencias de las muestras mediante el programa de Bio-Edit versión 7.0.0 (Hall, 2004) con la aplicación de ClustalW. Obtenido el alineamiento, se verificó

manualmente para mejorarlo y se realizaron las bases de datos correspondientes a cada uno de los programas empleados para los análisis.

## **MICROSATÉLITES, MARCADOR NUCLEAR**

Se probaron un total de 13 pares de iniciadores para la obtención de microsatélites (Tabla 3), citados por Heist y Gold (1999) y por Keeney *et al.*, (2005), los cuales fueron diseñados para otras especies de tiburones de la misma familia que *S. lewini*.

Cada uno de los microsatélites fue ensayado de acuerdo con las condiciones determinadas en la literatura (Heist y Gold, 1999; Keeney y Heist, 2003). Sin embargo, algunos microsatélites no fueron amplificados exitosamente bajo las condiciones citadas por lo que se realizaron gradientes de temperatura (45° a 60°C), concentraciones de cloruro de magnesio (1.5 a 3.5 mM) y concentración de iniciadores (20 a 25 pM), para lograr la amplificación de cada uno de los microsatélites en *S. lewini* (Tabla 2). Aun después de las modificaciones mencionadas, sólo se logró la amplificación de 8 microsatélites (para conocer las condiciones de PCR, ver el apéndice B).

Los 8 microsatélites se amplificaron y se corroboró el tamaño del fragmento en pb mediante una electroforesis de agarosa al 2% con tinción de bromuro de etidio, mezclando en proporción 1:1 el producto de PCR con de buffer de carga con formamida (ver en SSCP's). Los microsatélites se separaron en un gel desnaturizante de acrilamida al 6% (apéndice C) con TBE 1X como amortiguador de corrimiento (45 mM Tris-Base, 45 mM Ácido Bórico, 1 mM EDTA pH 8.0). Las condiciones de corrimiento fueron de una hora 30 minutos a 1000 V. En cada electroforesis se incluyeron carriles con marcadores de peso molecular de 10, 25 y 100 pb, así como una muestra de amplificación e identificación clara de alelos (muestra patrón), para corroborar la consistencia de cada microsatélite. La tinción de los geles se realizó con nitrato de plata (apéndice D) y posteriormente se fotografiaron para la obtención de datos.

La lectura de los geles, se realizó de forma manual y de forma rigurosa tomando como referencia el alelo más común en cada microsatélite, la muestra patrón y los marcadores en pb, para disminuir la probabilidad de error en la determinación del tamaño en cada fragmento.

Tabla 2. Pares de iniciadores para microsatélites, ensayados en *S. lewini*. En negritas se encuentran los que fueron amplificados con éxito, y en recuadro oscuro los que fueron usados para análisis. ? - temperatura de alineamiento que no se logró identificar para una buena amplificación del microsatélite.

Iniciadores	Secuencia 5'-3'	Motivo de Rep.	Intervalo (pb)	Cita	Temp. Optima
Cli-02	CTTTGAGGAAGTTGGTACTGATC GCCACTCTTGTCTGAAATTTTCCG	(GA) 10	187-195	Keeney y Heist (2003)	?
Cli-06	ACCAGCAGGCATCTCAAACA CTTTAGCTCCCGCATCAGAG	(CA)15	151-153	<b>Heist y Gold (1999)</b>	?
Cli-07	TAGCACACAGCCCCATCACT TGTGGTGTGAGCCTCATT	(GT) 20	188-258	Keeney y Heist (2003)	?
<b>Cli-12</b>	<b>TCCCAGTCACATTTACACATGC GGAAGACCATTGAACCCAATC</b>	<b>(GT) 9</b>	<b>184-194</b>	<b>Keeney y Heist (2003)</b>	<b>58° C</b>
Cli-13	TCACCTCTGTCCCCTGTAAG GCCTGCACACAAAAGAAAT	(GT) 19	264-318	Keeney y Heist (2003)	49° C
Cli-38	TCCAAGCTGGGAATTGAAC CTGCCGAAAGAGTTGAAGG	(GA)15	299-301	Heist y Gold (1999)	56° C
Cli-39	TACCTGCCACAAAACCTGAC GCCTTTACAGATGCCAGTGA	(GACA)3	277-283	Heist y Gold (1999)	56° C
Cli-100	TAATCGTGCTGGGTGCGGTTCC CAGATAACACATACTTGACGGAGC	(TG) 4 (GT) 10	210-214	Keeney y Heist (2003)	58° C
Cli-103	GCTTCATTCCATGAGAG TTTCTCTGTCCTGGTGTTC	(GA)5-14-7	118-124	Keeney y Heist (2003)	?
<b>Cli-106</b>	<b>GATTCTACAACCGCAACATTCG GCTCCCCTAACTATTCCACGC</b>	<b>(GA) 11</b>	<b>179</b>	<b>Keeney y Heist (2003)</b>	<b>47° C</b>
Cli-107	GGATTCAACACAGGAAC CTCATTCTTAGTTGCTCTCG	(GT)14	105-113	Keeney y Heist (2003)	?
Cli- 112	AGAGAGGGAGGAAGGTGGGC TCACGGTTTCTTTCAACTCCC	(GT)4 (GT)14	81-87	Keeney y Heist (2003)	58° C
Cli-119	GACCTGAAACAGCAATGGG TGTTCTTGAGTCGGTCGG	(GT)6-5-10-5-4	189-203	Keeney y Heist (2003)	58° C

## ANÁLISIS DE DATOS

### Análisis de Región Control mtDNA (SSCP's)

Mediante los datos de la región control mtDNA, se estimaron los índices y estimadores de la diversidad genética (diversidad genética  $H$ , diversidad haplotípica  $h$

y nucleotídica  $\pi_n$  y número de sitios polimórficos  $S$ , número promedio de diferencias entre pares de haplotipos  $K$  y composición nucleotídica de cada haplotipo), mediante los programas: TFGA 1.3 (Miller, 1999) y Arlequín 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005).

Las estimaciones de diversidad nucleotídica se obtuvieron según el parámetro mutacional  $\theta = 2N_e\mu$ , que es la tasa de mutación escalada según el fragmento, donde:  $N$  es el tamaño poblacional y  $\mu$  es la tasa de mutación del fragmento. Los estimadores theta de diversidad ( $\theta_S$ ,  $\theta_K$ ,  $\theta_\pi$ ) fueron obtenidos bajo la hipótesis de equilibrio neutral en las tres posibles relaciones que puede tener el parámetro  $\theta$ . Donde:  $\theta_S$  (Watterson, 1975) se basa en la relación entre la cantidad de sitios segregantes de cada muestra y el tamaño de la muestra ( $n$ );  $\theta_K$  (Ewens, 1972) se basa en la relación entre el número de alelos esperado y el tamaño de muestra, mientras que  $\theta_\pi$  se basa en el número promedio de diferencias esperadas entre pares de secuencias (Tajima, 1983).

Los índices de diversidad  $\theta_S$  y  $\theta_\pi = \theta_m$ , fueron usados para conocer su nivel de correlación, mediante el uso del programa STATISTICA 6.0 (StatSoft.Inc, 2001). Estos índices pueden reflejar algún cambio relacionado al equilibrio de sitios infinitos en las poblaciones, referidos por cambios en el número de sitios segregantes o al determinado para pares de localidades, lo que permitirá detectar posibles cuellos de botella o procesos de un crecimiento poblacional (Watterson, 1975; Chakraborty y Weiss, 1991).

También se realizó una prueba exacta de Raymond y Rousset (1995) para corroborar la homogeneidad de las frecuencias, mediante tablas de contingencia generando valores de probabilidad obtenidos a partir de una  $\chi^2$ . Se obtuvieron los valores de error estándar mediante remuestreos de Montecarlo, usando 10 ciclos con 10,000 pasos reiterativos y 20,000 permutaciones en cada ciclo.

Se realizaron diferentes pruebas de neutralidad bajo diferentes supuestos que evalúan si el marcador se ajusta a un modelo Wright-Fisher. La prueba de neutralidad propuesta por Tajima (1996) evalúa la neutralidad bajo la relación entre número de sitios segregantes y el número promedio de diferencias entre pares de muestras. Las diferencias entre ambas estimaciones pueden resultar de la selección natural, de fluctuaciones poblacionales o de tasas de mutación distintas en el fragmento analizado.

La prueba Ewens-Watterson, basada en la teoría de Ewens (1972) del muestreo de una población en equilibrio, evalúa si la probabilidad de obtener dos haplotipos idénticos en una muestra aleatoria es menor o igual al de la muestra observada. La prueba de neutralidad de Chakraborty (1990) compara estadísticamente la cantidad de haplotipos esperados en una muestra neutra y homogénea con el número de haplotipos observados, obteniendo un estimador  $F$ .

Por último se realizó la prueba de neutralidad de Fu (1997) que estima la función de densidad de la probabilidad de obtener  $k$  alelos dado un valor del parámetro  $\theta$  mediante simulaciones, el valor de  $k$  se mantiene dentro de un intervalo si se encuentra bajo neutralidad. Sin embargo, puede modificarse durante procesos de expansión poblacional.

La estructura genética se evaluó mediante la obtención del índice de divergencia poblacional  $\Phi_{ST}$  equivalente al estadístico  $F_{ST}$  de Wright (1965) para cada una de las localidades. Este mismo índice se obtuvo entre pares de localidades. La estructura en la variación genética entre las regiones oceánicas y entre las localidades del norte centro y sur del Pacífico mexicano, se corroboró mediante un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA), usando el programa Arlequín. A los análisis estadísticos que involucran comparaciones múltiples se les aplicó la corrección de Bonferroni bajo el nivel crítico de  $\alpha$  (Rice, 1989).

Las pruebas de AMOVA se realizaron para corroborar la diferencia presente entre regiones oceánicas (Pacífico mexicano y Golfo de México), y entre poblaciones únicamente del Pacífico mexicano. Para esta última jerarquización se, determinando tres grupos con base en la ubicación de las posibles zonas identificadas a lo largo del Pacífico mexicano, como zonas de alumbramiento, crianza y alimentación para *S. lewini*, por la presencia de hembras grávidas, neonatos y juveniles. (Saucedo *et al.*, 1982; Compagno *et al.*, 1995; Salomón-Aguilar *et al.*, 2009; Anislado, 2008; Alejo-Plata *et al.*, 2006 a; 2006 b).

Los grupos se conformaron de las siguientes localidades el denominado zona norte (Baja California y Baja California Sur, en adelante BC y BCS), zona centro (Sinaloa, Nayarit y Michoacán, en adelante SIN, NAY y MICH) y zona sur (Oaxaca y Chiapas, en adelante OAX, CHIP).

Se realizó un análisis de componentes principales (PCA), con el programa PCAGEN 1.2.2 (J. Goudet, Instituto of Ecology, Université de Lausanne, CH-1015, Lausanne, Switzerland, [www2.unil.ch/popgen/softwares/pcagen.htm](http://www2.unil.ch/popgen/softwares/pcagen.htm)), para conocer que poblaciones son más similares o diferentes entre ellas a partir de las frecuencias alélicas del total de locus analizados. El porcentaje de atracción de cada componente principal en el eje y su probabilidad es evaluó mediante 10,000 aleatorizaciones de los genotipos. Esta prueba se realizó para el total de las localidades y para las localidades del Pacífico mexicano.

La construcción de dendrogramas bajo algoritmos de UPGMA, se realizó con los los valores de distancia genética de Reynolds *et al.*, (1983) y Nei (1978), entre pares de localidades a partir de las frecuencias alélicas, que fueron obtenidos mediante el programa TFPGA, para conocer el agrupamiento de las localidades en base a sus características genéticas. La reconstrucción se realizó con 10,000 permutaciones y 10,000 réplicas de bootstrap, mediante los programa TFPGA y MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2004).

Se estimó el tamaño efectivo históricos para cada localidad a través de la estimación de theta ( $\Theta$ ) mediante el programa MIGRATE 3.1.2 (Beerli y Felsenstein, 2001; Beerli, 2002), los valores de  $\Theta$  fueron estimados mediante inferencia Bayesiana y se consideró el modelo de evolución de secuencias. También se obtuvo el nivel de flujo genético histórico entre las localidades mediante la estimación de  $M$  la cual representa una mediada de  $a$  la inmigración sobre la mutación en originar nuevas variantes, lo que equivale a  $m/\mu$  donde  $m$  es la tasa de migración y  $\mu$  es la tasa de mutación por generación. Las estimaciones se realizaron con la aplicación del método de Monte Carlo con Cadenas de Markov (MCMC), basándose en un modelo de expansión coalescente. Se realizaron 5 corrimientos para verificar la consistencia de los resultados, cada uno se realizó con 100,000 genealogías muestreadas, tres replicas por cadena y 100,00 genealogías de *burn in*, los datos presentados son el promedio de estos cinco datos.

Se evaluó el modelo de aislamiento por distancia (Slatkin, 1993), mediante una correlación no paramétrica entre matrices de distancias geográficas con los valores de diversidad estandarizados  $\Phi_{ST}$ , para las localidades del Pacífico mexicano, ya que no

es posible considerar muestras de ambas cuencas oceánicas, por la barrera continental. La evaluación se realizó mediante una prueba de Mantel (Hellberg, 1994), estimadas mediante la distancia entre localidades según la línea de costa entre localidades y empleando 10,000 permutaciones.

Se estimaron los parámetros de demografía histórica  $\theta$  y  $\tau$  y los parámetros de expansión espacial, mediante Arlequin. Las estimaciones de  $\theta$  ( $\theta^0$  y  $\theta^1$ ) que son el producto de  $2\mu N^0$  y  $2\mu N^1$  (donde  $\mu$  es igual a la tasa de mutación y  $N$  es el tamaño efectivo poblacional en el tiempo 0 y 1). Tau ( $\tau$ ) es la medida relativa del tiempo desde la expansión poblacional, pero también ser usado para estimar el tiempo actual ( $T$ ) desde la expansión poblacional mediante  $T = \tau/2\mu$  (donde  $\mu$  es igual a la tasa de mutación, Gaggiotti y Excoffier, 2000).

Gracias a que las características de mtDNA permiten obtener mayor información histórica sobre las poblaciones por el tipo de herencia que permite realizar reconstrucciones filogenéticas a diferentes niveles jerárquicos de las poblaciones, se calculó la distribución del número de diferencias entre pares de secuencias, conocidos como distribución de diferencias nucleotídicas o comparaciones pareadas (Rogers y Harpending, 1992). El ajuste de este análisis se realizó bajo un modelo de expansión y se puso a prueba a través del índice de “*raggedness*” de Harpending (*H<sub>r</sub>*) y la desviación de la suma los cuadrados (SSD), para cada localidad, y por medio del programa DNAsp (Rozas *et al.*, 2003), para analizar el posible rastro de expansión poblacional de *S. lewini* y determinar la presencia de cuellos de botella, seguidos de eventos de expansión demográfica o espaciales originados por diversas fuerzas evolutivas. Con el fin de explorar las tendencias demográficas a través del tiempo, se obtuvieron los *skyline plots* mediante la aproximación Bayesiana, implementada en el programa Beast v1.7.1 bajo el modelo de coalescencia con 30,000 réplicas de *burn in* seguido de 300,000 MCMC. (Drummond y Rambaut, 2007).

### **Análisis de microsatélites**

La probabilidad de la presencia de alelos nulos, la dominancia de alelos pequeños debido a errores de amplificación por alelos grandes y el error ocasionado

por “stuttering” dentro de los datos de microsatélites, se evaluó mediante el programa MICRO-CHEKER 2.2.1 (Van Oosterhout *et al.*, 2004), empleando 10,000 aleatorizaciones. Se probó si existían desviaciones genotípicas fuera de la distribución de Hardy-Weinberg (H-W) en cada uno de los locus y en cada muestra, con base en los valores de probabilidad al ajuste de las frecuencias genotípicas observadas (Guo y Thompson, 1992), utilizando 10,000 cadenas y 5,000 interacciones.

Debido a que las poblaciones variaron en el número de muestra, se realizó un análisis de rarefacción para estimar el número de alelos esperados ( $Nr$ ) cuando un gen  $n$  es muestreado en una población, utilizando del programa RAREFAC (Petit *et al.*, 1998; Mousadik y Petit, 1996). El número de alelos obtenido mediante rarefacción se contrastó con el observado ( $N$ ) mediante una prueba de  $t$  pareada (Freund y Simon, 1992), considerando los loci por separado y en conjunto.

Se estimó la diversidad genética global por locus ( $H_T$ ) y los valores de riqueza alélica ( $R_S$ ) por locus y por muestra, para permitir la comparación del número de alelos, independiente del tamaño de la muestra de los datos de microsatélites, mediante el programa FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2001). Y mediante el programa GENEPOP 4.0 (Rousset, 2008), se realizó una prueba exacta de probabilidad de desequilibrio de ligamiento de los *loci*, para conocer la independencia de cada uno.

La divergencia entre poblaciones se evaluó mediante los estadísticos  $F$  de Wright  $F_{ST}$ ,  $F_{IS}$  y  $F_{IT}$  y  $R_{ST}$  de Slatkin (1995) para cada locus, esta última estimación considera las diferencias en el tamaño de alelos, por lo tanto se puede explicar la similitud entre dos muestras a través de posibles homoplasias (Balloux y Lugon-Moulin, 2002).

La divergencia poblacional entre cuencas oceánicas y entre localidades del Pacífico mexicano, se corroboró realizando dos AMOVA's, uno entre grupos definiendo por cuencas oceánicas, y un último AMOVA para las localidades del norte, centro y sur del Pacífico mexicano, como se estableció la asignación de las localidades en el análisis de mtDNA. Debido a que se observó una diferencia entre las muestras de la región norte, se usó también jerarquización diferente para el análisis de AMOVA, donde el subgrupo norte fue conformado solo por BC, mientras que el grupo central estuvo formado por BCS, SIN, NAY y MICH, y el grupo sur por OAX y CHIP.

Se utilizó el programa STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2003), para probar la estructura poblacional y establecer la asignación de cada individuo a un deme genético, para el total de las localidades analizadas, y para las localidades pertenecientes al Pacífico mexicano, para ello se usó el modelo de frecuencias alélicas correlacionadas y se estimó la existencia de 1 a 10 poblaciones ( $K$ ) evaluadas a través de 30 interacciones independientes, cada una con 50,000 réplicas de *burn in* seguido de 50,000 MCMC. Para determinar el valor real de  $K$ , se empleó la prueba estadística propuesta por Evanno *et al.* (2005).

Se realizó una correlación, entre valores de  $\Phi_{ST}$  de datos de mtDNA y  $F_{ST}$  microsatélites STATISTICA, para conocer si las diferencias obtenidas son causadas por un desplazamiento diferencial de hembras, y conocer las relaciones de flujo genético entre las poblaciones, ya que si se observa una mayor cantidad de divergencia con microsatélites y menor con datos de mtDNA, podría indicar mayor flujo de hembras. También se aplicó la corrección de Bonferroni a los estadísticos de comparaciones múltiples.

El análisis de componentes principales se realizó bajo las mismas condiciones que las empleadas en datos mtDNA. Esta prueba se realizó para el total de las localidades y para las localidades del Pacífico mexicano. El poder estadístico para poner a prueba la hipótesis nula de homogeneidad genética con diferentes combinaciones de tamaños de muestra, de número de *loci*, de número de alelos y de frecuencias alélicas, se analizó mediante la distribución de la suma de diferencias cuadradas (SSD, por sus siglas en inglés) usando el programa POWSIM 4.0 (Ryman y Palm, 2006).

Así como con los datos de mtDNA, también, se probó el ajuste al modelo de aislamiento por distancias para los datos de microsatélites con una prueba de Mantel, y se estimaron los parámetros de demografía histórica  $\theta$  y  $\tau$  y los parámetros de expansión espacial.

De la misma forma se estimó el tamaño efectivo poblacional histórico a través del conjunto de datos de microsatélites, mediante el programa MIGRATE 3.1.2. Los valores se estimaron también mediante inferencia Bayesiana, considerando el modelo

aleatorio Browniano con una tasa mutacional constante para microsatélites y con las mismas condiciones de corrimiento que se usaron para mtDNA.

### **Análisis filogeográfico.**

Se realizó una reconstrucción genealógica de los haplotipos de *S. lewini*, empleando el modelo evolutivo HKY85 + G = 0.395, obtenido por MODELTEST (Posada, 1998) y posteriormente el modelo seleccionado se empleó en el programa PAUP (Swofford, 1991), para la construcción de la genealogía de los haplotipos uso el método de Máxima Verosimilitud (ML). Se empleó la secuencias de mtDNA *Chiloscyllium plagiosum* como grupo externo, ya que pertenece al mismo Orden, pero diferente suborden, que *S. lewini*.

Asimismo, para comparar resultados del análisis de mtDNA con estudios previos, se realizó una genealogía mediante el método de distancias, de los haplotipos analizados y tres secuencias de los haplotipos correspondientes al estudio de Duncan *et al.* (2006), empleando a *C. plagiosum* como grupo externo, usando el programa MEGA.

También se realizó un análisis de clados anidados donde se observó la distribución de los haplotipos, mediante una red mínima con el programa TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000), que utiliza el modelo estadístico de parsimonia para hacer un algoritmo que comienza estimando el número máximo de diferencias entre haplotipos, como resultado de sustituciones simples con un 95% de confianza. Debido a que la red a un nivel del 95% formó dos redes inconexas, se modificó el límite de conexiones de pasos para obtener una sola red.

## RESULTADOS

### DIVERSIDAD GENÉTICA

#### Región control mtDNA

El fragmento analizado de la región control presentó un total de cinco haplotipos en las 149 muestras analizadas. La diversidad haplotípica esperada fue de  $h = 0.494$ . Los valores de diversidad haplotípicas más altos se observaron en las localidades de la región central del Pacífico mexicano (SIN, NAY y MICH), mientras que no se observó diversidad en el resto de las localidades tanto del Pacífico mexicano como del Golfo de México. El haplotipo “E” único para la región del Golfo de México se detectó también en la localidad SIN en el Pacífico (Tabla 3).

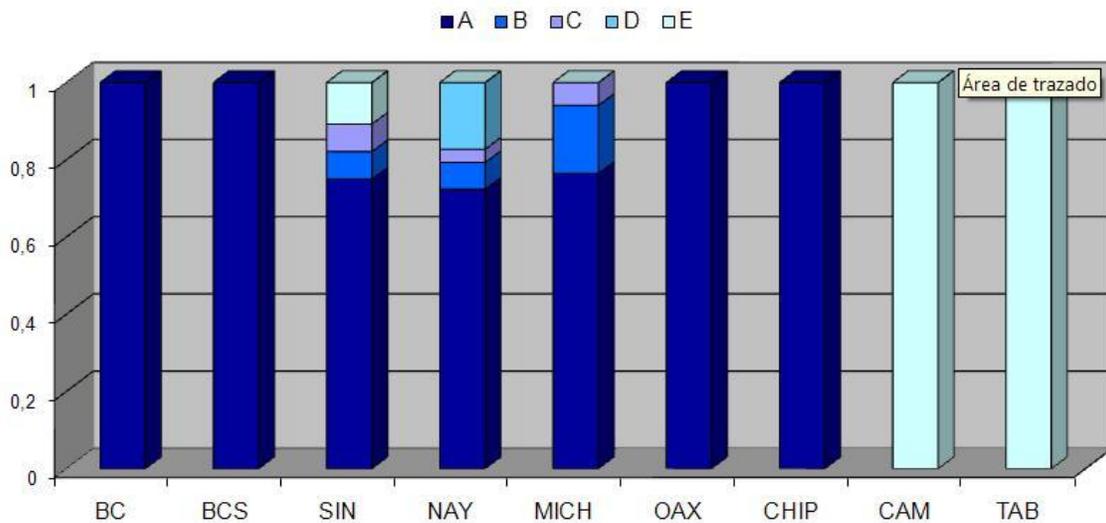


Figura 12. Frecuencias haplotípicas de los fragmentos de región control de mtDNA de *S. lewini*, observados en cada localidad analizada.

Las secuencias de cada haplotipo consistieron de 714 pb, y tuvieron una composición nucleotídica de C = 22.89%, T = 33.92%, A = 31.20% y G = 11.99%. Presentaron 31 sitios polimórficos, con 15 transiciones, 15 transversiones y un indel. El valor de diversidad nucleotídica fue de  $\pi = 0.011$ ; la diversidad theta de  $\theta = 0.007$  y el

promedio de diferencias nucleotídicas entre haplotipos fue de  $k = 8.015$ . De manera general los valores más altos de diversidad nucleotídica se presentaron en la población de SIN, mientras que los valores más bajos fueron para la localidad de MICH (Figura 12 y Tabla 3).

Tabla 3. Estadísticos de diversidad genética del fragmento de la región control de mtDNA analizado en *S. lewini*. Tamaño de muestra ( $n$ ), diversidad genética ( $H$ ), diversidad haplotípica ( $h$ ), diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y diversidad molecular de parámetro  $\theta$  ( $\theta_{Hom}$ ,  $\theta_K$ ,  $\theta_S$ ,  $\theta\pi$ ).

Región	Clave	Haplotipos (frecuencia)	$n$	$H$	$h$	$\pi$	$\theta_{Hom}$	$\theta_K$	$\theta_S$	$\theta\pi$
Pacífico Mexicano	BC	A (1.0)	7	-	1.0	0.0	-	-	-	-
	BCS	A (1.0)	18	-	1.0	0.0	-	-	-	-
	SIN	A (0.75)	28	0.431	0.415	0.007	0.564	1.031	7.452	5.687
		B (0.071)								
		C (0.071)								
		E (0.107)								
	NAY	A (0.724)	29	0.455	0.440	0.002	0.623	1.016	2.546	2.059
		B (0.069)								
		C (0.034)								
		D (0.172)								
	MICH	A (0.764)	17	0.404	0.380	0.002	0.505	0.774	2.662	2.088
		B (0.176)								
C (0.058)										
OAX	A (1.0)	9	-	1.0	0.0	-	-	-	-	
CHIP	A (1.0)	12	-	1.0	0.0	-	-	-	-	
Golfo de México	CAM	E (1.0)	11	-	1.0	0.0	-	-	-	-
	TAB	E (1.0)	18	-	1.0	0.0	-	-	-	-
<b>Total</b>	9 Sitios	5 Haplotipos	149							

Las pruebas de neutralidad se realizaron únicamente para las localidades con más de un haplotipo. Se obtuvieron valores de probabilidad no significativos en todas las pruebas de neutralidad realizadas (Tajima, 1996; Ewens- Watterson, 1972; Chakraborty, 1990; Fu, 1997), lo que indica que las secuencias analizadas de la región control de mtDNA se ajustan a un modelo Wright-Fisher (Tabla 4).

Tabla 4. Pruebas de neutralidad de las localidades con variación genética. Prueba de Tajima ( $D$ ), prueba de Ewens y Watterson ( $E-W$ ), prueba de Chakraborty ( $Ch$ ) y prueba de Fu ( $F_S$ ). Valores de probabilidad ( $P$ ).

<b>Región</b>	<b>Clave</b>	<b><math>D</math> (<math>P</math>)</b>	<b><math>E-W</math></b>	<b><math>Ch</math></b>	<b><math>F_S</math> (<math>P</math>)</b>
			<b>Obs. - Esp. (<math>P</math>)</b>	<b>Obs. - Esp. (<math>P</math>)</b>	
	SIN	-0.961 (0.17)	0.584 - 0.463 (0.797)	4 - 2.829 (0.173)	7.91 (0.99)
<b>Pacífico Mexicano</b>	NAY	-0.61 (0.288)	0.56 - 0.474 (0.764)	4 - 3.012 (0.196)	2.495 (0.894)
	MICH	-0.777 (0.249)	0.619 - 0.548 (0.742)	3 - 2.411 (0.268)	3.073 (0.938)

La correlación entre las estimaciones de diversidad genética  $\theta_S$  y  $\theta_\pi = \theta_m$ , mostró un valor de  $r = 0.999$ , sugiriendo un equilibrio poblacional de todas las poblaciones que presentaron un nivel de diversidad diferente de cero (Figura 13).

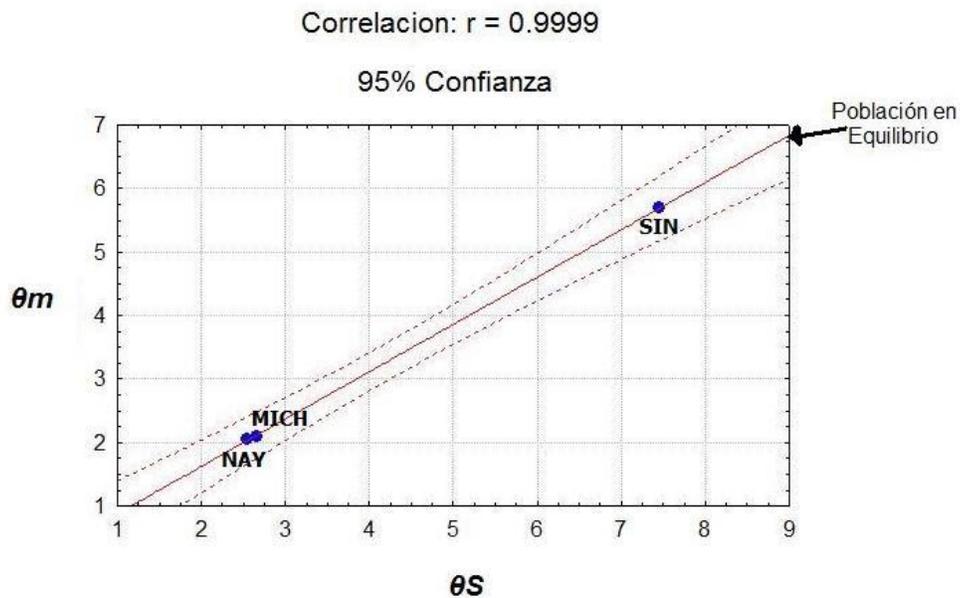


Figura 13. Gráfica de correlación entre valores de diversidad  $\theta_S$  y  $\theta_\pi = \theta_m$ , para datos de mtDNA

## Microsatélites

Se logró amplificar un total de ocho *loci* de microsatélites, el máximo número de alelos por *loci* observados fue de 11 y 17 alelos en los *loci* Cli-12 y Cli-112 respectivamente. El resto de los *loci* presentaron entre dos y nueve alelos por *loci* (Tabla 5). Los datos anteriores coinciden con algunos datos reportados sobre estos *loci* en otras especies de tiburones (Keeney y Hesit, 2003). El número máximo de alelos amplificados se observó en las muestras de BCS y SIN con 12 alelos correspondientes al locus Cli-12 y para la localidad de CHIP con 10 alelos para el mismo locus, mientras que el menor número de alelos observados se presentó en el locus Cli-39, presentándose como monomórfico en siete de las nueve localidades analizadas.

Las pruebas realizadas con MICRO-CHEKER mostraron que no existe evidencia de errores ocasionados por “stuttering”, ni dominancia de alelos pequeños. Sin embargo, al momento de realizar los primeros análisis se observó que los *loci* Cli-38 y Cli-39 mostraron ser monomórficos en el 90% de las localidades analizadas, y de igual forma, el locus 100 presentó un gran contenido de alelos nulos y de desequilibrio por ligamiento en el 80% de las localidades analizadas, por tal motivo, se decidió retirar estos tres *loci* de los análisis.

Una vez retirados los *loci* anteriores se observó que las muestras con el mayor número de alelos encontrados en los cinco *loci* resueltos fueron las de SIN y MICH, mientras que el menor número se observó en las localidades del Golfo de México, (Campeche y Tabasco, en adelante CAM y TAB). El menor número de alelos detectados en las localidades del Pacífico se encontró en BC y OAX (Tabla 5).

Tabla 5. Número de alelos observados de los ocho *loci* amplificados para cada población. Las cantidades totales corresponden al número total de alelos empleados en los análisis para cada localidad (en negritas los *loci* y alelos considerados para el análisis de microsatélites).

Locus	Alelos observados									Alelos/locus
	BC	BCS	SIN	NAY	MICH	OAX	CHIP	CAM	TAB	
<b>Cli-12</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>12</b>	<b>9</b>	<b>8</b>	<b>3</b>	<b>10</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>17</b>
<b>Cli-13</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>6</b>
Cli-38	1	2	2	3	1	2	2	1	1	3
Cli-39	1	2	1	1	1	1	2	1	1	2
Cli-100	7	8	8	9	9	5	6	5	3	9
<b>Cli-106</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>5</b>
<b>Cli-112</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>11</b>
<b>Cli-119</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>8</b>
<b>Total/muestra</b>	<b>33</b>	<b>39</b>	<b>46</b>	<b>30</b>	<b>35</b>	<b>23</b>	<b>33</b>	<b>21</b>	<b>23</b>	<b>283 \ 61</b>

Los análisis de diversidad de los cinco *loci* seleccionados mostraron que el locus Cli-13 fue el único que resultó monomórfico para las muestras SIN, NAY y CHIP. Las frecuencias genotípicas fueron cercanas a la proporción esperada de H-W en 33 de las 45 pruebas que conformaron el análisis, mientras que las 12 restantes presentaron diferencias por la posible presencia de alelos nulos en algunos de los *loci* analizados como BC en el Cli-112, BCS en el Cli-13, Cli-106 y Cli-112, SIN en el Cli-112, NAY en el Cli-12, CHIP en el Cli-106, CAM en el Cli-12 y Cli-106) y TAB en el Cli-12, Cli-13 y Cli-106. Las muestras de MICH y OAX no mostraron la presencia de dichos alelos. Las muestras BCS y TAB presentaron el mayor número de *loci* con déficit de heterocigos y, las muestras de BCS y NAY fueron las únicas que presentaron exceso de heterocigos en el locus Cli-119. La única muestra con posible desequilibrio por ligamiento fue BC, en los *loci* Cli-13 y Cli-112.

El intervalo de riqueza alélica media global para el total de *loci* analizados fue de 2.648 (NAY) a 4.41 (BC) respectivamente. El valor de diversidad promedio total fue de  $He = 0.525$  y la heterocigos promedio para los *loci* varió de 0.3147 (locus Cli-13) a 0.7665 (locus Cli-12) y la diversidad genética promedio estimada para las muestras

sobre todos los *loci* se observó entre un intervalo de 0.366 (NAY) a 0.649 (BC) (Tabla 6). Los valores de diversidad genética se observaron entre 0.372 a 0.692 en las mismas localidades respectivamente. Los valores de diversidad nucleotídica, presentaron un intervalo entre los 112.56 a 882.02 con los valores más bajos en CAM y los más altos en la población de NAY (Tabla 7).

Tabla 6. Resumen estadístico de los análisis de diversidad y prueba de H-W para cinco *loci* de microsatélites en *S. lewini*, en nueve muestras analizadas.

Locus / Localidad		Cli-12 (17)	Cli-13 (6)	Cli-106 (5)	Cli-112 (11)	Cli-119 (8)	Total
<b>BC</b> <b>(10)</b>	<i>Ho</i>	1.0	0.600	0.6	0.1	0.625	0.69
	<i>He</i>	0.876	0.420	0.625	0.645	0.679	0.649
	<i>P<sub>H-W</sub></i>	1.0	1.0	0.253	<b>0.002</b>	0.017	
	<i>Rs</i>	8.35	2.0	3.90	4.32	3.98	4.41
	<i>a</i>	9	12	4	5	4	
<b>BCS</b> <b>(20)</b>	<i>Ho</i>	1.0	0.0	0.0	0.4	0.888	0.457
	<i>He</i>	0.851	0.420	0.218	0.737	0.566	0.558
	<i>P<sub>H-W</sub></i>	1.0	<b>0.0</b>	<b>0.003</b>	<b>0.0</b>	0.999	
	<i>Rs</i>	7.54	1.99	1.91	5.19	3.02	3.93
	<i>a</i>	12	2	2	7	4	
<b>SIN</b> <b>(42)</b>	<i>Ho</i>	0.731	-	0.394	0.405	0.875	0.481
	<i>He</i>	0.793	-	0.524	0.444	0.586	0.469
	<i>P<sub>H-W</sub></i>	<b>0.0</b>	-	0.007	<b>0.0</b>	0.883	
	<i>Rs</i>	6.45	1.0	3.21	3.57	3.21	3.488
	<i>a</i>	12	1	4	8	6	
<b>NAY</b> <b>(30)</b>	<i>Ho</i>	0.4	-	0.033	0.566	0.766	0.353
	<i>He</i>	0.803	-	0.095	0.446	0.486	0.366
	<i>P<sub>H-W</sub></i>	<b>0.0</b>	-	0.051	1.0	1.0	
	<i>Rs</i>	5.87	1.0	1.55	2.82	2.0	2.648
	<i>a</i>	9	1	2	3	2	
<b>MICH</b> <b>(20)</b>	<i>Ho</i>	1.0	0.647	0.5	0.75	0.764	0.732
	<i>He</i>	0.863	0.479	0.523	0.53	0.648	0.608
	<i>P<sub>H-W</sub></i>	1.0	1.0	0.294	1.0	0.015	
	<i>Rs</i>	7.04	2.80	2.92	3.28	3.88	3.984
	<i>a</i>	8	3	3	5	5	
<b>OAX</b> <b>(9)</b>	<i>Ho</i>	0.875	1.0	0.75	0.50	0.666	0.758
	<i>He</i>	0.632	0.5	0.468	0.60	0.666	0.573
	<i>P<sub>H-W</sub></i>	0.844	1.0	1.0	0.060	0.095	
	<i>Rs</i>	3.0	2.0	2.0	3.86	3.92	2.956
	<i>a</i>	3	2	2	4	4	

Continuación...

Locus / Localidad		Cli-12 (17)	Cli-13 (6)	Cli-106 (5)	Cli-112 (11)	Cli-119 (8)	Total
<b>CHIP (16)</b>	<i>Ho</i>	0.866	-	0.153	0.625	0.933	0.515
	<i>He</i>	0.866	-	0.378	0.503	0.611	0.471
	<i>P<sub>H-W</sub></i>	0.503	-	0.014	0.933	0.998	
	<i>Rs</i>	7.50	1.0	2.76	3.30	3.32	3.576
	<i>a</i>	10	1	3	5	4	
<b>CAM (11)</b>	<i>Ho</i>	0.0	0.500	0.125	0.818	0.727	0.434
	<i>He</i>	0.545	0.505	0.554	0.557	0.495	0.531
	<i>P<sub>H-W</sub></i>	<b>0.0</b>	0.059	<b>0.0009</b>	1.0	0.982	
	<i>Rs</i>	3.74	2.92	3.86	2.96	2.0	3.096
	<i>a</i>	4	3	4	3	2	
<b>TAB (18)</b>	<i>Ho</i>	0.176	0.222	0.0	0.444	0.666	0.302
	<i>He</i>	0.666	0.507	0.426	0.378	0.531	0.501
	<i>P<sub>H-W</sub></i>	<b>0.0</b>	0.005	<b>0.0005</b>	1.0	0.888	
	<i>Rs</i>	4.13	2.38	2.0	3.28	2.46	2.85
	<i>a</i>	5	3	2	5	3	

Clave (*N*) y *Loci* (# de alelos), heterocigosis observada (*Ho*), heterocigosis esperada (*He*), valores de probabilidad para el ajuste al modelo de equilibrio de H-W (*P<sub>H-W</sub>*), Riqueza alélica (*Rs*), número de alelos presentes por locus (*a*). Valores significativos en negritas.

Tabla 7. Número de alelos por *loci* observados (*N*) y estandarizados utilizando el análisis de rarefacción (*Nr*).

<i>Loci / Localidad</i>	Cli-12		Cli-13		Cli-106		Cli-112		Cli-119		Total	
	<i>N</i>	<i>Nr</i>	<i>NT</i>	<i>NrT</i>								
<b>BC</b>	9	11	2	2	4	5	5	5	4	5	24	27
<b>BCS</b>	12	10	2	2	2	2	7	7	4	4	27	26
<b>SIN</b>	12	9	1	1	5	5	8	4	6	4	32	25
<b>NAY</b>	9	10	1	1	2	1	3	4	2	2	17	22
<b>MICH</b>	8	10	3	3	3	3	5	4	5	5	24	26
<b>OAX</b>	3	4	2	2	2	2	4	5	4	5	15	25
<b>CHIP</b>	10	9	1	1	3	4	5	4	4	5	23	25
<b>CAM</b>	4	5	3	4	4	5	3	4	2	2	16	25
<b>TAB</b>	5	5	3	3	2	2	5	4	3	3	18	24

El análisis de rarefacción para el conjunto de datos de microsatélites, mostró que no existen diferencias significativas del número de alelos esperados con respecto del número de alelos observados. De la misma forma en cada uno de los loci analizados se observó que no existe diferencias significativas en este análisis lo que sustenta que aún en localidades con un tamaño de muestra pequeño fue posible detectar un número adecuado de alelos para un buen análisis (Tabla 7).

Las pruebas de neutralidad realizadas para los datos de microsatélites (Ewens-Watherson, 1972; Chakraborty, 1990), no mostraron valores significativos indicando que las muestras se encuentran en equilibrio, por lo tanto todos los *loci* de las muestras analizadas se consideraron en condiciones de neutralidad (Tabla 8).

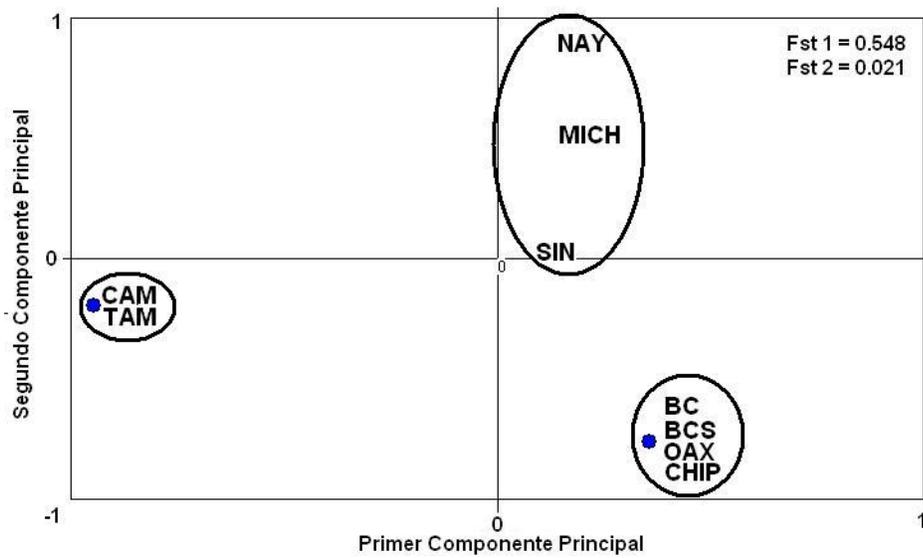
Tabla 8. Resumen estadístico de diversidad para datos de microsatélites por población. Número de organismos analizados por localidad (N). Diversidad genética por localidad (H). Diversidad genética promedio sobre el total de *loci* analizados ( $H_T$ ), y pruebas de neutralidad Ewens-Watherson, 1972 y Chakraborty, 1990, con sus valores de probabilidad entre paréntesis.

Región	Clave	N	H.	$H_T$	E-W	Ch
					Obs. - Esp. (P)	Obs. - Esp. (P)
	<b>BC</b>	10	0.692	0.592	-	-
	<b>BCS</b>	20	0.577	0.686	0.037-0.037 (0.917)	32-30.53 (0.362)
	<b>SIN</b>	42	0.475	0.651	0.019-0.019 (0.773)	65-64.06 (0.461)
<b>Pacífico</b>	<b>NAY</b>	30	0.372	0.465	0.063-0.053 (0.475)	31-31.82 (0.644)
<b>Mexicano</b>	<b>MICH</b>	20	0.623	0.543	0.047-0.039 (0.924)	31-29.49 (0.360)
	<b>OAX</b>	9	0.600	0.705	0.061-0.061 (1.0)	17-17.05 (0.756)
	<b>CHIP</b>	16	0.488	0.260	0.060-0.056 (0.516)	23-23.52 (0.673)
<b>Golfo de</b>	<b>CAM</b>	11	0.568	0.558	0.057-0.059 (0.971)	19-18.64 (0.560)
<b>México</b>	<b>TAB</b>	18	0.518	0.455	0.050-0.046 (0.816)	27-25.776 (0.397)

La prueba de poder estadístico para detectar diferencias entre el tamaño de las muestras, presentó un valor promedio de  $F_{ST} = 0.009$ , el cual resultó no significativo ( $P = 0.8$ ), de acuerdo al valor esperado  $F_{ST} = 0.01$ . En el análisis de componentes principales realizado para los datos de mtDNA, el 1er y 2º componente representan el 94.96 y 3.72% de la variación estimada, para el total de las poblaciones analizadas mientras que el 73.4 y 19.3% del 1er y 2º componentes explican la variación estimada únicamente para las localidades del Pacífico. Las agrupaciones que se observaron para ambos casos muestran una separación clara entre las muestras con mayor diversidad genética que son SIN, NAY y MICH, con respecto al resto de las muestras (Figura 14 a y b).

En el análisis de componentes principales para los datos de microsatélites se observó que el 1er y 2º componentes representan el 51.8% y 17.5% para el total de localidades, mientras que el 57.68 y 19.78% para las localidades del Pacífico explican la variación estimada. Las tres agrupaciones que se observaron tanto en el análisis para el total de localidades como para el de localidades del Pacífico fueron las siguientes: la primera agrupación con las localidades de SIN, NAY y CHIP, que era de esperarse ya que son las localidades que presentaron menor diferenciación poblacional. La segunda agrupación se observaron el resto de las localidades, de las cuales BC y OAX fueron las más diferente (Figura 15 a y b) y en la tercera agrupación las localidades del Golfo de México (CAM y TAM).

a)



b)

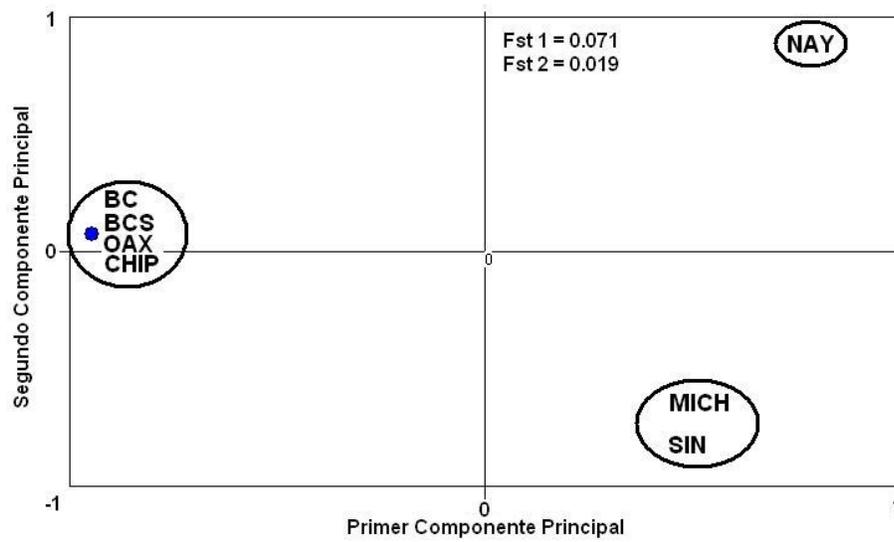
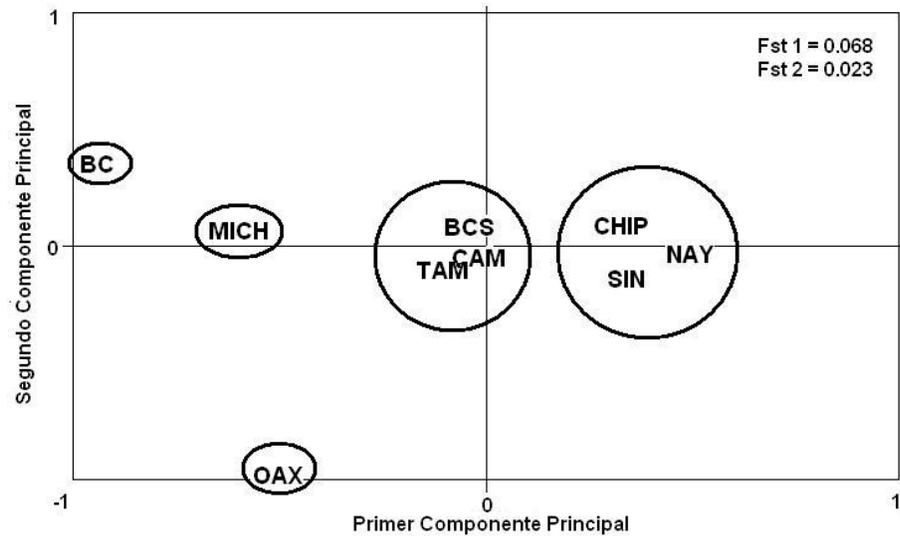


Figura 14. Gráfica de componentes principales para datos de mtDNA. a) PCA para el total de las localidades. b) PCA para localidades del Pacífico mexicano.

a)



b)

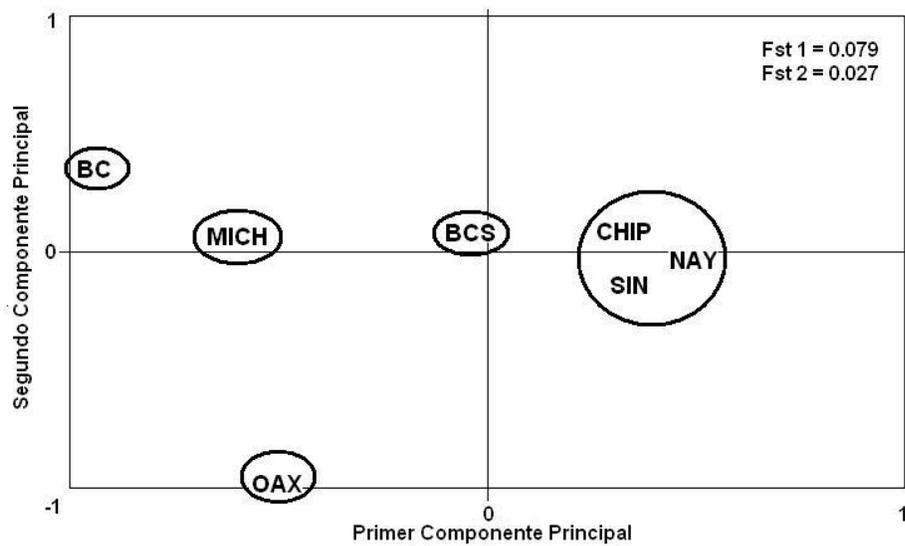


Figura 15. Gráfica de componentes principales para datos de microsátélites. a) PCA para el total de las localidades. b) PCA para localidades del Pacífico mexicano.

## DIVERGENCIA POBLACIONAL

Las pruebas exactas entre pares de poblaciones para analizar la homogeneidad en las frecuencias de los alelos analizados con mtDNA, presentó valores significativos tanto para comparaciones entre el Pacífico mexicano con el Golfo de México como entre localidades del Pacífico, observándose una mayor heterogeneidad en las localidades de MICH y BCS (Tabla.9).

Los índices de divergencia poblacional en el total de localidades obtenido mediante ARLEQUIN fue de  $\Phi_{ST} = 0.586$ , mientras que el mismo índice para las localidades del Pacífico mexicano fue de  $\Phi_{ST} = 0.057$ . Se observó divergencia poblacional, entre localidades del Pacífico mexicano y Golfo de México. Las diferencias significativas entre localidad del Pacífico mexicano, se presentaron entre BCS con las localidades de NAY y MICH (Tabla 9). Resultados que coincide con el análisis de la prueba exacta.

Los resultados para la prueba exacta mostraron diferencias significativas entre algunas poblaciones (Tabla 10), sin embargo, la localidad de SIN fue la que presentó mayor cantidad de valores significativos para este análisis. Los valores de divergencia poblacional  $F_{ST}$  entre pares de localidades para los datos de microsatélites, mostraron valores significativos en las comparaciones de la poblaciones de BC con el resto de las poblaciones, asimismo, entre algunas localidades de BCS con las comparaciones de las poblaciones de SIN, NAY, MICH y TAB (Tabla 10).

Los valores más altos de  $R_{ST}$  obtenidos entre pares de poblaciones se observaron entre las comparaciones entre BC con el resto de las localidades, mientras que los valores más bajos se presentaron en las localidades de SIN, NAY y MICH (Tabla 11)

Tabla 9. Valores de divergencia  $\Phi_{ST}$  entre pares de poblaciones y entre paréntesis valores de probabilidad, bajo de la diagonal. Valores de probabilidad para datos de secuencias entre pares de poblaciones evaluada mediante la prueba exacta, sobre la diagonal. Los valores en negritas representan valores significativos según la corrección de Bonferroni, \* valores significativos sin corrección.

Región	Clave	BC	BCS	SIN	NAY	MICH	OAX	CHIP	CAM	TAB
	<b>BC</b>		-1.0)	1.0	0.769	0.664	-1.0	-1.0	<b>&lt;0.005</b>	<b>&lt;0.005</b>
	<b>BCS</b>	0.0		0.220	0.073	0.042*	-1.0	-1.0	<b>&lt;0.005</b>	<b>&lt;0.005</b>
		(0.999)								
<b>Pacífico</b>	<b>SIN</b>	0.029	0.102		0.051	0.579	0.856	0.406	<b>&lt;0.005</b>	<b>&lt;0.005</b>
		(0.375)	(0.051)							
<b>Mexicano</b>	<b>NAY</b>	0.057	0.132*	0.013		0.261	0.570	0.287	<b>&lt;0.005</b>	<b>&lt;0.005</b>
		(0.310)	(0.022)	(0.240)						
	<b>MICH</b>	0.049	0.147*	-0.02	0.003		0.366	0.246	<b>&lt;0.005</b>	<b>&lt;0.005</b>
		(0.276)	(0.045)	(0.593)	(0.375)					
	<b>OAX</b>	0.0	0.0	0.05	0.078	0.075		-1.0	<b>&lt;0.005</b>	<b>&lt;0.005</b>
		(0.999)	(0.999)	(0.196)	(0.170)	(0.258)				
	<b>CHIP</b>	0.0	0.0	0.072	0.1	0.104	0.0		<b>&lt;0.005</b>	<b>&lt;0.005</b>
		(0.999)	(0.999)	(0.124)	(0.076)	(0.143)	(0.999)			
<b>Golfo de</b>	<b>CAM</b>	1	1	0.679	0.693	0.76	1.0	1.0		(-1.0)
		<b>(0.0)</b>								
<b>México</b>	<b>TAB</b>	1	1	0.717	0.73	0.803	1.0	1.0	0.0	
		<b>(0.0)</b>	(0.999)							

Tabla 10. Valores de divergencia  $F_{ST}$  entre pares de poblaciones, entre paréntesis valores de probabilidad (bajo de la diagonal) y valores de probabilidad mediante la prueba exacta entre pares de poblaciones para datos de microsatélites (sobre la diagonal). Valores en negritas, son significativos según la corrección de Bonferroni, \* valores significativos sin corrección.

Región	Clave	BC	BCS	SIN	NAY	MICH	OAX	CHIP	CAM	TAB
	<b>BC</b>		<b>0.001</b>	<b>0.004</b>	<b>0.0</b>	<b>0.003</b>	0.482	<b>0.006</b>	0.123	<b>0.0</b>
	<b>BCS</b>	0.144 <b>(0.0)</b>		<b>0.005</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>	<b>0.004</b>	<b>0.006</b>	<b>0.006</b>	<b>0.002</b>
<b>Pacífico</b>	<b>SIN</b>	0.454 <b>(0.0)</b>	0.076 <b>(0.0)</b>		0.040*	<b>0.0</b>	0.024*	<b>0.001</b>	0.046*	0.027*
<b>Mexicano</b>	<b>NAY</b>	0.411 <b>(0.0)</b>	0.088 <b>(0.0)</b>	-0.010 (0.783)		<b>0.0</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>
	<b>MICH</b>	0.297 <b>(0.0)</b>	0.045 <b>(0.009)</b>	0.033 (0.072)	0.011 (0.198)		<b>0.006</b>	<b>0.001</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>
	<b>OAX</b>	0.324 <b>(0.0)</b>	0.029 (0.135)	0.029 (0.144)	0.048 (0.063)	0.067 (0.072)		<b>0.003</b>	0.057	<b>0.0001</b>
	<b>CHIP</b>	0.314 <b>(0.0)</b>	0.045* (0.027)	0.031 (0.054)	0.011 (0.198)	-0.022 (0.954)	0.083* (0.045)		0.098	0.0125*
<b>Golfo de</b>	<b>CAM</b>	0.263 <b>(0.0)</b>	0.026 (0.162)	0.022 (0.117)	0.0005 (0.315)	-0.027 (0.801)	0.033 (0.180)	-0.014 (0.558)		0.591
<b>México</b>	<b>TAB</b>	0.455 <b>(0.0)</b>	0.109 <b>(0.0)</b>	-0.0003 (0.387)	-0.007 (0.558)	0.027 (0.135)	0.082* (0.018)	0.014 (0.207)	0.036 (0.171)	

Tabla 11. Valores de divergencia  $R_{ST}$  entre pares de poblaciones, para datos de microsatélites.

Región	Clave	BC	BCS	SIN	NAY	MICH	OAX	CHIP	CAM	TAB
	<b>BC</b>	-								
	<b>BCS</b>	0.1694	-							
<b>Pacífico Mexicano</b>	<b>SIN</b>	0.8329	0.0827	-						
	<b>NAY</b>	0.6996	0.0964	0.0	-					
	<b>MICH</b>	0.4238	0.0471	0.0347	0.0120	-				
	<b>OAX</b>	0.4801	0.0300	0.0308	0.0504	0.0723	-			
	<b>CHIP</b>	0.4582	0.0479	0.0327	0.0120	0.0	0.0916	-		
<b>Golfo de México</b>	<b>CAM</b>	0.3581	0.0268	0.0225	0.0005	0.0	0.0344	0.0	-	
	<b>TAB</b>	0.8372	0.1223	0.0	0.0	0.0284	0.0904	0.0147	0.0381	-

Las pruebas de AMOVA realizadas jerárquicamente respecto a la ubicación geográfica de las localidades, todas resultaron significativas (Tabla 12) y corroboran la divergencia mediante ambos marcadores. Las pruebas de AMOVA realizadas con datos mitocondriales muestran una divergencia muy marcada entre cuencas oceánicas con el 79% de diferencias atribuidas a características genéticas. La divergencia entre algunas localidades entre norte centro y sur se logran observar en el análisis con el 8% de diferencias. Debido a alta diversidad observada en las muestras de la región centro del Pacífico mexicano, se decidió conocer el efecto de diferencia entre las localidades ubicadas en los polos de la región central del Pacífico, y se encontró una diferencia genética del 12%, lo que confirma la divergencia de esta región con el resto de las localidades.

El AMOVA para los datos de microsatélites muestra una diferencia entre cuencas oceánicas no tan marcada (7%) como con los datos del mtDNA, sin embargo, la falta de una mayor diferenciación entre océanos, puede deberse a que las poblaciones de ambas zonas oceánicas comparten alelos con frecuencia similares en algunos *loci*, posiblemente debido a un efecto de homoplasia. En el análisis de jerarquías para localidades norte centro y sur del Pacífico mexicano, se observó un mayor porcentaje de diferencias debidas a características genéticas (13%), mayor al observado con mtDNA.

Por lo anterior se realizó un AMOVA considerando dos grupos, uno formado por las localidades del norte, que corresponden únicamente a las localidades de BC y BCS, y un segundo grupo por el resto de las localidades del Pacífico mexicano, y se corroboró que el 18% la diferencia se debe a características genéticas de las poblaciones de la región norte la ser comparadas con el resto de las localidades principalmente por la divergencia de la localidad BC (Tabla 12).

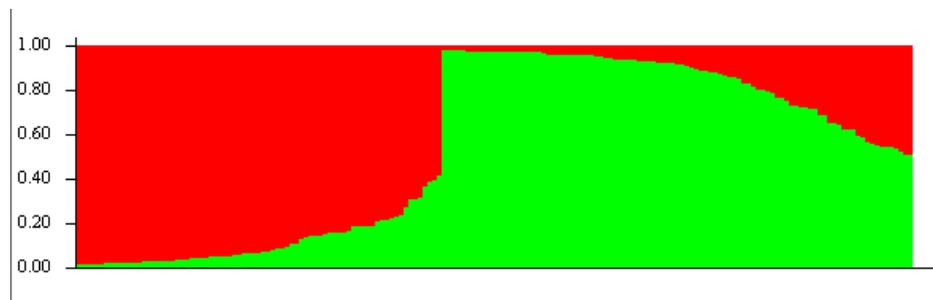
Tabla 12. AMOVAS realizadas entre grupos, Pacífico mexicano y Golfo de México, así como separación de grupos norte, centro y sur de las localidades del Pacífico mexicano.

<b>Marcador</b>	<b>Fuente de varianza</b>	<b>d.f.</b>	<b>Var.</b>	<b>Total (%)</b>	<b><math>\Phi_{ST}</math> y <math>F_{ST}</math> (P)</b>
<b>Mitocondrial</b>	Entre grupos ( <b>PM y GM</b> )	1	0.411	77.7	<b>0.791(&lt;0.005)</b>
	Entre poblaciones dentro de los grupos	7	0.007	1.47	
	Dentro de poblaciones	140	0.110	20.83	
	Entre los grupos del Pacífico ( <b>Norte, Centro y Sur</b> )	2	0.014	9.76	<b>0.088 (0.027)</b>
	Entre poblaciones dentro de los grupos	4	-0.001	-0.88	
	Dentro de poblaciones	113	0.136	91.12	
<b>Microsatélites</b>	Entre grupos ( <b>PM y GM</b> )	1	-0.007	-2.84	<b>0.075 (&lt;0.005)</b>
	Entre poblaciones dentro de los grupos	7	0.027	10.35	
	Dentro de poblaciones	343	0.247	92.49	
	Entre los grupos del Pacífico ( <b>Norte, Centro y Sur</b> )	2	0.023	7.97	<b>0.1307 (&lt;0.005)</b>
	Entre poblaciones dentro de los grupos	4	0.014	5.11	
	Dentro de poblaciones	287	0.250	86.92	
	Entre los grupos del Pacífico ( <b>Norte, Centro-Sur</b> )	1	0.045	14.81	<b>0.1862 (&lt;0.005)</b>
	Entre poblaciones dentro de los grupos	5	0.011	3.81	
	Dentro de poblaciones	287	0.250	81.38	
	Entre los grupos del Pacífico ( <b>BC, BCS+Centro y Sur</b> )	2	0.039	12.97	<b>0.1676 (&lt;0.005)</b>
Entre poblaciones dentro de los grupos	4	0.011	3.79		
Dentro de poblaciones	287	0.250	83.24		

El análisis global de asignación individual realizado con los datos de microsatélites con el programa STRUCTURE para todas las localidades (Pacífico Mexicano y Golfo de México) mostró un valor máximo de  $Ln = 1677.83$  ( $Var = 313.23$ ) con  $K = 6$ , indicando una estructura genética de probablemente seis poblaciones. Sin embargo, la prueba de Evanno detectó una  $K = 2$ , sugiriendo solo estructura poblacional entre las dos regiones oceánicas (Figura 16 a y b).

El análisis para las localidades del Pacífico mexicano, mostró un valor máximo de  $Ln = 1621.17$  ( $Var = 85.96$ ) para una  $K = 2$ , mismo que fue observado en la prueba de Evanno ( $K = 2$ ). Esto coincide con la prueba de AMOVA para datos de microsatélites, el cual establece la presencia de dos unidades genéticamente independientes (Figura 17 a y b).

a)



b)

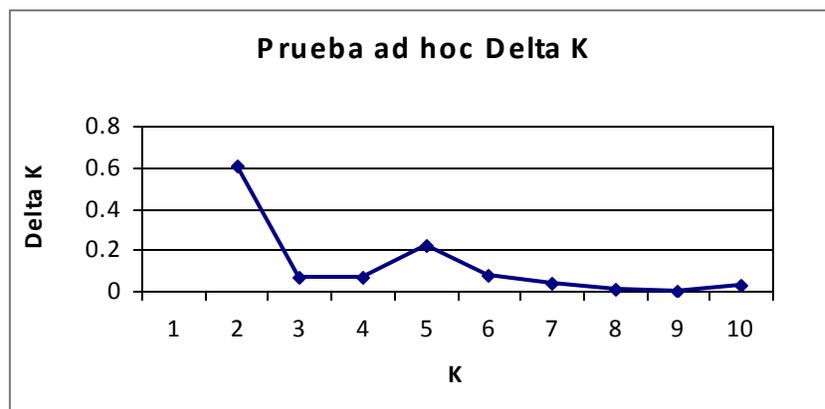
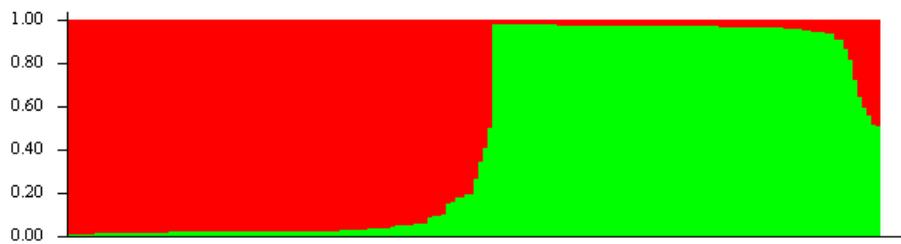


Figura 16. a) Análisis STRUCTURE y b) Prueba de Evanno, para total de localidades.

a)



b)

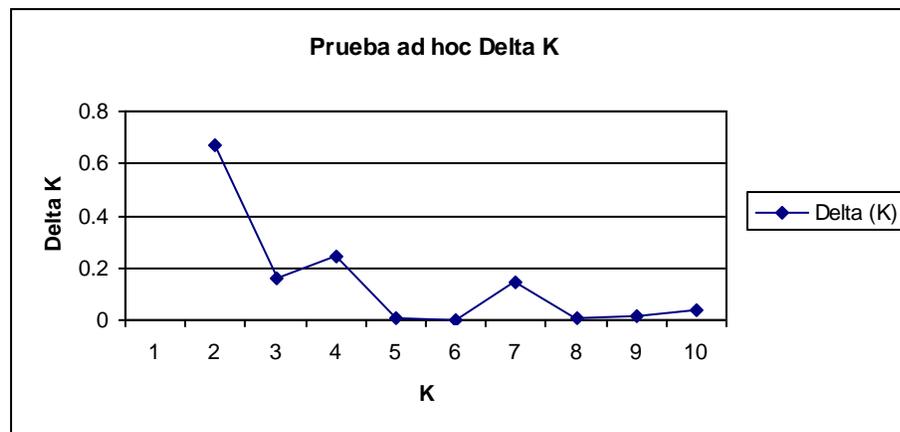


Figura 17. a) Análisis STRCTURE y b) Prueba de Evanno, para localidades del Pacifico mexicano

La correlación entre índices de divergencia población obtenida mediante ambos marcadores (nuclear y mitocondrial) de *S. lewini* presentó un valor negativo de correlación  $r = -0.1174$  que, aunque no es significativo, sugiere una relación inversa entre los índices, lo que indica que la divergencia encontrada entre las localidades de mayor diferencia con datos de mtDNA, se observa menor divergencia en microsatélites. Esto sugiere que los niveles de divergencia presentan una importante relación con el desplazamiento de hembras y machos (Figura 18).

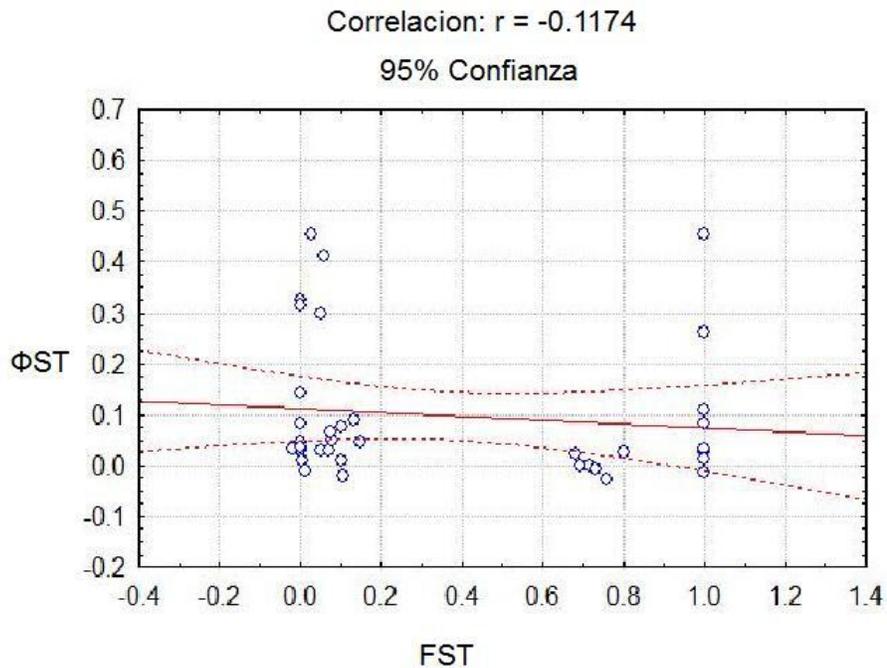


Figura 18. Gráfica de correlación entre valores de divergencia poblacional  $\Phi_{ST}$  y  $F_{ST}$ .

## AISLAMIENTO POR DISTANCIA

No se observó un ajuste significativo al modelo de Aislamiento por distancia a través de la correlación entre valores de  $\Phi_{ST}$  y  $F_{ST}$  estandarizados y distancias geográficas de las localidades del Pacífico mexicano, estimados mediante ambos marcadores, mtDNA y microsatélites ( $r = -0.282$ ,  $P = 0.910$ ,  $r = 0.492$ ,  $P = 0.086$ , respectivamente; Figura 19). Este mismo patrón se corrobora en los agrupamientos realizados, donde poblaciones del norte se agrupan con las del sur (ver más adelante).

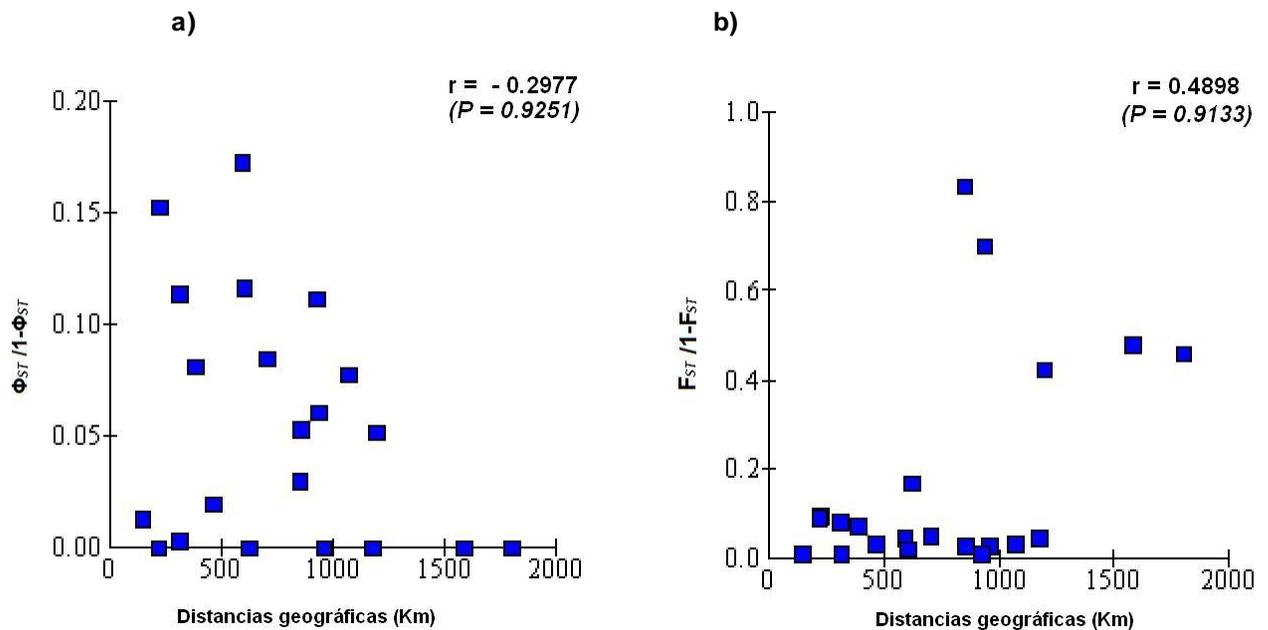
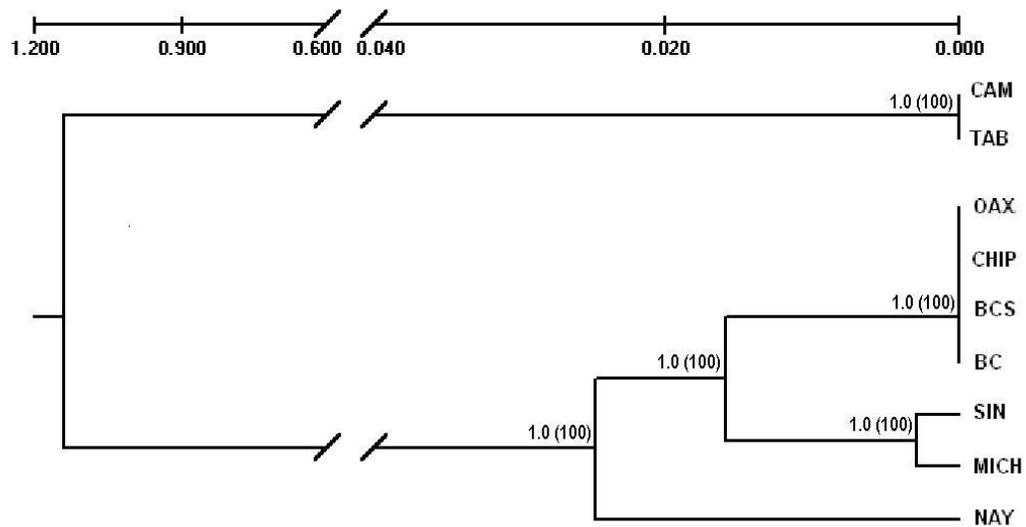


Figura 19. Aislamiento por distancia, correlación entre las distancias geográficas y los valores de  $\Phi_{ST}$  y  $F_{ST}$  estandarizados para localidades del Pacífico mexicano. a) Datos de mtDNA b) Datos de microsatélites.

Los dendrogramas obtenidos mediante el método de UPGMA usando distancias genéticas de Nei (1978) presenta clara la separación entre cuencas oceánicas y entre las localidades de mayor diversidad en el Pacífico mexicano con aquéllas que no muestran variación. Esta representación de relaciones genéticas es más acorde a la ubicación geográfica de las muestras separando las poblaciones de ambas cuencas oceánicas. En el Pacífico mexicano las poblaciones del norte, se unen indistintamente con las del sur, y las poblaciones de la región central que presentan los mayor valores de diversidad se mantienen agrupadas (Figura 20 a).

Mientras que la agrupación mediante distancias de Reynolds *et al.*, (1983), refleja claramente dos grupos uno formado por las localidades de mayor diversidad como SIN, NAY y MICH, y un segundo grupo conformado por las localidades que no presentaron diversidad genética, incluyendo las localidades del Golfo de México (Figura 20 b).

a)



b)

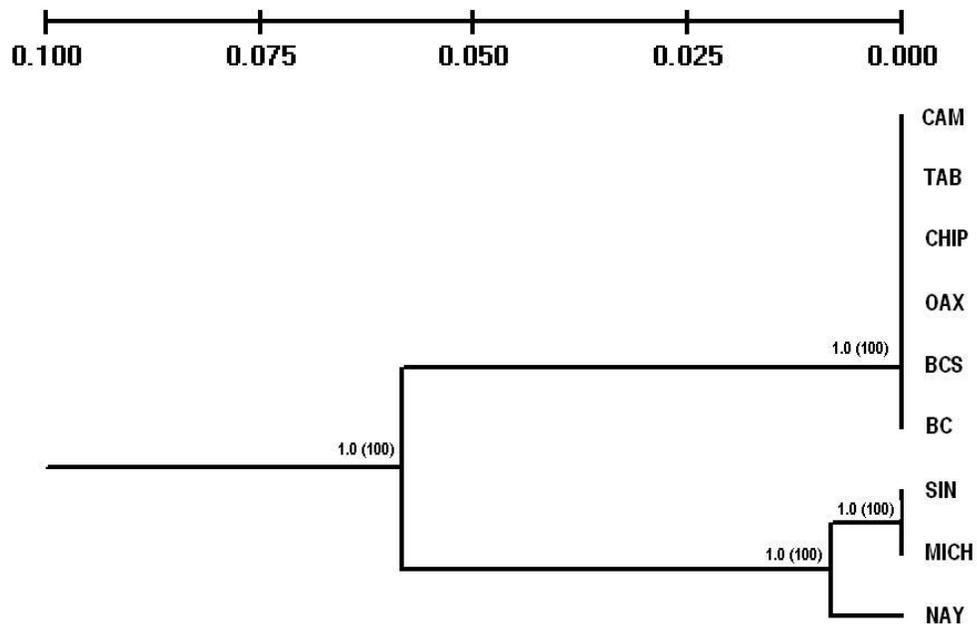
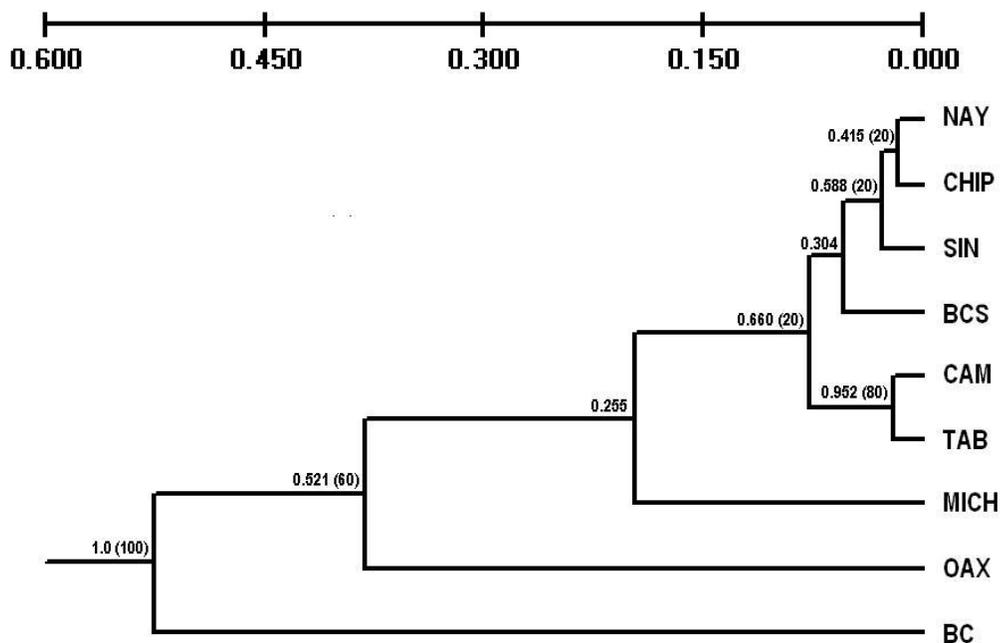


Figura 20. Dendrogramas para datos de mtDNA mediante método UPGMA a) Distancias genéticas de Nei, 1978 y b) Distancias genéticas de Reynolds *et al.*, 1983. Proporción de réplicas similares en cada nodo y entre paréntesis el porcentaje del soporte del nodo.

El dendrograma realizado mediante datos de microsátélites con distancias de Nei (1978), presentó varios grupos: Uno formado únicamente por localidades del Golfo de México y otro conformado por otras localidades ubicadas en diferentes partes (norte, centro y sur) del Pacífico mexicano, dejando por separado, las localidades que presentan claramente diferencias significativas al resto de las localidades, como BC, OAX y MICH (Figura 21 a).

El dendrograma obtenido mediante distancias de Reynolds *et al.*, (1983) muestra agrupaciones similares una donde hay la separación individual de las localidades que presentan el menor número de muestra (BC y OAX). Otro de los grupos agrupa las localidades de CHIP, SIN y NAY, estas dos últimos presentan una divergencia con la de BCS. Por último se observa un grupo donde las muestras correspondientes al Golfo de México parecen ser el último nodo que conforma este grupo, junto con localidades del Pacífico (Figura 21 b). Ambos dendrogramas muestran la clara divergencia de BC.

a)



b)

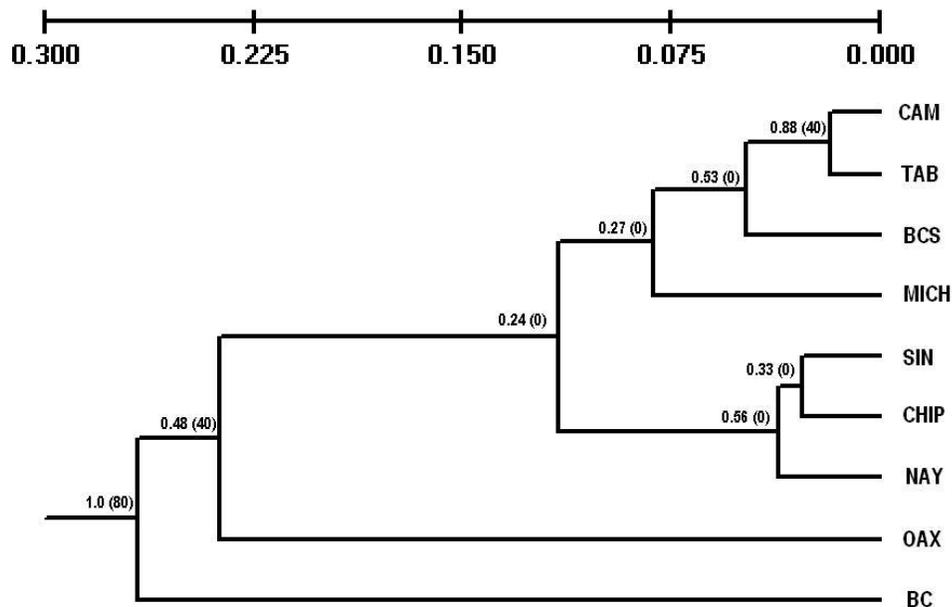


Figura 21. Dendrogramas de los datos de microsatélites mediante método UPGMA.

a) Distancias genéticas (Nei, 1978) y b) Distancias genéticas (Reynolds *et al.*, 1983). Se muestran la proporción de réplicas similares en cada nodo y entre paréntesis el porcentaje del soporte del nodo.

## EXPANSIÓN POBLACIONAL Y FLUJO GENÉTICO

Las estimaciones del valor promedio de flujo genético obtenidas mediante ambos marcadores, para pares de localidades en 5 corridas, utilizando el programa MIGRATE, resultaron similares (ver anexos). Los valores de flujo genético más alto se observaron en las estimaciones realizadas mediante el mtDNA con un intervalo entre los 154 – 600, mientras que los microsatélites presentaron una estimación de flujo genético va de 17 – 668. La mayor cantidad de flujo genético se presentó entre las regiones norte y sur con un intervalo de 235 - 668 migrantes. El intervalo de los promedio del tamaño poblacional estimado mediante los datos de mtDNA fue de 27 a 127, mientras que el obtenido a partir de los microsatélites fue mayor (77 a 114). Las localidades con un mayor tamaño efectivo poblacional derivados de los datos de mtDNA y microsatélites fueron OAX (127) y BC (114) (respectivamente) y la de menor

tamaño efectivo poblacional fue NAY estimado igualmente mediante ambos marcadores (27, mtDNA y 77, microsatélites) (Tabla 13).

Tabla 13 Valores de migrantes entre pares de poblaciones, con un sentido de migración (Izquierda → derecha). Los valores originados de datos del mtDNA se muestran arriba de cada recuadro, mientras que los segundos valores de cada recuadro corresponden a datos de microsatélites. Valores promedio de  $\Theta$  para datos de mtDNA (en horizontal), valores  $\Theta$  para microsatélites (en vertical).

→	BC 60	BCS 27	SIN 47	NAY 62	MICH 84	OAX 127	CHIP 56	CAM 66	TAB 49
<b>BC</b>		445.14	416.4	377.54	488.92	467.58	534.38	398.7	439.86
<b>114</b>		327.871	25.857	47.211	275.731	484.558	457.319	479.352	234.396
<b>BCS</b>	475.88		455.4	362.58	465.06	521.9	571.54	362.58	423.6
<b>115</b>	599.203		66.198	69.835	234.745	565.639	435.704	595.148	382.258
<b>SIN</b>	461.74	541.42		596.38	462.36	393.08	439.6	499.52	406.44
<b>105</b>	576.200	296.794		149.621	320.952	667.946	401.842	617.081	399.176
<b>NAY</b>	479.2	463.1	265.5		483.22	486.3	432.74	434.22	469.42
<b>77</b>	433.687	429.054	96.198		400.075	508.431	325.033	572.121	325.264
<b>MICH</b>	495.3	569.4	428.56	385.26		562.7	383.48	474.52	477.04
<b>105</b>	609.441	357.691	37.934	30.374		611.520	543.976	517.813	291.845
<b>OAX</b>	555.44	447.82	326.2	520.02	478.48		537.46	441.86	375.9
<b>111</b>	497.254	356.656	17.510	37.869	289.888		469.121	491.803	231.136
<b>CHIP</b>	582.76	453.7	452.4	360.24	504.28	542.2		494.16	442.44
<b>97</b>	519.460	239.086	39.629	97.098	387.831	543.903		551.485	283.980
<b>CAM</b>	546.92	370.48	339.02	237.28	368.36	376.42	448.9		439.44
<b>96</b>	599.663	436.084	22.495	74.061	288.335	511.034	427.962		313.563
<b>TAB</b>	459.7	393.5	346.48	153.78	287.28	467.84	454.34	580.04	
<b>86</b>	602.553	358.885	71.132	45.598	357.795	635.681	475.048	588.632	

## DEMOGRAFÍA HISTÓRICA

La estimación de  $\tau$  o el tiempo correspondiente momento de la expansión, para el total de las secuencias analizadas fue de 0.666 (s.d 1.247). La estimación de  $\tau$  y del tiempo desde la expansión poblacional ( $T$ ) son muy similares en las poblaciones analizadas principalmente para las localidades de SIN y MICH (Tabla 14). La gran diferencia entre los parámetros demográficos  $\theta_0$  y  $\theta_1$  en las muestras de SIN, NAY y MICH, sugieren una rápida expansión poblacional y las estimaciones de  $T$ , mostraron

un incremento reciente en la demografía histórica aproximadamente hace 262,600 años, mientras que la estimación de una expansión espacial resultó más antigua, hace aproximadamente 470 mil años. (Tabla 15).

Tabla 14. Parámetros de demografía histórica mediante datos mitocondriales, para localidades con variación genética.  $\tau = 2\mu T$  donde  $\mu$  es la tasa de mutación de 0.8% sustituciones por millón de años para mtDNA región control en tiburones (Duncan *et al.*, 2006) y,  $T$  es el tiempo desde la expansión poblacional,  $\Theta_0 = 2\mu N_0$  antes de la expansión,  $\Theta_1 = 2\mu N_1$  después de la expansión, suma de la diferencias de cuadrados (S.S.D).

Localidad	$\tau$	$T$	$\theta_0$	$\theta_1$	S.S.D
<b>SIN</b>	3.0	262,600	0.0017	0.502 (7,700)	0.141
<b>NAY</b>	0.0	??	0.0	99999.0 (1.5x10 <sup>9</sup> )	0.307
<b>MICH</b>	3.0	262,600	0.2173	0.442 (6,800)	0.204

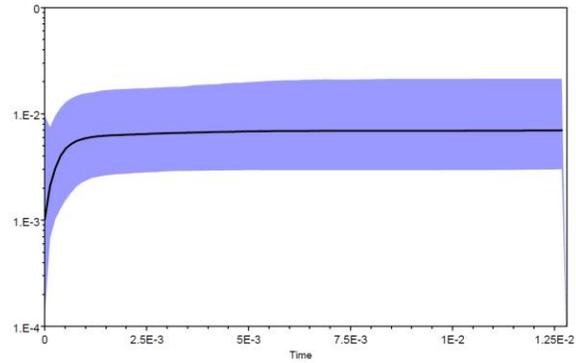
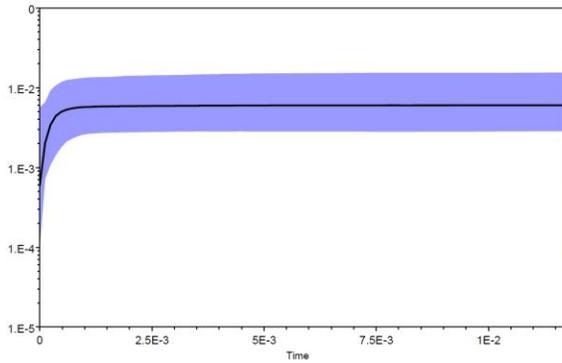
Tabla 15. Parámetros expansión espacial, para localidades con variación genética de mtDNA.  $\tau = 2\mu T$  y  $T$  es el tiempo desde la crecimiento espacial de la población,  $\theta_N$  es el tamaño efectivo de hembras para la población inicial, suma de la diferencias de cuadrados (S.S.D).

Localidad	$\tau$	$T$	$\theta_N$	$M$
<b>SIN</b>	5.408	473,400	0.006 (92.0)	0.721
<b>NAY</b>	4.655	407,500	0.001 (15.0)	0.916
<b>MICH</b>	5.340	467,500	0.001 (15.0)	0.734

Los resultados del análisis de evolución de estimación Bayesiana, mostraron un reciente declive en el tamaño poblacional de las hembras en el Pacífico mexicano, que se estima que ocurrió de hace 2,000 a 2,500 años, y el tiempo estimado de la reducción de los tamaños poblacionales en las poblaciones de SIN, NAY y MICH, que muestran valores diferentes de cero, fueron más recientes, alrededor de 600, 250 y 100 años respectivamente (Figura 22).

Pacifico mexicano

SIN



NAY

MICH

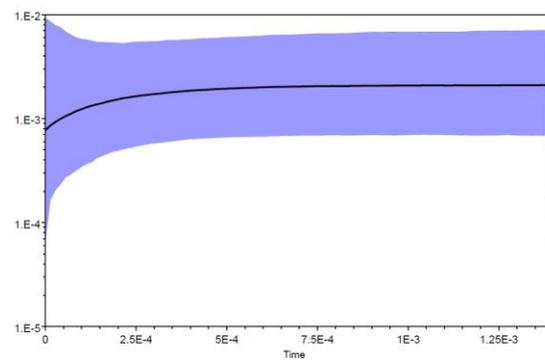
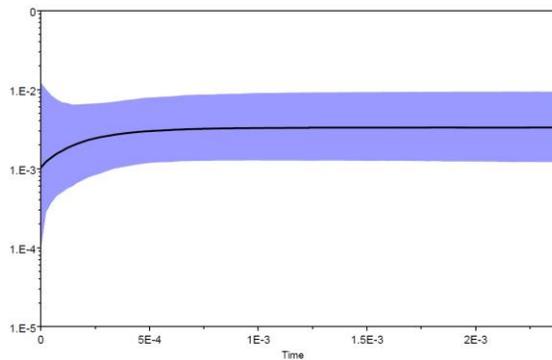


Figura 22. Skyline plots para datos de mtDNA en el Pacífico Mexicano.

Los valores de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias para el total de las poblaciones analizadas, no presentó un ajuste al modelo de distribución propuesto por Rogers y Harpending (1992), ya que se observó una distribución bimodal indicando un posible cuello de botella para la especie y para la población de SIN, sin embargo para las poblaciones de NAY y MICH, se observó un ajuste al modelo, lo que sugiere un proceso de expansión poblacional en estas dos localidades del Pacífico mexicano (Figura 23).

Los valores de probabilidad de la distribución de las diferencias nucleotídicas pareadas en las localidades que mostraron diversidad, se observó que los valores de  $F_s$  ( $F_S$ ) resultaron positivos y no significativos. La estimaciones de distribución de diferencias nucleotídicas pareadas resultaron con una distribución unimodal para las localidades de NAY y MICH ( $SSD = 0.307$ ,  $P < 0.005$ ;  $SSD = 0.204$ ,  $P = 0.032$ ).

respectivamente) lo que sugiere un ajuste al modelo de expansión demográfica de estas poblaciones. Sin embargo, se observó una distribución bimodal para la localidad de SIN (SSD = 0.141,  $P = 0.058$ ; Figura 24), donde no se puede hablar de una expansión demográfica, pero si de un probable evento de cuello de botella para la población de Sinaloa. También es posible que también haya sufrido un proceso de expansión poblacional en dos diferentes tiempos. Aunque el índice de Harpending raggedness (1994) presentó un intervalo de 0.4019 (NAY) a 0.648 (MICH), ninguno resultó significativo en las tres localidades con diversidad diferente de cero.

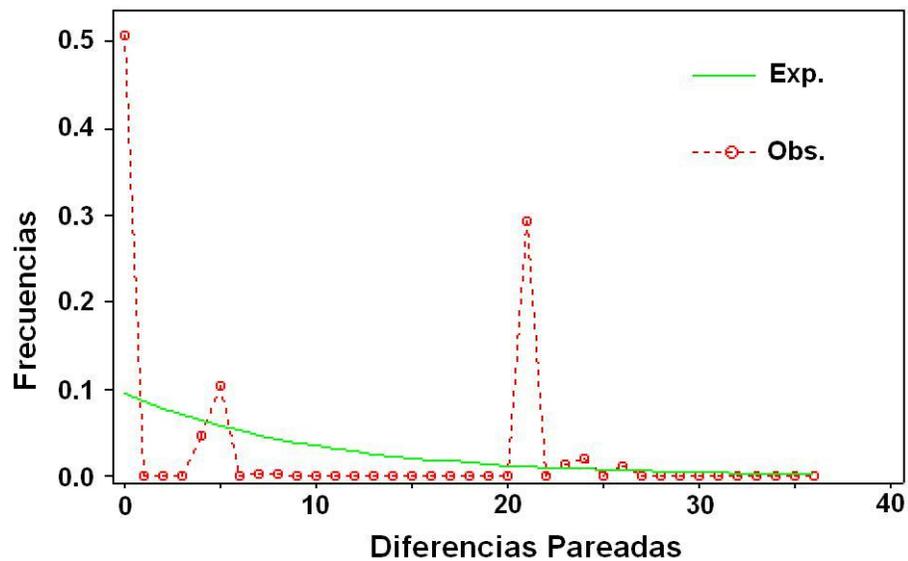


Figura 23. Distribución de número de diferencias entre secuencias para un fragmento de la región control en *S. lewini* para el total de muestras analizadas en el Pacífico mexicano. Línea continua corresponde al modelo esperado.

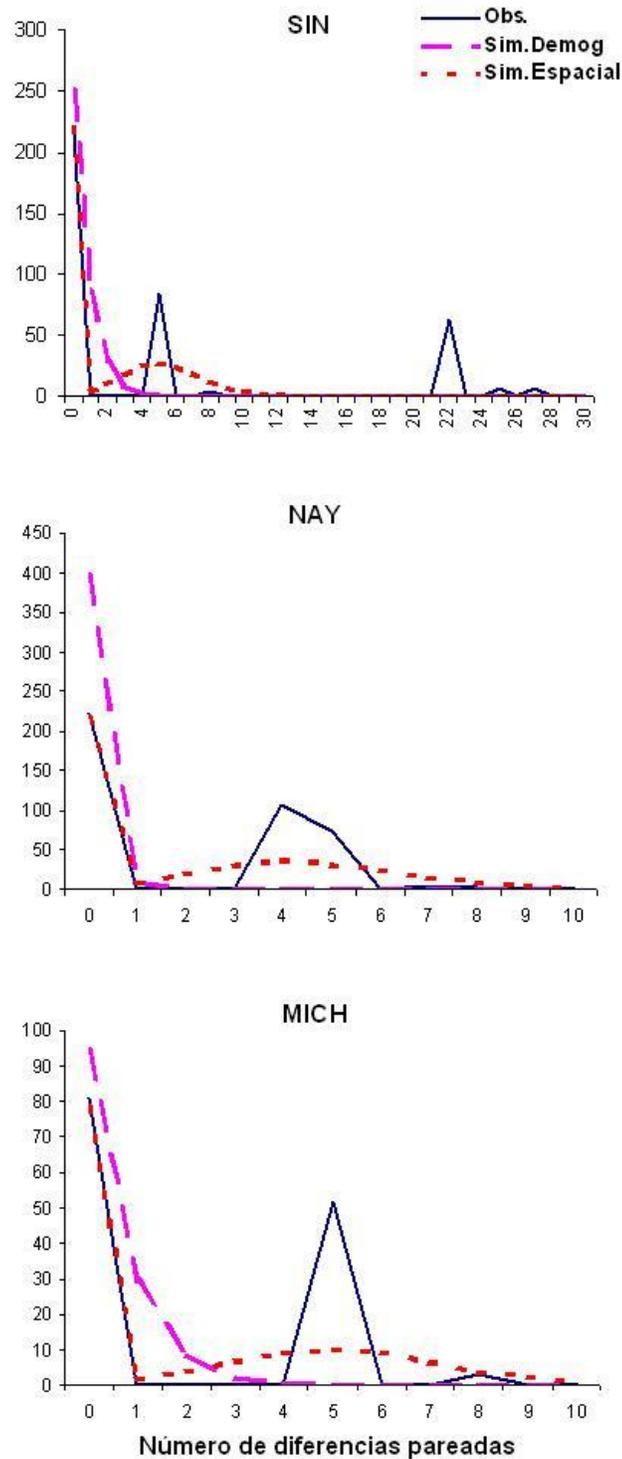


Figura 24. Distribución de diferencias nucleotídicas (línea continua) con ajuste al modelo de expansión poblacional según Rogers (línea punteada larga) en las localidades con más de un haplotipo. Línea punteada corta corresponde al modelo de expansión espacial de (Ray *et al.*, 2003).

## FILOGEOGRAFÍA

Los datos obtenidos no fueron suficientes para determinar un patrón filopátrico, sin embargo, la genealogía obtenida con datos mtDNA, bajo el modelo evolutivo HKY85 + G = 0.395 con el método de ML, mostró evidencia del reciente surgimiento de los haplotipos encontrados, con excepción de haplotipo "E" (Figura 25). De igual forma la genealogía de haplotipos utilizando los datos previos publicados sobre esta especie (Duncan *et al.*, 2006), mostró la existencia de dos linajes de la región control de mtDNA; uno representado por el haplotipo "E", el cual conserva las características ancestrales en el Golfo de México, mientras un segundo clado se formó con el resto de los haplotipos presentes en el océano Pacífico y los cuales se sugieren con origen más reciente (Figura 26). La máxima diferencia con el Golfo de México es resultado del aislamiento por el cierre del Istmo de Panamá y coincide con publicaciones previas sobre la misma especie realizadas por Duncan *et al.* (2006).

Todo lo anterior se corrobora mediante el análisis de clados anidados, donde se obtuvo una red de haplotipos, en la que se observó una importante separación con base en el número de pasos mutacionales entre el haplotipo "E", presente en ambas cuencas oceánicas. El surgimiento de este haplotipo se ubica en un tiempo de 3.6 millones de años considerando una tasa mutacional de 0.8% de sustituciones por millón de años, dado que las diferencias con el resto de las haplotipos fue de 21 pasos mutacionales, mientras que la época del surgimiento de los haplotipos "C" y "B" es de aproximadamente 700 mil años y del "D" es de 525 mil años (Figura 27), tiempo que podrían corresponder a periodos de reducción e incremento poblacional durante eventos interglaciares.

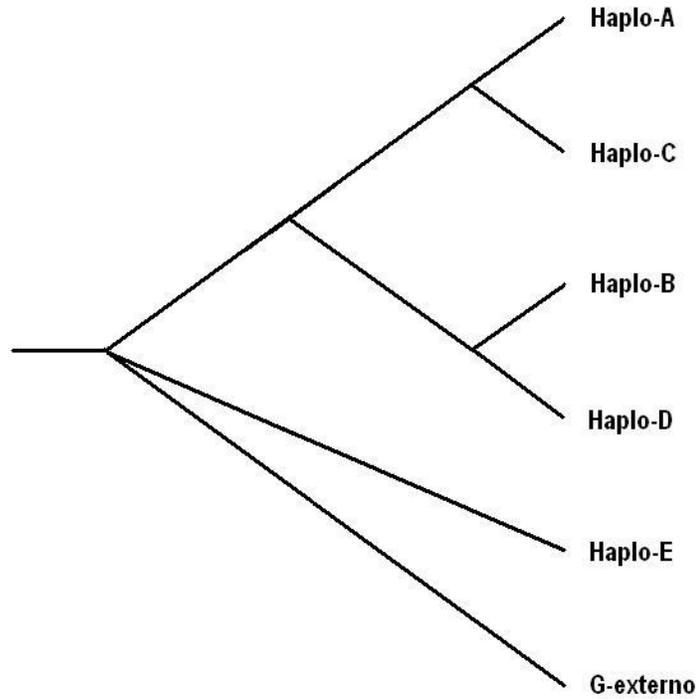


Figura 25. Genealogía de haplotipos de región control obtenida mediante método de máxima verosimilitud.

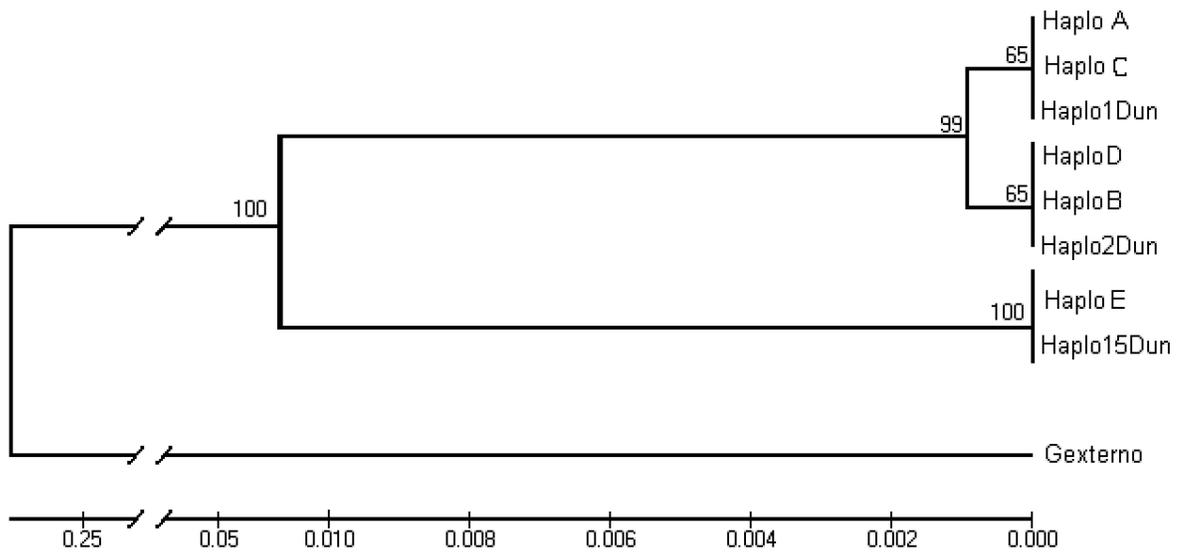


Figura 26. Genealogía de haplotipos de región control obtenida mediante método de distancias genéticas.

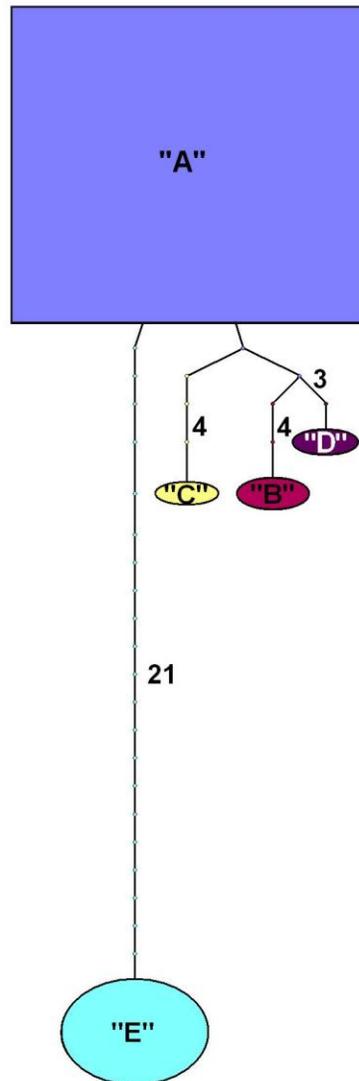


Figura 27. Red de haplotipos con número de pasos mutacionales, obtenidos de un fragmento de la región control de mtDNA en *Sphyrna lewini*.

## DISCUSIÓN

En el presente estudio, se detectó dos panoramas diferentes en cuanto a la estructura poblacional de *Sphyrna lewini*, ya que los datos mitocondriales no muestran la presencia de una divergencia poblacional, mientras que los datos nucleares sugieren principalmente divergencia de la población más norteña (BC) del Pacífico mexicano.

Los resultados del presente estudio rechazan la hipótesis de la probable filopatría sugerida para esta especie (Klimley, 2003), ya que no se observó una estructura poblacional definida que corresponda con las posibles áreas de crianza y alimentación reportadas en el Pacífico mexicano (Bizzarro *et al.*, 2007; Salomón-Aguilar *et al.*, 2009; Anislado, 2008; Alejo-Plata *et al.*, 2006 a; 2006 b). Sin embargo se acepta la hipótesis establecida en este trabajo, ya que se observó dos unidades evolutivas independientes las cuales presentan un patrón filogeográfico relacionado con eventos de periodos interglaciares y el cierre del Istmo de Panamá.

## DIVERSIDAD GENÉTICA

Los niveles de diversidad encontrada mediante marcadores mitocondriales y nucleares en el presente estudio mostraron niveles de variación genética similares a los reportados para otras especies de tiburones (Keeney y Heist, 2003; Stoner *et al.*, 2003). En el Golfo de México, los bajos niveles de diversidad detectados con datos provenientes de mtDNA, coinciden con los datos de variación genética reportados para *S. lewini* en esta región (Duncan *et al.*, 2006). Además de que la presencia del haplotipo “E” puede ser el resultado del flujo genético histórico, estimado 3.6 millones antes del cierre del Istmo de Panamá, evento que ha marcado a la biodiversidad en ambas cuencas oceánicas.

Estos niveles de diversidad detectada, puede ser el resultado no solo de la homogeneidad del ambiente, sino también de posibles reducciones poblacionales durante ciclos glaciares ocurridos hace aproximadamente 120 000 años (Palumbi, 1994).

Aunque el menor número de alelos presentes en las localidades de BCS y OAX, podría ser efecto del modesto tamaño de muestra, BC (n = 10) y OAX (n = 9), estos son similares a algunos estudios en elasmobranchios ya que utilizan tamaños muestrales parecidos. Tanto el análisis de rarefacción como la prueba de robustez estadística mediante POWSIM, no mostraron valores significativos que determinaran alteraciones en los resultados de los análisis debidos al tamaño de muestra. Por lo que se considera que el número de muestra fue adecuado y que los resultados obtenidos son confiables. También, ambas localidades presentaron cierto aislamiento en los agrupamientos realizados, debido a la presencia de alelos únicos, con frecuencias altas en *loci* diferentes (Cli-112 y Cli-13 respectivamente), lo que está generando una diferencia importante con el resto de las muestras analizadas.

La diversidad genética presente en los organismos del Pacífico y del Atlántico detectada mediante microsatélites, muestra valores similares debido a que comparten una importante cantidad de alelos que además se presentan con frecuencias similares. La similitud de las frecuencias alélicas encontradas en ambas cuencas oceánicas puede ser resultado de un efecto de homoplasia, lo que se ha reportado con frecuencia en marcadores híper-variables como los microsatélites (Estoup *et al.*, 2002) ya que se ha sugerido que en los alelos de microsatélites de menor tamaño, como puede ser el caso de los *loci* analizados, se reducen los posibles estados alélicos favoreciendo la aparición de la homoplasia mencionada (Estoup y Cournuet, 1999).

## **DIVERGENCIA POBLACIONAL Y FLUJO GENETICO**

Es más evidente que la estructura genética de los organismos marinos pelágicos es compleja, debido a las interacciones históricas y actuales entre factores ambientales, ecológicos y biológicos como: la demografía, la capacidad de dispersión y los tiempos de permanencia de larvas u organismos juveniles en zonas de alimentación.

El mtDNA, presenta una tasa mutacional relativamente alta de  $3.6 \times 10^{-8}$  sustituciones por millón de años en teleósteos (Donaldson y Wilson, 1999), además de tener características ya mencionadas, que hacen de este marcador una importante

herramienta para la obtención de información genética dentro de un contexto histórico (Avice, 2004). El DNA nuclear por su parte, y en especial los microsatélites, presentan una tasa mutacional muy elevada entre  $10^{-5}$  a  $10^{-2}$  sustituciones por millón de años (Weber y Wong, 1993), mayor incluso a la observada en algunas regiones de mtDNA altamente variable (Chakraborty *et al.*, 1997), característica que permite determinar procesos evolutivos relativamente recientes en peces marinos.

Los resultados del análisis de mtDNA del presente estudio coinciden con los resultados de Duncan *et al.*, (2006), realizados con el mismo marcador, donde las localidades correspondientes a la zona norte (BC y BCS) no muestran diferencias significativas con las localidades ubicadas más al sur del Océano Pacífico. Este mismo patrón de homogeneidad entre localidades situadas en el Pacífico mexicano evaluado con marcadores mitocondriales, se ha observado en estudios de otras especies de peces pelágicos (Díaz-Jaimes *et al.*, 2006). Asimismo, es posible que la ausencia de aislamiento por distancia que no se observó mediante la prueba de mantel, se deba a la similitud genética detectada entre localidades alejadas entre sí como las localidades del norte (BC y BCS), con las localidades del sur OAX y CHIP.

Varios estudios de especies pelágicas e invertebrados han detectado, al igual que en el presente trabajo, diferencias entre las poblaciones de las zonas estudiadas con respecto a otras poblaciones del Pacífico oriental (Tripp-Valdez *et al.*, 2010; Valles-Jimenez *et al.*, 2005; Saavedra-Sotelo *et al.*, 2011). Así mismo el no encontrar ajuste al modelo de aislamiento por distancia, puede ser explicado mediante los resultados del flujo genético con datos de mtDNA, los cuales sugiere un desplazamiento mayor de hembras entre el norte (BC y BCS) y sur (OAX y CHIP) del Pacífico mexicano, mientras que en las localidades del centro se evidencia un mayor flujo de hembras entre localidades cercanas.

Por otra parte los resultados de datos de microsatélites muestran la evidencia de una reciente divergencia poblacional, entre algunas muestras provenientes de las localidades del Pacífico mexicano como la localidad de BC con el resto de las localidades y divergencia de SIN y NAY con BCS. Esto corresponde con las estimaciones más bajas de migrantes entre estas localidades mediante los análisis de datos nucleares, reflejando una menor movilidad de organismos (posiblemente

machos ya que no se observó divergencia con mtDNA) a la región central del Pacífico mexicano.

La población BC mostró los mayores valores de riqueza alélica y de diversidad genética, lo cual podría estar relacionado con la divergencia observada de esa localidad mediante microsatélites, no detectada mediante el mtDNA donde no se observó diversidad ni divergencia poblacional. Se ha observado que algunas poblaciones con altos niveles de diversidad, han presentado también evidencias de un crecimiento reciente en sus poblaciones (Liu *et al.*, 2006 a; Klanten *et al.*, 2007). La diversidad y divergencia detectada en BC, puede deberse al efecto de un incremento poblacional para esta localidad, pues fue la población que presentó los valores más altos de tamaño poblacional estimados (Tabla 13).

El flujo genético estimado mediante datos de microsatélites, muestra un mayor número de inmigrantes hacia la población de OAX, procedentes del norte y centro del Pacífico mexicano con un muy limitado desplazamiento de éstas hacia la región central. Es posible que el Golfo de Tehuantepec represente un área de alimentación y/o reproducción hacia donde las poblaciones del norte y centro se desplazan en forma directa sin entrar en contacto una con la otra. Estos resultados serían congruentes con la diferenciación entre las localidades de BC con el resto de las localidades con excepción de OAX, así como la divergencia entre SIN y NAY con BCS. De esta manera, las poblaciones de BC, BCS y SIN-NAY, podrían representar unidades genéticamente discretas sujetas de ser tomadas en consideración para la toma de decisiones administrativas de la especie.

Aunado a lo anterior las características oceanográficas en el Pacífico mexicano donde se ha observado que el cambio en la temperatura superficial originan cambios en la composición de la biodiversidad de la zona. Asimismo, la cantidad de alimento disponible en la región puede repercutir en el comportamiento y disminuir el desplazamiento de algunas especies, a pesar de que se caracterizan por su alta capacidad de desplazamiento, (Domeier *et al.*, 2005; Domeier, 2006). Este mismo efecto de diferenciación poblacional ha sido observado en el Pacífico central en áreas similares a las analizadas, donde otras especies de características pelágicas como *Coryphaena hippurus*, muestran heterogeneidad entre las poblaciones localizadas en

esta zona, probablemente debida al cambio de la temperatura superficial en diferentes épocas del año (Tripp-Valdez *et al.*, 2010).

Se ha observado que *S. lewini* es una especie que no realiza grandes desplazamientos, a pesar de ser un organismo con características biológicas para realizarlas, por el contrario presenta una gran afinidad a zonas costeras e islas, así como a aguas cálidas (20 a 24°C), teniendo una residencia prolongada de individuos en zonas costeras e islas en aguas circundantes a Hawai (Kohler y Turner, 2001), aunque se desconoce su sexo. La presencia de islas en la región central del Pacífico mexicano pueden estar favoreciendo un mayor tiempo de residencia de individuos de la especie ya sea para procesos de alimentación y/o apareamiento, limitando su dispersión. No obstante, existe evidencia de un desplazamiento diferencial de sexos en algunas especies de tiburones, por lo que no es descartable que los resultados observados revelen este proceso diferencial en *S. lewini* (Klimley, 1987; Stevens y Lyle, 1989; Walker *et al.*, 1999).

Es posible que el efecto de desplazamiento anterior sea propiciado por el patrón de corrientes presente en el Pacífico mexicano, especialmente la corriente de California y la Costanera de Costa Rica, las cuales fluyen en un sentido norte-sur en el primer caso, y sur-norte en el segundo. También las corrientes locales de menor intensidad pudieron haber favorecido el intercambio de organismos entre las regiones norte y sur del Pacífico mexicano, durante los procesos de expansión demográfica y espacial, que experimentaron las poblaciones en esta zona. A ese respecto resulta consistente el mayor número de migrantes entre las zonas mencionadas, estimados mediante datos de mtDNA (Tabla 14).

Considerando la discrepancia de divergencia genética observada mediante ambos marcadores, los patrones de divergencia observada sugieren tres posibles respuestas: una que se deba al desplazamiento diferencial de sexos en el que las hembras desplieguen una mayor capacidad de dispersión en relación con los machos podría explicar la ausencia de divergencia en el mtDNA. Si este fuera el caso, la movilidad limitada en los machos podría resultar en la divergencia observada en los microsatélites. Un mayor desplazamiento por parte de las hembras podría estar relacionado con sus necesidades energéticas relacionadas con su importante

potencial reproductivo. Así, la búsqueda de zonas de alta productividad podría incrementar el desplazamiento de hembras incluso de una zona de crianza a otra espacialmente lejana.

Otra respuesta a esta divergencia observada entre marcadores puede deberse a los tamaños poblacional que reflejan los marcadores. Cada marcador permite una inferencia diferente del tamaño poblacional por las características propias de cada uno, y una última explicación es debido a las diferenciación en las tasas mutacionales de los marcadores, ya que la del análisis del fragmento de la región control de mtDNA, es menor que la observada en microsátélites, lo que proporciona dos panorámicas en diferentes tiempos evolutivos.

## **EXPANSIÓN POBLACIONAL**

Procesos climáticos históricos como los ciclos glaciales-interglaciales ocurridos durante el Pleistoceno (el último ocurrido hace menos de 18,000 años), han producido cambios en el sentido y dirección de las corrientes oceánicas, así como modificaciones tanto en la temperatura superficial del agua como en el nivel del mar (Alvarado-Bremer *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2006; Viñas *et al.*, 2004), lo que ha derivado en procesos de extinción-recolonización y/o expansión de las poblaciones (Grant y Bowen, 1998). Esto ha tenido una importante influencia en los patrones de divergencia genética de las poblaciones en especies pelágicas (Rohfritsch y Borsa, 2005; González *et al.*, 2008).

En el presente estudio, la distribución del número de diferencias nucleotídicas de las secuencias del mtDNA en las localidades de NAY y MICH son congruentes con un proceso de crecimiento poblacional histórico (Figura 23). En el mismo sentido, los parámetros de demografía histórica y las pruebas de neutralidad fueron consistentes con el modelo de expansión súbita propuesto por Rogers y Harpending (1992, Tabla 13 y 14), proceso que se ha documentado que repercute en la composición genética actual de las poblaciones (Liu *et al.*, 2006; Lecomte *et al.*, 2004). De esta forma es probable que los procesos de expansión poblacional observados mediante el mtDNA en las localidades de la región central del Pacífico mexicano, oculten la señal de

divergencia que fue observada mediante los análisis de microsatélites, principalmente en las localidades de SIN y NAY.

Lo anterior resulta consistente con una expansión espacial de las poblaciones del sur hacia el norte mediante un patrón de colonización gradual. En el Pacífico mexicano se observó mediante datos de mtDNA, una disminución de diversidad genética y bajos niveles de diversidad nucleotídica hacia los polos que pueden estar asociados a estos eventos de glaciación, como se ha observado en algunos otros peces pelágicos de distribución cosmopolita (Grant y Bowen, 1998).

El crecimiento poblacional y la expansión espacial registrados mediante los parámetros de expansión demográfica y análisis de distribución de diferencias nucleotídicas en las localidades de NAY y MICH (Figura 23), pudieron ser respuesta tanto de fluctuaciones del nivel del mar como cambios de la de la temperatura superficial del agua en el Pacífico oriental, permitiendo un mayor desplazamiento y nuevas zonas de alimentación, como ha sido observado en diversas especies pelágicas, (Rohfritsch y Borsa, 2005; González *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2006; Lecomte *et al.*, 2004).

Las estimaciones de los parámetro demográficos muestran eventos importantes en la demografía histórica de *S. lewini*, especialmente en las localidades del centro del Pacífico mexicano y presentan señales de un proceso de expansión que, de acuerdo a la estimación del tiempo en que ocurrió este proceso, podría estar relacionada con eventos geológicos durante los periodos interglaciares, ocurridos hace 450,000 - 350,000 años. Se ha sugerido que durante los ciclos glaciales-interglaciales del Pleistoceno ocurrieron cambios significativos en los procesos oceanográficos, tales como el incremento en la temperatura de las aguas superficiales, el aumento en la concentración de nutrientes y fluctuaciones del nivel del mar (Andreasen y Ravelo, 1997; Cannariato y Ravelo, 1997; Roy *et al.*, 1996).

Los factores anteriores pudieron haber producido fluctuaciones y modificaciones durante los periodos glaciales-interglaciales en la estructura de las comunidades marinas, lo cual se ha visto reflejado en la historia de vida de algunos organismos marinos, como la reducción y expansión demográfica histórica de las poblaciones (Hewitt, 1996; Díaz-Jaimes *et al.*, 2006). Los posibles eventos geológicos

y cambios oceanográficos ocurridos en el Pacífico oriental, pudieron originar procesos de recolonización e incremento poblacional para *S. lewini*, permitiendo la ocupación de nichos vacíos, en regiones oceanográficas con el incremento en el número y/o amplitud de las zonas de surgencias o de alta productividad.

Los resultados obtenidos mediante ambos marcadores que por sus características, frecuentemente muestran panoramas diferentes al emitir señales de divergencia distintas cuando son estudiados de manera simultánea (Buonacorssi *et al.*, 2001). De esta manera, los resultados en el presente estudio mostraron claramente dos esquemas de estructura genética, los cuales pueden reflejar distintos tiempos evolutivos, y mediante una interpretación conjunta, pueden ayudar a comprender la situación actual de las poblaciones de esta especie para formular estrategias de administración y conservación adecuadas para el Pacífico mexicano y el Golfo de México.

Estos resultados sugieren que localidades de la zona norte (BC y BCS) y central del Pacífico mexicano (SIN y NAY) representan entidades poblacionales genéticamente discretas y por ello las estrategias de administración deben tener en consideración que su explotación debe realizarse mesuradamente. Asimismo, debe considerarse que cuotas elevadas de captura en las regiones norte y sur del Pacífico mexicano podrían implicar una disminución en el tamaño de sus poblaciones, lo cual sería particularmente serio si afectan a aquellas cohortes de *S. lewini* formadas principalmente por juveniles y hembras, que son frecuentes en el Golfo de Tehuantepec, y que son organismos que pueden dispersarse a otras regiones, contribuyendo a mantener el flujo genético entre localidades al exterior de la región central del Pacífico mexicano.

## CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos mediante el análisis tanto de un fragmento de la región control como de microsatélites muestran panoramas diferentes por las distintas tasas de mutación de cada uno, que muestran dos esquemas de estructuras genéticas, los cuales son reflejo de distintos tiempos evolutivos.
- Los niveles de diversidad observados mediante los dos diferentes marcadores analizados corresponden a valores similares a los observados en otros estudios tanto en otras especies de tiburones como en *Sphyrna lewini*.
- Se observó una divergencia significativa para las muestras entre ambas cuencas oceánicas.
- Se observó la evidencia de un flujo genético ancestral gracias al haplotipo “E” compartido entre ambas cuencas oceánicas, el cual corresponde a un tiempo de divergencia de 3.6 millones de años, tiempo anterior al cierre del Istmo de Panamá (3.5 ma).
- Los resultados sugieren que las estrategias de administración para la zona central del Pacífico mexicano, deben tomar en consideración que las localidades de SIN y NAY representan una entidad poblacional genética independiente, que el flujo genético reciente hacia estas poblaciones ha declinado y la cantidad de migrantes hacia el exterior de esta región continua con niveles similares a los históricos.
- Las localidades del norte (BC y BCS) y del centro (SIN y NAY) del Pacífico mexicano pueden representar unidades poblacionales genéticamente diferenciadas, lo que debe ser considerado en el diseño de las estrategias de manejo para su explotación.
- Basados en la presencia de poblaciones con alta diversidad y divergencia genética, las zonas de la boca del Golfo de California y el Golfo de Tehuantepec podrían ser consideradas como reservorios de diversidad genética, ya que ambas regiones, que han sido reconocidas como sitios de alimentación y reproducción, fomentan que organismos provenientes de diferentes poblaciones allí residan.

## ● REFERENCIAS

- Alejo-Plata M.C., Cerdenares G.L.G., González G.M., 2006a. La pesca de tiburón en la costa chica de Oaxaca, México, 2000-2003, in: Salas S., Cabrera M.A., Ramos J., Flores D., Sánchez J. (Eds), Memorias Primera Conferencia de Pesquerías Costeras en Latinoamérica y el Caribe. Evaluando, Manejando y Balanceando Acciones, EPOMEX, México, pp. 22-38.
- Alejo-Plata M.C., Ramos S.C., Cruz J.L.R., 2006b. La pesquería artesanal del tiburón en Salina Cruz, Oaxaca, México. *Ciencia y Mar*. 30, 37-51.
- Alvarado-Bremer J.R., Vinas J., Mejuto J., Ely B., Pla C., 2005 Comparative phylogeography of Atlantic bluefin tuna and swordfish: the combined effects of vicariance, secondary contact, introgression, and population expansion on the regional phylogenies of two highly migratory pelagic fishes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 36, 169-187.
- Andreasen D.J, Ravelo A.C., 1997. Tropical Pacific Ocean thermocline depth reconstructions for the last glacial maxima. *Paleoceanography*. 12, 395-413.
- Anislado T.V., 2008. Demografía y pesquería del tiburón martillo, *Sphyrna lewini*, (Griffith y Smith, 1834) (Pisces: Elasmobranchii) en dos provincias oceanográficas del Pacífico mexicano. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México. 252 pp.
- 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.
- Aguilar-Castro N., 2003. Ecología trófica de juveniles del tiburón martillo *Sphyrna lewini* (Griffith y Smith, 1834) en el Golfo de California. Tesis de Maestría CICIMARIPN, La Paz. 121 pp.
- Avise J.C., 2004. Molecular markers, natural history and evolution. Sunderland, Massachusetts. 684p.
- Avise J.C., 2000. Phylogeography: The history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts USA.
- Avise J.C., 2008. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, 36, 3–15.

- Badan A., 1997. La corriente costanera de Costa Rica en el Pacífico Mexicano. In F.M. Lavín (ed) Contribuciones a la oceanografía física en México. CONACYT, México D.F. p. 99-113.
- Bagma J.L. and Haedrich R.L., 2008. Distinctiveness of the mesopelagic fish fauna in the Gulf of Mexico. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography. 55, 2594-2596.
- Balloux F. and Lugon-Moulin N., 2002. Population structuring and microsatellites: The estimation of population differentiation with microsatellites markers. Molecular Ecology. 11, 155-165.
- Beerli P., 2002. MIGRATE documentation. Version 1.6. <http://evolution.genetics.washington.edu/lamarc/migrate.html>.
- Beerli P. and Felsenstein J., 2001. Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. Proceedings of the National Academy Science USA. 98, 4563-4568.
- Bernal G., Ripa P., Herguera J.C. 2001. Variabilidad oceanográfica y climática en el Golfo de California, México. Ciencias Marinas. 27(4), 595-617.
- Bizzarro J., Smith W., Hueter R., Tyminski J., Márquez-Farías J.F., Castillo-Géniz J.L., Cailliet G.M., Villavicencio-Garayzar C.J., 2007. The status of shark and ray fishery resources in the Gulf of California: Applied research to improve management and conservation. Report to the David and Lucille Packard Foundation. 237 pp.
- Bowen B.W., Bass A.L., Soares L., Toonen R.J., 2005. Conservation implications of complex population structure: lessons from the loggerhead turtle (*Caretta caretta*). Molecular Ecology. 14, 2389-2402.
- Buonaccorsi V.P, Starkey E., Graves J.E., 2001. Mitochondrial and nuclear DNA analysis of population subdivision among young-of-the-year Spanish mackerel (*Scomberomorus maculatus*) from the western Atlantic and Gulf of Mexico. Marine Biology. 138, 37-45.
- Cannariato K.G. and Ravelo A.C., 1997. Pliocene-Pleistocene evolution of eastern tropical Pacific surface water circulation and thermocline depth. Paleoceanography. 12, 805-820.

- Carrera R., 1991. The sharks of Uruguay: identification and biological aspects. Serie de Divulgacion. 3, 103.
- Carvalho G.R. and Hauser L., 1994. Molecular genetics and the stock concept in fisheries. Reviews in Fish Biology and Fisheries. 4, 326-350.
- Caso M. E. 1979. Centro. Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma México. Los Equinodermos (asteroidea, Ophiuroidea y Echinoidea) de la laguna de Términos, Campeche. , Publ. esp. 1-186. 3:
- Cervigón F., Cipriani R., Fischer W., Garibaldi L., Hendrickx M., Lemus A.J., Marquez R., Poutiers J.M., Robaina G., 1992. FAO species identification sheets for fishery purposes. Field guide to the commercial marine and brackish water species of the northern coast of South America. FAO, Rome (Italy) 513 pp.
- Clement M., Posada D., Crandall K., 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. Molecular Ecology. 9: 10, 1657-1660
- Compagno L.J.V., 1984. 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 Symposium. 125:4 part. 2, 665p.
- Compagno L.J.V., 1988. Shark of the order Carcharhiniformes. Princeton University Press, Princeton. 489pp.
- 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.
- Compagno L.J.V., Krupp F., Schneider W., 1995. Tiburones. En: Fisher W, F Krupp, W Schneider, C Somer, KE Carpenter & VH Niem (eds). Guía FAO para la identificación de especies para los fines de pesca. Pacífico Centro-Oriental, 2: 648-743. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma.
- CONAPESCA (Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca) 2008. Anuario estadístico de acuicultura y pesca 2005. México, D.F.
- Corro-Espinosa D., 1997. Análisis preliminar de la pesquería artesanal de tiburones en el norte de Nayarit y sur de Sinaloa. CRIP-Mazatlán. Informe Técnico del Instituto Nacional de la Pesca (inédito).

- Creste S.A., Tulmann N., Figeira A., 2001. Detection of Single Sequence Repeat Polymorphisms in Denaturing Polyacrylamide Sequencing Gels by Silver Staining. *Plant Molecular Biology reporter*. 19, 299-306.
- Cromwell T. and Bennett E.B., 1959. Surface drift charts for the eastern tropical Pacific Ocean. *Bull Inter-America. Tropical Tuna Commission*. 3, 217-237.
- Chapuis M.P. and Estoup A., 2007. Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Molecular Biology and Evolution*. 24: 3, 621-631.
- Chakraborty R., 1990. Mitochondrial DNA polymorphism reveals hidden hererogeneity within some Asian population. *American Journal of Human Genetics*. 47, 87-94.
- Chakraborty R. and Weiss K.M., 1991. Genetic variation of the mitochondrial DNA genome in American Indians is at mutation-drift equilibrium. *American Journal Human Genetic*. 86, 497-506.
- Chakraborty R., Kimmel M., Stivers D.N., Davison L.J., Deka R., 1997. Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite *loci*. *Proceedings of the National Academy Science USA*. 94, 1041-1046.
- Chen C.T., Leu T.C., Joung S.J., Lo N.C.H., 1990. Age and growth of the scalloped hammerhead, *Sphyrna lewini*, in northeastern Taiwan waters. *Pacific Science*. 44: 2, 156-170.
- Díaz-Jaimes P., Uribe-Alcocer M., Ortega-García S., Durand J.D., 2006. Spatial and temporal mitochondrial DNA genetic homogeneity of dolphinfish populations (*Coryphaena hippurus*) in the eastern central Pacific. *Fisheries Research*. 80, 333-338.
- Domeier M.L., 2006. An analysis of pacific striped marlin (*Tetrapturus audax*) horizontal movement patterns using pop-up satellite archival tags. *Bulletin of Marine Science*. 79: 3, 811-825.
- Domeier M.L., Kiefer D., Nasby-Lucas N., Wagschal A., O'Brien F., 2005. Tracking Pacific bluefin tuna (*Thunnus thynnus orientalis*) in the northeastern Pacific with an automated algorithm that estimates latitude by matching sea-surface temperature data from satellites with temperature data from tags on fish. *Fishery Bulletin*. 103, 292-306.

- Donaldson K.A. and Wilson R.R., 1999. Amphi-Panamaic geminates of snook (Percoidei: Centropomidae) provide a calibration of the divergence rates in the mitochondrial DNA control region of fishes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 13, 208-213.
- Drummond AJ, Rambaut A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analyses by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7, 214.
- Dulvy N.K. and Reynolds J.D. 2002. Predicting extinction vulnerability in skates. *Conservation Biology*, 16(2), 440–450.
- Duncan K.M. and Holland K.N., 2006. Habitat use, growth rates and dispersal patterns of juvenile scalloped hammerhead sharks (*Sphyrna lewini*) in a nursery habitat. *Marine Ecology Progress Series*.
- Duncan K.M., Martin A.P., Bowen B.W., De Couet H.G., 2006. Global phylogeography of the scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*). *Molecular Ecology*. 15, 2239-2251.
- Estoup A., Cornuet, J.M., 1999. Microsatellite evolution: inferences from population data, in: Goldstein, D., Schlotterer, C. (Eds.). *Microsatellites Evolution and Applications*. Cap. 5. Oxford University Press, New York, pp.49-65.
- Estoup A., Jarne P., Cornuet J.M., 2002. Homoplasy and mutation model at microsatellite *loci* and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology*. 11, 1591-1604.
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*. 14, 2611-2620.
- Ewens W.J., 1972. The sampling theory of selectively neutral alleles, *Theor. Pop. Biol.* 3, 87-112.
- Excoffier L., Laval G., Schneider S., 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*. 1, 47-50.
- 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.

- FAO (2008) El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2008. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación Roma.
- Falush D., Stephens M., Pritchard J.K. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked *loci* and correlated allele frequencies. *Genetics* 164, 1567-1587.
  - Farías V.V., Rolim L.S., Vaz L.A.L., Furtado-Neto M.A.A. 2012. Reevaluation of RAPD markers involved in a case of stingray misidentification (*Dasyatis*: *Dasyatis*). *Genetics and Molecular. Research*. 11 (4): 3835-3845.
  - Feldheim K.A., Gruber S.H., Ashley M.V., 2001. Population genetic structure of the lemon shark (*Negaprion brevirostris*) in the western Atlantic: DNA microsatellite variation. *Molecular Ecology*. 10, 295-303
  - Fiedler P.C., 1992. Seasonal climatologies and variability of eastern tropical pacific surface waters U.S. Nat. Mar. Fish. Serv., Tech. Rep. 109, 1-65.
  - Fontaine M., Baird S., Piry S., Ray N., Tolley K., Duke S., Birkun A., Ferreira M., Jauniaux T., Llavona A., Öztürk B., Öztürk A.A., Ridoux V., Rogan E., Sequeira M., Siebert U., Vikingsson G., Bouquegneau J.M., Michaux J., 2007. Rise of oceanographic barriers in continuous populations of a cetacean: the genetic structure of harbour porpoises in Old World waters. *BMC Biology*. 5: 1, 30.
  - Fu Y-X., 1997. Statistical tests of neutrality of mutation against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*. 147, 915-925.
  - Gaggiotti O.E. and Excoffier L., 2000. A simple method of removing the effect of a bottleneck and unequal population sizes on pairwise genetic distances. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*. 267, 81-87.
  - Gaida H.I., 1997. Population structure of the Pacific abigel shark, *Squatina californica* (Squatiniformes: Squatinidae), around the California Channel Islands. *Copeia*. 4, 738-744.
  - Grant S., 2006. Managing small-scale fisheries in the Caribbean: the surface longline fishery in Gouyave, Grenada. PhD thesis. University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada. p. 255.

- Grant W.S. and Bowen B.W., 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *J. Hered.* 89, 415-425.
- Gold J.R. and Richardson L.R., 1998. Mitochondrial DNA diversification and population structure in fishes from the Gulf of Mexico and western Atlantic. *J. Hered.* 89, 404-414.
- Goldstein D.B. and Schlotterer Ch., 1999. *Microsatellites: evolution and applications.* Oxford, New York. Oxford University Press. 352p.
- Gonzalez E.G., Beerli P., Zardoya R., 2008. Genetic structuring and migration patterns of Atlantic bigeye tuna, *Thunnus obesus* (Lowe, 1839). *BMC Evolutionary Biology.* 8, 252-265.
- Goudet J., 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Updated from Goudet (1995).
- Guo S.W. and Thompson E.A., 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics.* 48, 361-372.
- Hall T., 2004. BioEdit Sequence Alignment Editor, version 7 Copyright 1997-2004.
- Harpending R.C., 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology.* 66, 591-600.
- Heather M.G., Olson D.B., Palumbi S.R., 2006. Seascape Genetics: A Coupled Oceanographic-Genetic Model Predicts Population Structure of Caribbean Corals. *Current Biology.* 16, 1622-1626.
- Hedrick P.W., 2000. *Genetics of population.* 2a ed. Jones and Bartlett Publishers Sudbury Massachusetts.
- Heist E.J., 1999. A review of population genetics in sharks. *American Fisheries Society Symposium.* 23, 139-146.
- Heist E.J., 2005. Population and reproductive genetics in Chondrichthyes. Chapter 2 *in* *Reproductive biology and phylogeny of Chondrichthyes: Sharks, Skates, Stingrays, and Chimaeras.* (Hamlett, W. C. ed.). Science publishers Inc. Plymouth, UK.

- Heist E.J., Graves J.E., Musick J.A., 1995. Population genetics of the sandbar shark (*Carcharhinus plumbeus*) in U.S. coastal waters. *Copeia*. 555-562.
- Heist E.J., Musick J.A., 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., 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. and Gold J.R., 1999. Microsatellite DNA variation in sandbar sharks (*Carcharhinus plumbeus*) from the Gulf of Mexico and mid-Atlantic Bight. *Copeia*. 182-186.
- 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.
- Hewitt G.M., 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*. 58, 247-276.
- Hudson R.R., 2000. A new statistic of detecting genetic differentiation. *Genetics*. 155, 2001-2014.
- Hueter R.E., Huelgel M.R., Heist E.J., Keeney D.B., 2005. The implications of philopatry in sharks for the management of shark fisheries. *NAFO Journal*. 35, 239-247.
- Hueter R.E. and Manire C.A., 1994. Bycatch and catch-release mortality of small sharks in the Gulf coast nursery grounds of Tampa Bay and Charlotte Harbor. *Mote Mar. Lab. Tech. Rpt.* 368, 1-183.
- Hutchings L., Pitcher G.C., Probyn T.A., Bailey G.W., 1995. The chemical and biological consequences of coastal upwelling in the Ocean: Modern Processes and Ancient Records. En: Summerhayes CP, Emies K, Angel MV, Smith RL, Zeitzshel RL (eds.), *Upwelling in the Ocean*.

- INP, Instituto Nacional de Pesca, 1996. Pesquerías relevantes de México 1962-1992. Tomo 1. Secretaria del medio ambiente, recursos naturales y pesca.
- IUCN, 2010. IUCN Red List of Threatened Species 2010. Version 2010.2. . Downloaded in August 2010.
- Jorgensen S.J., Klimley A.P.; Muhlia-Melo A.F., 2009. Scalloped hammerhead shark *Sphyrna lewini*, utilizes deep-water, hypoxic zone in the Gulf of California. *Journal of Fish Biology*. 74, 1682-1687.
- Keeney D.B. and Heist E.J., 2003. Characterization of microsatellite *loci* isolated from the blacktip shark and their utility in requiem and hammerhead sharks. *Molecular Ecology Notes*. 3, 501-504.
- Keeney D.B., Heupel M., Hueter R.E., Heist E.J., 2003. Genetic heterogeneity among blacktip shark, *Carcharhinus limbatus*, continental nurseries along the U.S. Atlantic and Gulf of Mexico. *Marine Biology*. 143, 1039-1046.
- Keeney D.B. and Heist E.J., 2006. Worldwide phylogeography of the blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) inferred from control region sequences. *Molecular Ecology*. 15, 3669-3679.
- Keeney D.B., Heupel M.R., Hueter R.E., Heist E.J., 2005. Microsatellite and mitochondrial DNA analyses of the genetic structure of blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) nurseries in the northwestern Atlantic, Gulf of Mexico, and Caribbean Sea. *Molecular Ecology*. 14, 1911-1923.
- Klanten O.S., Choat J.H., Herwerden L., 2007. Extreme genetic diversity and temporal rather than spatial partitioning in a widely distributed coral reef Wsh. *Mar. Biol*. 150, 659-670.
- Klimley A.P., 2003. *The secret life of sharks*. Simon and Schuster, Rockefeller Center, New York, NY. 292p.
- Klimley, A. P. 1987. The determinants of sexual segregation in the scalloped hammerhead shark, *Sphyrna lewini*. *Enviro. Biol. Fish*. 18:27-40.
- Klimley A.P., Richert J.E., Jorgensen S. J., 2005. The home of blue water fish. *American Scientist*. 93, 42-49.

- Kohler N.E. and Turner P.A., 2001. Shark tagging: a review of conventional methods and studies. *Env Biol Fish.* 60,191-223.
- Kumar S., Tamura K., Jakobsen I.B., Nei M., 2004. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) versión 3.1
- Laird P.W., Zijderveld A., Linders K., Rudnicki M.A., Jaenisch R., Berns A., 1991. Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res.* 19, 4293.
- Lanteri A. and Confalonieri V., 2003. Filogeografía: objetivos, métodos y ejemplos. In: Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía: 185–194 (J. J. Morrone & J. Llorente, Eds.). CONABIO, México.
- Lavery S. and 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.
- Lea R.N. and Rosenblatt R.H., 2000. Observations on fishes associated with the 1997-98 El Niño off California. *CalCOFI. M. E. Blochii, Systema Ichthyologiae.* v. 41, 117-129.
- Lecomte F., Grant W.S., Dodson J.J., Rodriguez-Sanchez R., Bowen B.W., 2004. Living with uncertainty: genetic imprints of climate shifts in East Pacific anchovy (*Engraulis mordax*) and sardine (*Sardinops sagax*). *Molecular Ecology.* 13, 2169-2182.
- Lenarz H.A., Ventresca M., Graham B., Schwing F., Chavez F., 1995. Explorations of El Niño events and associated biological population dynamics off Central California. *California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports.* 36, 106-119.
- Lessa E.P. and Applebaum G., 1993. Screening techniques for detecting allelic variation in DNA sequences. *Molecular Ecology.* 2, 119-129.
- Lim D.D., Motta P., Mara K., Martin A.P., 2010. Phylogeny of hammerhead shark (Family Sphyrnidae) inferred from mitochondrial and nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 55, 572-579.
- Liu J.X., Gao T.X., Zhuang Z.M., Jin X.S., Yokogawa K., Zhang Y.P., 2006a. Late Pleistocene divergence and subsequent population expansion of two closely related Wsh species, Japanese anchovy (*Engraulis japonicus*) and Australian

- anchovy (*Engraulis australis*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 40, 712-723.
- Liu J.X., Gao T.X., Zhuang Z.M., Jin X.S., Yokogawa K., Zhang Y.P., 2006b. Differential population structuring and demographic history of two closely related Wsh species, Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) and spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*) in Northwestern Pacific. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 39, 799-811.
  - Márquez-Farías J.F., 2001. Tiburones del Golfo de California. En: Cisneros Mata, M. A. y A. J. Díaz de León (eds.), *Sustentabilidad y Pesca responsable en México, 1999-2000*. Instituto Nacional de la Pesca-SAGARPA.
  - 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., Palumbi S.R., 1992. Rates of mitochondrial DNA evolution in sharks are slow compared with mammals. *Nature*. 357, 153-155.
  - Martínez P., Gonzalez E.G., Castilho R., Zardoya R., 2006. Genetic diversity and historical demography of Atlantic bigeye tuna (*Thunnus obesus*). *Mol Phylog Evol*. 39, 404-416
  - Mendizábal O.D., Vélez-Marín R., Soriano-Velásquez S., González-Ania L.V., 2001. Tiburones oceánicos del Pacífico mexicano. En: Cisneros Mata, M. A y A. J. Díaz de León (eds.), *Sustentabilidad y Pesca Responsable en México, 1999-2000*. Instituto Nacional de la Pesca-SAGARPA.
  - Mendonça F.F., Hashimoto D.T., Porto-Foresti F., Oliveira C., Gadig O.B.F., Foresti F., 2009. Identification of the shark species *Rhizoprionodon lalandii* and *R. porosus* (Elasmobranchii, Carcharhinidae) by multiplex PCR and PCR-RFLP techniques. *Molecular Ecology Resources*. 9, 771-773.
  - Merino M. and Monreal A, 2004. Ocean Currents and their impact on marine life. En *Marine Ecology*. Editado por Duarte C.M. *Encyclopedia of life support systems (EOLSS)*. Desarrollo bajo al auspicio de la UNESCO, EOLSS Publishers, Oxford, UK

- Miller M., 1999. Tools for population genetic analyses (TFPGA) versión 1.3. A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author.
- Molina C.A. 1986. Evolución oceanográfica de la boca del Golfo de California. Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Vol. 2. Artículo 219.
- Moritz C. 1994. Defining "Evolutionary Significant Units" for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*.
- Nance H.A., Klimley P., Galvan-Magaña F., Martínez-Ortiz J., Marko P.B. 2011. Demographic processes underlying subtle patterns of population structure in the scalloped hammerhead shark, *Sphyrna lewini*. Plos One. 6, 21459-21459.
- Nei M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 89, 583-590.
- Van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P., 2004. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*. 4, 535-538.
- Orita M., Iwahana H., Kanasawa H., Hayashi K., Sekita T., 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation.
- Ovenden J. R., Kashiwagi T., Broderick D., Giles J., Salini J. 2009. The extent of population genetic subdivision differs among four co-distributed shark species in the Indo-Australian archipelago. *BMC Evolutionary Biology*. 9:40.
- Palsbøll P. J., Be´rube M., Allendorf F.W. 2007. Identification of management units using population genetic data. *TRENDS in Ecology and Evolution* 22(1) 11-16.
- Palumbi S.R., 1994. Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 25, 547-572.
- Palumbi S.R., 2004. Marine reserves and Ocean neighborhoods: The spatial scale of marine populations and their management. *Annual Review of Environment and Resources*. 29, 31-68.

- Palumbi S.R. and Hedgecock D., 2005. The life of the sea: Implications of marine population biology to conservation policy. In Marine conservation biology: The science of maintaining the sea's biodiversity, E.A. Norse and L.B. Crowder, eds. (Washington, D.C.: Island Press), pp. 33-46.
- Pank M., Stanhope M., Natanson L., Kohler N., 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.
- Pereyra S., García G., Miller P., Oviedo S., Domingo A. 2010. Low genetic diversity and population structure of the narrownose shark (*Mustelus schmitti*). Fisheries Research 106, 468–473.
- Posada D. and Crandall K.A., 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics. 14, 817-818.
- Pritchard J.K., Stephens P., Donnelly P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics. 155, 945-959.
- Quinn W.H., 1974. Monitoring and predicting El Niño invasions. Journal Appl. Metodology. 13, 825-830.
- Ray N., Currat M., Excoffier L. 2003. Intra-Deme Molecular Diversity in Spatially Expanding Populations. Molecular Biology Evolution 20(1), 76-86.
- Ryman N. and Palm S., 2006. POWSIM: a computer program for assessing statistical power when testing for genetic differentiation. Molecular Ecology Notes. 6, 600-602
- Raymond M. and Rousset F., 1995. GENEPOP version 1.2. Population genetics software for exact test and ecumenicism. Journal of Heredity. 86, 248–249.
- Reynolds J., Weir B.S., Cockerham C.C., 1983. Estimation for the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. Genetics. 105, 767-779.
- Rice W.R., 1989. Analyzing tables of statistical test. Evolution. 43, 223-225.
- Robinson M.K., 1973. Atlas of Monthly Mean Sea Surface and Subsurface Temperatures in the Gulf of California, Mexico. Society of Natural History, San Diego, Cal., Memoir 5, 19 p.

- Rogers A.R. and Harpending H., 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* 9, 552-569.
- Rohfritsch A. and Borsa P., 2005. Genetic structure of Indian scad mackerel *Decapterus russelli*: Pleistocene vicariance and secondary contact in the Central Indo-West Pacific Seas. *Heredity*. 95, 315–326.
- Rousset F., 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resources*. 8, 103-106.
- Roy K., Valentine J.W., Jablonski D., Kidwell S., 1996. Scales of climatic variability and time averaging in Pleistocene biotas: implications for ecology and evolution. *TREE*. 11, 458-463.
- Rozas J., Sánchez-Del Barrio J.C., Messeguer X., Rozas R., 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19, 2496-2497.
- Ryder O. A., 1986. Species conservation and systematic: the dilemma of subspecies. *Trends in Ecology and Evolution*. 1: 9–10.
- SAGARPA, Secretaría 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.
- Salas-Pérez J.J. and Granados-Barba., 2008. Oceanographic Characterization of the Veracruz reefs system. *Atmosfera*. 21: 3, 281-301.
- Santana-Hernández H., 1997. Relación del éxito de la pesca palangrera con la temperatura superficial y la profundidad en el Pacífico Mexicano. Tesis de Maestría. Fac. de Ciencias, UNAM, México.
- Shane M., 2001. Records of Mexican Barracuda, *Sphyræna ensis*, and Scalloped Hammerhead, *Sphyrna lewini*, from Southern California Associated with Elevated Water Temperatures. *Bulletin (Southern California Academy of Sciences)*. 100(3).
- Saavedra-Sotelo N.C., Calderon-Aguilera L.E., Reyes-Bonilla H., López-Pérez R.A., Medina-Rosas P., Rocha-Olivares A., 2011. Limited genetic connectivity of *Pavona gigantea* in the Mexican Pacific. *Coral Reefs*, report.

- Salomón-Aguilar C.A., Villavicencio-Garayzar C.F., Reyes-Bonilla H., 2009. Shark breeding grounds and seasons in the Gulf of California: Fishery management and conservation strategy. *Ciencias Marinas*. 35, 369-388.
- Saucedo C.J.B., Colado G., Martínez J.G., Burgos S., Chacon J.G., Espinoza J., 1982. Contribución al estudio de la pesquería del tiburón en la zona del estado de Sinaloa. Memoria de Servicio Social, Escuela de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa, México, pp. 60.
- Schultz J.K., Feldheim K.A., Gruber S.H., Ashley M.V., McGovern T.M., Bowen B.W., 2008. Global phylogeography and seascape genetics of the lemon sharks (genus *Negaprion*). *Molecular Ecology*. 17, 5336-5348.
- 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.
- Slatkin M., 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution*. 47, 264-279.
- Slatkin M., 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*. 139, 457-462.
- Slatkin M., 1996. A correction to the exact test based on the Ewens sampling distribution. *Genet Res*. 68, 259-260.
- Sleator R.D., Shortall C., Hill C. 2008. Metagenomics. *Letters in Applied Microbiology* ISSN 0266-8254.
- Soriano-Velásquez S.R., A. Solís-Nava C. Ramírez-Santiago A. Cid del Prado-Vera y J.L. Castillo G., 2001. Tiburones del Golfo de Tehuantepec. *En: Cisneros Mata, M. A y A. J. Díaz de León (eds.). Sustentabilidad y Pesca Responsable en México, 1999-2000*. Instituto Nacional de la Pesca. SAGARPA.
- Stevens J.D., Bonfil R., Dulvy N.K. and Walker P.A. 2000. The effects of fishing on sharks, rays, and chimaeras (chondrichthyans), and the implications for marine ecosystems. *ICES Journal of Marine Science*, 57, 476 – 494.
- Stevens, J. D. and J. M. Lyle. 1989. Biology of three hammerhead sharks (*Eusphyra blochii*, *Sphyrna mokarran*, and *S. lewini*) from Northern Australia. *Aust. J. Freshwater Res.* 40:129-146.

- Stoner D.S., Grady J.M., Priede K.A., Quattro J.M., 2003. Amplification primers for the mitochondrial control region and sixth intro of nuclear-encoded lactate dehydrogenase A gene in elasmobranch fishes. *Conservation Genetics*. 4, 805-808.
- Stow A, Zenger K., Briscoe D., Gillings M., Peddemors V., Otway N., Harcourt R. 2006 Isolation and genetic diversity of endangered grey nurse shark (*Carcharias taurus*) populations. *Biology Letters*. 2, 308–311.
- Sunnucks P., Wilson A.C.C., Beheregaray L.B., Zenger K., French J., 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.
- Swofford D.L., 1991. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Version 3.1 Computer program distributed by the Illinois Natural History Survey, Champaign, Illinois.
- Tajima F., 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite population. *Genetics*. 105, 437-460.
- Tajima F., 1996. The amount of DNA polymorphism maintained in a finite population when the neutral mutation rate varies among sites. *Genetics*. 143, 1457-1465.
- Tamura K. and Nei M., 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.
- Tomczak M. and Godfrey, 1994. *Regional Oceanography: an Introduction*. 2da ed. Daya publishing House. Nueva Delhi, India Pp. 390.
- Trasviña A., Lluch C.D., Filonov A.E., Gallegos A. 2004. Oceanografía y El Niño. Capítulo 3. En: Magaña Rueda Víctor (Editor). *Los impactos del niño en México*. Centro de Ciencias de la Atmósfera, Universidad Nacional Autónoma de México, Secretaría de Gobernación. México, 229 p.
- Trenberth K.E., 1997. Definición de El Niño, *Bulletin of the American Meteorological Society*. 78: 12, 2771-2777.

- Tripp-Valdez M.A., García de León F.J., Ortege-García S., Llunch-Cota D., Lopez-Martínez J., Cruz P., 2010. Population genetic structure of dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) in the Gulf of California, using microsatellite *loci*. Fish Res. 105, 172-177.
- Valles-Jimenez R., Cruz P., Perez-Enriquez R., 2005. Population Genetic Structure of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from Mexico to Panama: Microsatellite DNA Variation. Mar Biotech. 6, 475-484.
- Vázquez-Domínguez E.G., 2007. Filogeografía y vertebrados. In: La Ecología molecular de plantas y animales: Cap 15, pp.441–466 (Eguiarte *et al.*, Eds.). INE, México.
- Viñas J., Alvarado Bremer J., Pla C., 2004. Phylogeography of the Atlantic bonito (*Sarda sarda*) in the northern Mediterranean: the combined effects of historical vicariance, population expansion, secondary invasion, and isolation by distance. Mol Phylog Evol. 33, 32-42.
- Waldman J.R., 1999. The importance of comparison studies in stock analysis. Fisheries Research. 43, 237-246.
- Walker T.I., Punt A.E., Taylor B.L., Brown L. 1999. Modelling school shark (*Galeorhinus galeus*) movement in the Southern Shark Fishery. Australian Society for Fish Biology. 160-168.
- Ward R.D., 2000. Genetics in fisheries management. Hydrobiologia. 420, 191-201.
- Ward R.D. and Gardner M.G., 1997. Stock structure and species identification of school and gummy sharks in Australian waters. CSIRO, Hobart, Tasmania.
- Watterson G., 1975. On the number of segregating sites in general models without recombinations. Theor. Popul. Biol. 7, 256-276.
- Weber J.L. and Wong C., 1993. Mutation of human short tandem repeats. Hum Molecular Genetic. 2, 1123-1128.
- Weir B.S. and Cockerham C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution. 38, 1358-1370.
- Wright S., 1943. Isolation by distance. Genetics. 28, 114-138.

- Wright S., 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*. 19, 395-420.
- Wyrski K., 1966. Oceanography of the eastern equatorial Pacific Ocean. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 44, 33-68.
- 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.
- Zárate-Borrego M.E., 1996. La pesquería de tiburones en la Bahía de la Ascensión, Quintana Roo, México (1993-1994), y su importancia como posible área de expulsión y crianza. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias. UNAM. 69 p.
- Zhang D.X. and Hewitt G.M., 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*. 12, 563-584.

## APÉNDICES

### Apéndice A

#### Extracción de DNA con Buffer Chris-Lysis.

- Se tomaron aproximadamente 0.5 cm<sup>3</sup> 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.
- El tejido fragmentado se transfirió a un tubo eppendorf con 500 µL de Buffer Chris-Lysis y 15 µL de proteinasa K (Gibco BRL 25530-015) (20 mg/mL.) para incubarse a 56° C durante tres horas.
- Pasado este tiempo se centrifugó por 10 min. a 8,000 rpm.
- Se decantó el sobrenadante y se agregaron 500 µL de Isopropanol, mezclando suavemente los tubos mediante inversión.
- Se centrifugó nuevamente a 8,000 rpm. durante 5 min. y se observó la formación de un pequeño botón al fondo del tubo.
- Se decantó nuevamente la fase acuosa y se agregaron 150 µL de Etanol absoluto, mezclando suavemente.
- Se centrifugó nuevamente a 8,000 rpm. durante 5 min.
- Transcurrido este tiempo se decantó el alcohol y se dejó secó el botón en una centrífuga de vacío (Vacufuge o concentrador 5301 Eppendorf) a temperatura ambiente de 20 min.
- Finalmente se agregaron 50 µL de solución TE y se almacenó el stock de DNA a una temperatura de -20° C, para su posterior análisis.

## Apéndice B

### Condiciones de amplificación de PCR´s

#### Amplificación de región control mitocondrial

Características de mezcla de PCR, para un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ ..:

- 6.1  $\mu\text{L}$  de  $\text{HO}_2$  bidestilada filtrada con millipore milliex de 0.22  $\mu\text{m}$  y esterilizada.
- 1  $\mu\text{L}$  de Buffer 10 X (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.3 15 mM; Promega M190G).
- 1.6  $\mu\text{L}$  de mezcla de dNTP´s (1.25 mM dATP, dCTP, dGTP y dTTP; Promega U1330).
- 0.4  $\mu\text{L}$  de "iniciador" CB3RL y 0.2  $\mu\text{L}$  de "iniciador" CB6H.
- 0.1  $\mu\text{L}$  de Taq polimerasa, equivalente a 0.5 U/ $\mu\text{L}$  (5 U/ $\mu\text{l}$ . Promega M1665).
- 1.2  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (Promega A351H).
- 0.5 $\mu\text{L}$  de muestra del stock de DNA.

#### Condiciones de PCR

- 4 min. a 94°C.
- 40 ciclos de 1 min. a 94, 1 min. a 52°C y 2 min. a 72°C.
- un ciclo de extensión de 7 min. a 72°C.

### Amplificación de microsatélites

Características de mezcla para PCR, 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.

### Condiciones de PCR

- 4 min. a 95°C.
- 25 ciclos de 1 min. a 95°C, 30 seg. con la temperatura de alineamiento y 30 seg. a 70°C.

Microsatélites amplificados	T°C optima de alineamiento
Cli-12	58° C
Cli-13	49° C
Cli-38	56° C
Cli-39	56° C
Cli-100	58° C
Cli-106	47° C
Cli-112	58°C
Cli-119	58°C

- Un ciclo de extensión de 4 min. a 70°C.

## Apéndice C

### Geles de acrilamida al para SSCP y microsatélites (al 8 y 6% respectivamente).

- Se lavaron y limpiaron los vidrios de electroforesis con agua destilada y después con alcohol.
- Se repitió el procedimiento anterior dos veces más (tres veces en total).
- Se colocó al vidrio al que se pega el gel, 30  $\mu$ l de solución de solución de cianol y ácido acético.
- Se colocó al vidrio que queda libre del gel, 800  $\mu$ l. de sigmacote y se repartió la solución en todo el vidrio y se dejó secar.
- Se colocaron los separadores de 0.05 mm, juntar los vidrios y se colocó en el dispositivo para hacer el gel.
- Se realizó la mezcla para gel de acrilamida:
  - al 8% desnaturalizante (para SSCP's): acrilamida: bisacrilamida (37.5:1) y 5% de glicerol, para un volumen de 55 ml. Se mezcló 10.71 mL de acrilamida al 40%, 5.71 mL de bisacrilamida al 2%, 35.83 mL de TBE 0.5 X y 2.75 mL de glicerol. Se extrajo la mayor cantidad de aire de la mezcla mediante una bomba de vacío durante 15 min. y se agregaron 82.5 mL de TEMED y 82.5 mL de persulfato de amonio al 25% p/v.
  - al 6% no desnaturalizante (para microsatélites)
- Se vació la mezcla entre los dos vidrios evitando que se formen burbujas, dejar gelificar por una hora.
- Se montaron los vidrios en dispositivo de corrimiento, y se realizaron electroforesis con buffer TBE 1X (0.09 M Tris, 0.09 M Ácido bórico y 0.02 M de EDTA).
- Por 24 hrs., para SSCP's,
- por 1 hr. 30 min., para microsatélites.

## Apéndice D

### Protocolo de tinción con Nitrato de Plata.

- Fijación: 10 min. en una solución de ácido acético al 5% y metanol al 50%.
- Lavado: 1 min. en agua milli-Q.
- Sensibilización: 3 min. en una solución de ácido Nítrico al 5% y Metanol al 10%.
- Lavado: 1 min. en agua milli-Q.
- Tinción: 20 min. de Nitrato de Plata al 0.1%.
- Lavado: 1 min. con agua milli-Q.
- Revelado: Solución de carbonato sódico al 2% en formalina (formol al 35%) al 0.04%, a 4°C.
- Fijación: 3 min. en una solución de ácido acético al 5%.

Lavado: 1 min. con agua milli-Q.



## Assessment of the population genetic structure of *Sphyrna lewini* to identify conservation units in the Mexican Pacific

### Evaluación de la estructura genética poblacional de *Sphyrna lewini* para la identificación de unidades de conservación en el Pacífico mexicano

E Castillo-Olguín\*, M Uribe-Alcocer, P Díaz-Jaimes

Laboratorio de Genética de Organismos Acuáticos, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Insurgentes Sur 3000, Coyoacán, Mexico DF, CP 04510, Mexico.

\* Corresponding autor. E-mail: ecoita12@yahoo.com.mx

**ABSTRACT.** Due to the current status of the scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*) as a threatened species, the assessment of genetic diversity, divergence, and demographic parameters of populations in the eastern Pacific Ocean may assist in developing appropriate strategies for sustainable fisheries and species conservation. We analyzed samples collected from 2001 to 2003 from seven locations in the Mexican Pacific Ocean and two in the southwestern Gulf of Mexico, using single-stranded conformation polymorphism of a mitochondrial control region fragment and five microsatellite loci. The mitochondrial data did not show population divergence among locations from the Mexican Pacific Ocean; however, the microsatellite data showed a divergent population in Baja California. Additional differences were also observed between the northern and central locations of the Mexican Pacific. The historical demography analysis revealed spatial expansion events, possibly related to glacial-interglacial cycles that occurred approximately 450,000 years ago. The divergence found should be considered in the formulation of fisheries management and conservation policies of the species in the region.

**Key words:** *Sphyrna lewini*, genetic structure, mtDNA, microsatellites.

**RESUMEN.** Debido a la situación actual del tiburón martillo (*Sphyrna lewini*) como especie amenazada, la evaluación de los niveles de diversidad y divergencia genética, así como de los parámetros demográficos de las poblaciones en el océano Pacífico Oriental, puede ayudar a contribuir a delinear estrategias adecuadas para la pesca sostenible y la conservación de la especie. Se analizaron muestras del periodo 2001–2003 obtenidas de siete localidades en el océano Pacífico mexicano y dos en el sur del golfo de México, mediante la metodología de conformación polimórfica de cadena sencilla de un fragmento de la región control del ADN mitocondrial y el análisis de cinco loci de microsatélites. Los datos mitocondriales no presentaron divergencia entre las localidades del Pacífico mexicano; sin embargo, los datos de microsatélites mostraron una notable divergencia genética de la población de Baja California (BC) con respecto al resto de las localidades analizadas. Similarmente, se encontraron diferencias significativas entre las localidades del norte y centro del Pacífico mexicano. El análisis de la demografía histórica reveló la incidencia de eventos de expansión espacial de las poblaciones, posiblemente relacionados con los ciclos glaciales-interglaciales ocurridos hace aproximadamente 450,000 años. La divergencia encontrada debe ser considerada en la formulación de políticas de gestión de pesca y de conservación de la especie en la región.

**Palabras clave:** *Sphyrna lewini*, estructura genética, ADNmt, microsatélites.

#### INTRODUCTION

Population genetic studies are a valuable tool in defining strategies for fisheries management (Carvalho and Hauser 1994). Ward (2000) reported that exploitation of marine resources may have a high impact on the genetic diversity of populations, altering their overall structure, reducing fecundity, and altering the population size. Sharks are among the 15 major marine fisheries resources of global importance, with catches reaching 736,491 t per year (FAO 2009). The scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*) makes up 31% of the total shark catch in the Mexican Pacific Ocean, and accounts for 10% of the catch in the Gulf of Mexico (SAGARPA 2001). In 1999 the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) considered

#### INTRODUCCIÓN

La evaluación de la estructura genética en las poblaciones explotadas es una herramienta valiosa para definir estrategias de manejo pesquero (Carvalho y Hauser 1994). Ward (2000) afirma que la explotación de los recursos marinos puede tener un alto impacto en la diversidad genética de las poblaciones, al modificar la estructura y dinámica poblacional general y reducir la fecundidad y, en consecuencia, el tamaño poblacional. Los tiburones se encuentran entre los 15 principales recursos pesqueros marinos de importancia mundial, con capturas que llegan a 736,491 t por año (FAO 2009). El tiburón martillo *Sphyrna lewini* representa el 31% de la captura total de tiburones en el océano Pacífico mexicano y el 10% de la captura en el golfo de México (SAGARPA

*S. lewini* to be an abundant and underexploited species; however, the International Union for Conservation of Nature (IUCN) included *S. lewini* in the red list of threatened species (A2bd +4bd) in 2010, implying that current management strategies have not been appropriate.

Recent studies on *S. lewini* have evaluated population divergence, population sizes, gene flow, and demographic processes on a global or regional scale. Duncan *et al.* (2006) conducted a global phylogeographic study of *S. lewini* using mitochondrial DNA (mtDNA) control region sequences. The study revealed a lack of genetic differences between a single sample from the northern Mexican Pacific Ocean and a second sample collected off Panama. Nance *et al.* (2011) determined patterns of historical demographic processes and population structure of *S. lewini* in the eastern Pacific. That study showed significant differences between two localities in the Mexican Pacific and one off Ecuador, and highlighted the occurrence of recent reductions in population size in both areas characterized by a marked impact on populations by commercial fisheries.

*Sphyrna lewini* is considered a semi-oceanic species, showing a strong affinity for coastal regions and islands (Klimley and Butler 1988). In the eastern central Pacific Ocean, *S. lewini* breeding and nursery zones have been identified. In addition, large numbers of newborn and juvenile sharks have been observed at the mouth of the Gulf of California (Salomón-Aguilar *et al.* 2009) and in the Gulf of Tehuantepec, in the southern region of the Mexican Pacific Ocean, where a breeding zone for *S. lewini* has been identified (Alejo-Plata *et al.* 2006a, 2006b). Nonetheless, the population divergence of *S. lewini* has never been evaluated for the two latter regions.

Analyses of population genetic structure based on the use of markers with different evolutionary histories that may allow us to detect divergence signals on historical and contemporary scales are needed to understand the levels of genetic structure, population sizes, and gene flow. The use of nuclear and mitochondrial markers could give primary information about the populations of *S. lewini* in the eastern North Pacific region and contribute to design strategies for species conservation and sustainable fisheries management. For this reason, the levels of genetic diversity from different locations in the Mexican Pacific were assessed using single-stranded conformation polymorphism (SSCP) of the mtDNA control region and microsatellite data. These analyses also allowed us to assess the population genetic structure of *S. lewini*, and to evaluate if the degree of differentiation in the Mexican Pacific Ocean and the Gulf of Mexico found in this study agrees with previous studies (Duncan *et al.* 2006).

## MATERIAL AND METHODS

### Sample collection, DNA isolation, and DNA analysis

Samples of muscle tissue from 176 *S. lewini* juveniles (60 to 130 cm long) were analyzed. The samples were collected

in 2001). En 1999 la Organización para la Alimentación y la Agricultura de las Naciones Unidas (FAO) consideró a *S. lewini* como una especie con alto potencial de explotación por su abundancia; sin embargo, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) la incluyó en la lista de especies amenazadas (A2bd +4bd) en 2010, lo que implica que las estrategias de manejo no han sido las más apropiadas.

Estudios recientes de *S. lewini* han evaluado los niveles de divergencia poblacional y flujo génico, los tamaños poblacionales y los procesos demográficos en diferentes regiones del mundo. Duncan *et al.* (2006) realizaron un estudio sobre la filogeografía global de *S. lewini* usando secuencias de la región control del ADN mitocondrial (ADNmt). El estudio no reveló diferencias genéticas entre una muestra única del norte del océano Pacífico mexicano y una muestra recogida frente a la costa de Panamá. Nance *et al.* (2011) estudiaron los patrones de los procesos demográficos históricos y de la estructura poblacional de *S. lewini* en el Pacífico oriental. El estudio mostró diferencias significativas entre dos localidades del Pacífico mexicano y una procedente de Ecuador, destacando una reciente reducción de los tamaños poblacionales en ambas áreas que se caracterizaron por un fuerte impacto sobre las poblaciones de pesquería comercial.

*S. lewini* es considerada una especie semioceánica que muestra gran afinidad por regiones costeras e islas (Klimley y Butler 1988). En el Pacífico central oriental se han identificado regiones de alumbramiento y crianza de *S. lewini*. Un gran número de neonatos y juveniles han sido observados en la boca del golfo de California (Salomón-Aguilar *et al.* 2009) y en el golfo de Tehuantepec, en la región sur del Pacífico mexicano, donde se ha identificado una zona de alumbramiento de *S. lewini* (Alejo-Plata *et al.* 2006a, 2006b). No obstante, la divergencia poblacional de *S. lewini* no ha sido evaluada en dichas zonas.

El análisis de la estructura genética poblacional que emplea marcadores con diferentes historias evolutivas puede recuperar señales de divergencia a escala tanto histórica como contemporánea, las cuales son necesarias para entender el nivel de estructura genética y flujo génico, así como para realizar estimaciones del tamaño de las poblaciones desde una perspectiva evolutiva. El uso de marcadores nucleares y mitocondriales puede dar información primaria sobre las poblaciones de *S. lewini* en el Pacífico central oriental y contribuir al diseño de estrategias de conservación para lograr la sustentabilidad pesquera de la especie. Por esta razón, los niveles de diversidad genética de diferentes localidades del Pacífico mexicano fueron evaluados usando datos de conformaciones polimórficas de cadena sencilla (SSCP, por sus siglas en inglés) de la región control del ADNmt y de microsatélites. Este análisis también permitió evaluar la estructura genética poblacional de *S. lewini* y comparar si el grado de divergencia poblacional estimado en el Pacífico mexicano y el golfo de México coincide con los documentados en estudios previos (Duncan *et al.* 2006).

Castillo-Olguín *et al.*: Genetic differentiation of *Sphyrna lewini* in the Mexican Pacific

during 2001–2003 at seven sites of the Mexican Pacific Ocean, corresponding to the main fishing areas for this species (fig. 1). Samples were also collected in the Gulf of Mexico to compare the divergence reported in previous studies (Duncan *et al.* 2006). Fresh muscle tissue samples were preserved in DMSO buffer saturated with NaCl or 70% ethanol. Genomic DNA was isolated using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega Biosciences).

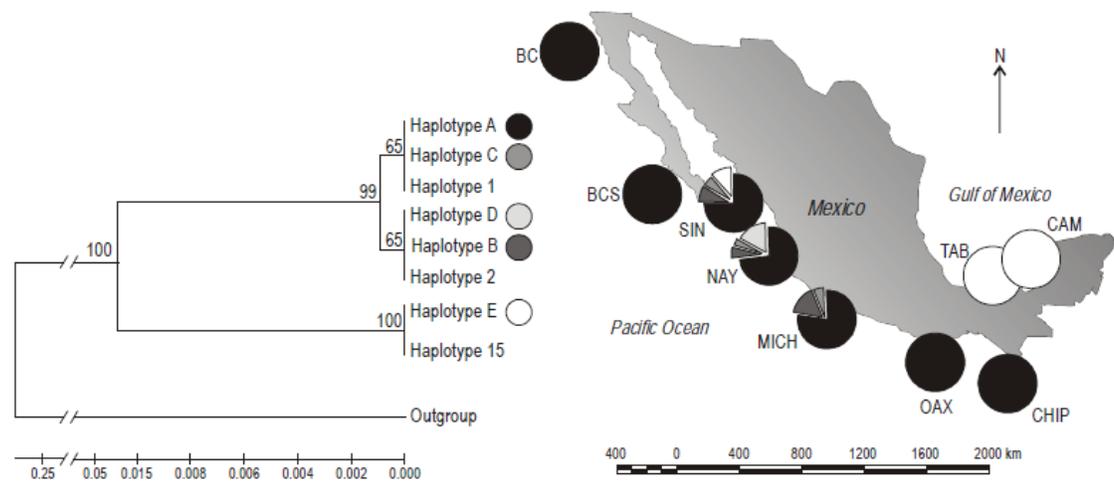
A 1000 bp fragment of the mtDNA control region was amplified from 149 individuals, using universal primers (Stoner *et al.* 2003). Polymerase chain reactions (PCR) were performed in a 15- $\mu$ L final volume, consisting of  $\sim$ 10 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup> DNA, amplification buffer (10 mM Tris-HCl, 25 mM KCl, pH 8.3), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 pM of each primer, 200  $\mu$ M dNTPs and 0.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen). The PCR conditions consisted of an initial cycle of 1 min at 94 °C, followed by 35 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 56.5 °C, and 1 min at 65 °C, and a final extension period of 3 min at 72 °C. The amplified fragments were subjected to SSCP analysis (Orita *et al.* 1989), which has been shown to successfully separate fragments of 400–1000 bp without reducing the resolution level (Kukita *et al.* 1997, Hayashi 1999). The PCR products were mixed with formamide in a 1:1 ratio. The mixture was denatured at 95 °C for 5 min and placed on ice to obtain the SSCPs. An undenatured control was added in each run to verify the formation of secondary structures, which were separated using an 8% polyacrylamide non-denaturing

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Colección de muestras, aislamiento de ADN y análisis de ADN

Se analizaron 176 muestras de tejido muscular de individuos juveniles de *S. lewini* de 60 a 130 cm de longitud total. Las muestras fueron recolectadas de 2001 a 2003 en siete localidades del océano Pacífico mexicano, correspondientes a las áreas de mayor pesca de esta especie (fig. 1). De la misma forma se recolectaron muestras del golfo de México para comparar los niveles de divergencia encontrados con la divergencia registrada en estudios previos (Duncan *et al.* 2006). Las muestras de tejido muscular fresco fueron preservadas en amortiguador DMSO saturado con NaCl o en alcohol al 70%. El aislamiento de ADN genómico se realizó utilizando el kit de purificación Wizard Genomic DNA (Promega Biosciences).

Se amplificaron fragmentos de 1000 pb de la región control del ADNmt de 149 individuos usando iniciadores universales (Stoner *et al.* 2003). Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se llevaron a cabo en un volumen final de 15  $\mu$ L, que contenía  $\sim$ 10 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup> de ADN, amortiguador de amplificación (10 mM de Tris-HCl, 25 mM de KCl, pH 8.3), 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 30 pM de cada iniciador, 200  $\mu$ M de dNTPs y 0.5 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen). Las condiciones de PCR consistieron en un ciclo inicial de 1 min a 94 °C,



**Figure 1.** Geographical distribution and genealogy based on genetic distances of mtDNA from *Sphyrna lewini* in the Mexican Pacific and Gulf of Mexico derived from the analysis of a fragment of the mtDNA control region. Location code and sample size (*N*) are shown.

**Figura 1.** Distribución geográfica y genealogía basada en distancias genéticas del ADNmt de *Sphyrna lewini* en el Pacífico mexicano y golfo de México detectadas mediante el análisis de un fragmento de la región control del ADNmt. Se muestran la clave del sitio y el tamaño de muestra (*N*).

Baja California, BC (31°52' N, 117°12' W); Baja California Sur, BCS (24°09' N, 11°15' W); Sinaloa, SIN (23°31' N, 106°43' W); Nayarit, NAY (21°32' N, 105°25' W); Michoacán, MICH (17°53' N, 102°10' W); Oaxaca, OAX (15°39' N, 96°29' W); Chiapas, CHIP (14°30' N, 92°27'); Tabasco, TAB (18°37' N, 92°49' W); Campeche, CAM (19°53' N, 90°44' W).

gel. Fragments were resolved by vertical electrophoresis in a sequencing chamber at 380 V for 24 h at 4 °C. Gels were stained with silver nitrate (Creste *et al.* 2001). Two samples of each haplotype identified by SSCP analysis were purified using the QIAquick Purification Kit (Qiagen), and sequenced in both directions using an ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) by Macrogen Inc. (South Korea). For data analysis, these sequences were representative of each haplotype and were assigned to all the samples that showed the same haplotype.

Microsatellite data were obtained for the 176 individuals, using a set of five primers for microsatellite loci (Cli-12, Cli-13, Cli-106, Cli-112, and Cli-119) designed for studies of other shark species (Keeney and Heist 2003). Amplification was carried out as previously described with some modifications of the annealing temperature for Cli-12, Cli-112, and Cli-119 (58 °C), Cli-13 (49 °C), and Cli-106 (47 °C). Microsatellites were separated on a 6% denaturing acrylamide gel for 1 h 30 min at 1000 V. Gels were stained with silver nitrate (Creste *et al.* 2001).

#### Data analysis

Sequences were aligned using Bio-Edit 7.0 (Hall 2004) and adjusted manually. Haplotype diversity, nucleotide diversities, as well as the average number of differences ( $\theta_K$ ) were calculated using ARLEQUIN 3.1 (Excoffier *et al.* 2005). ARLEQUIN software was also used to estimate Tajima's (D) haplotype-frequency neutrality test.

MICRO-CHECKER 2.2.1 (Van Oosterhout *et al.* 2004) was used to identify potential genotyping errors (presence of null alleles, dominance of small sized alleles, and "stuttering" related errors) in the microsatellite data using 10,000 randomizations. GENEPOP 4.0 (Rousset 2008) was used to perform an exact probability test for linkage disequilibrium of microsatellite loci, and to assess the fit of the genotypic frequencies to Hardy-Weinberg (H-W) distribution and to obtain probability values (Guo and Thompson 1992). The Bonferroni correction was applied to all statistical analyses involving multiple comparisons under a critical  $\alpha$  level (Rice 1989). The estimated global genetic diversity per locus ( $H_T$ ) and the allelic richness ( $R_s$ ) values, per locus and sample, were estimated using FSTAT 2.9.3 (Goudet 2001). The genealogical relationships of mtDNA haplotypes were assessed using MEGA 3.1 (Kumar *et al.* 2004) with the distance method. To compare our results with the mtDNA analysis performed by Duncan *et al.* (2006), three sequences of haplotypes from the same region were added, and a sequence of *Chiloscyllium plagiosum*, a representative species of the same order but different suborder than *S. lewini*, was used as an out-group.

ARLEQUIN was used to perform a hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) to compare gene diversity between regions of the Mexican Pacific. These samples were further separated into the feeding and breeding areas of the

seguido de 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 56.5 °C y 1 min a 65 °C, y un periodo final de extensión de 3 min a 72 °C. Los fragmentos amplificados fueron analizados mediante la metodología de SSCP (Orita *et al.* 1989), con la cual se han separado exitosamente fragmentos de 400 a 1000 pb sin reducir el nivel de resolución (Kukita *et al.* 1997, Hayashi 1999). Los Productos de PCR fueron mezclados con formamida en una proporción de 1:1. La mezcla fue desnaturada a 95 °C durante 5 min e inmediatamente colocada en hielo para la obtención de los SSCP. Un control no desnaturado fue incluido en cada corrimiento de electroforesis para verificar la formación de estructuras secundarias, las cuales fueron separadas usando un gel de poliacrilamida no desnaturante al 8%. Los fragmentos fueron separados mediante una electroforesis vertical en un equipo de secuenciación a 380V durante 24 h a 4 °C. Los geles fueron teñidos con nitrato de plata (Creste *et al.* 2001). Dos muestras de cada haplotipo identificado mediante análisis de SSCP fueron purificadas usando el kit de purificación QIAquick (Qiagen) y secuenciadas en ambos sentidos por la compañía Macrogen Inc. (Korea del Sur), que empleó el equipo de análisis ABI 3730xl (Applied Biosystems). Para el análisis de datos, estas secuencias fueron asignadas a todas las muestras que mostraron el mismo haplotipo.

Se obtuvieron datos de microsatélites de 176 individuos usando un grupo de cinco *loci* de microsatélites (Cli-12, Cli-13, Cli-106, Cli-112 y Cli-119) diseñados para estudios de otras especies de tiburones (Keeney and Heist 2003). Las amplificaciones se llevaron a cabo de acuerdo con la descripción previa con algunas modificaciones en la temperatura de alineamiento para Cli-12, Cli-112 y Cli-119 (58 °C), Cli-13 (49 °C) y Cli-106 (47 °C). Los microsatélites fueron separados en un gel desnaturante de acrilamida durante 1 h 30 min a 1000 V. Los geles fueron teñidos con nitrato de plata (Creste *et al.* 2001).

#### Análisis de datos

Las secuencias fueron alineadas usando Bio-Edit 7.0 (Hall 2004) y ajustadas manualmente. La diversidad haplotípica, diversidad nucleotídica, así como el número promedio de diferencias ( $\theta_K$ ) fueron calculados usando ARLEQUIN 3.1 (Excoffier *et al.* 2005). El programa ARLEQUIN también fue usado para obtener la estimación de la prueba de neutralidad de frecuencias haplotípicas de Tajima (D).

El programa MICRO-CHEKER 2.2.1 (Van Oosterhout *et al.* 2004) fue usado con datos provenientes de microsatélites para identificar errores potenciales de genotipificación (presencia de alelos nulos, dominancia de alelos de pequeño tamaño y errores por amplificación [*stuttering*]) empleando 10,000 aleatorizaciones. El programa GENEPOP 4.0 (Rousset 2008) fue usado para realizar una prueba exacta de probabilidad, a fin de determinar si existía desequilibrio por ligamiento en los *loci* de microsatélites y para evaluar el ajuste de las frecuencias genotípicas a la distribución de Hardy-Weinberg (H-W) (Guo and Thompson 1992). La

species. The first sub-group, named the northern group, included samples from the Baja California (BC) and Baja California Sur (BCS) locations; the second sub-group, named the central group, included the Sinaloa (SIN), Nayarit (NAY), and Michoacán (MICH) locations; and the third group, named the southern group, included the Oaxaca (OAX) and Chiapas (CHIP) locations in the Gulf of Tehuantepec (fig. 1). These three regions were used in the analysis using the mtDNA and microsatellite data, except that for the latter a different hierarchy was used, considering only BC as the northern group; BCS, SIN, NAY, and MICH as the central group; and preserving OAX and CHIP as the southern group. Divergence values estimated as  $\Phi_{ST}$ ,  $F_{ST}$ , and  $R_{ST}$  were obtained for both markers for paired population comparisons and pooled areas. STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard *et al.* 2000, Falush *et al.* 2003) was used to assess population structure and to establish the allocation of each individual to a genetic deme. For this purpose, the correlated allele frequency model was used. Between 1 and 10 populations ( $K$ ) with 30 iterations were identified, each one evaluated with 70,000 burn-in replicates, making estimates through the application of 70,000 MCMC. The true  $K$  was detected using the statistics test proposed by Evanno *et al.* (2005).

The historical demography parameters  $\theta_0$ ,  $\theta_1$ , and  $\tau$ , as well as the spatial expansion parameters  $\tau_e$ ,  $\theta_N$ , and  $M$ , were estimated using ARLEQUIN. The  $\theta$  estimates are the product of  $2\mu N_0$  and  $2\mu N_1$  (where  $\mu$  is equal to the mutation rate and  $N$  is the effective population size of females at time 0 before expansion and 1 after expansion);  $\tau$  is a relative measure of time since population expansion, but can also be used to estimate the current time ( $T$ ) since population expansion using the formula:  $T = \tau/2\mu$  (where  $\mu$  is equal to the mutation rate). For spatial expansion,  $\tau_e = 2\mu T_e$  and  $T_e$  are the times of spatial population growth given the generational time,  $\theta_N = 2N\mu$ , the effective population size of females at demographic equilibrium, and  $M = 2Nm$  is the scaled migration rate, where  $N$  is the effective female population size and  $m$  is the rate at which the sample would exchange migrants with a unique population of infinite size after  $T$  generations. Demographic expansion was also assessed by analyzing the distribution of nucleotide differences between pairs of sequences (mismatches). The adjustment of these analyses to an expansion model was tested through the Harpending raggedness index and the sum of square deviations (SSD). In order to explore demographic trends through time, skyline plots were obtained using the Bayesian approximation implemented in BEAST 1.7.1 (Drummond and Rambaut 2007). MIGRATE 3.1.2 (Beerli 2002) was used to estimate the effective population size and the gene flow between samples. Analyses were carried out through the estimate of  $\Theta$ , which is equal to  $4Ne\mu$ , given that  $Ne = \Theta/4\mu$ ;  $Ne$  corresponds to the effective population size and  $\mu$  is the mutation rate, the latter being  $8 \times 10^{-3}$  and  $10^{-4} - 10^{-2}$  per locus per generation for mtDNA data (Duncan *et al.* 2006) and microsatellite data, respectively (Weber and Wong 1993, Tripp-Valdez *et al.* 2010). Values

corrección de Bonferroni se aplicó a todos los análisis estadísticos que involucraron comparaciones múltiples para ajustar el nivel  $\alpha$  (Rice 1989). La estimación global de diversidad por locus ( $H_T$ ) y los valores de riqueza alélicas ( $R_s$ ), por locus y muestra, fueron estimados mediante FSTAT 2.9.3 (Goudet 2001). Las relaciones genealógicas de los haplotipos del ADNmt se realizaron con el programa MEGA 3.1 (Kumar *et al.* 2004) usando el método de distancias. Para la comparación de nuestros resultados con el análisis de ADNmt de estudios previos, se agregaron tres secuencias de los haplotipos correspondientes a regiones analizadas por Duncan *et al.* (2006), y como grupo externo para el análisis, se empleó la secuencia de *Chiloscyllium plagiosum*, especie representativa del mismo orden pero de diferente suborden al de *S. lewini*.

El programa ARLEQUIN se utilizó para realizar un análisis de varianza molecular jerárquico (AMOVA), a fin de comparar la diversidad genética entre las muestras de las regiones del Pacífico mexicano analizadas. Estas muestras fueron separadas con base en las áreas de alimentación y alumbramiento de la especie. El primer subgrupo, denominado grupo norte, incluyó las muestras de las localidades de Baja California (BC) y Baja California Sur (BCS); el segundo subgrupo, denominado grupo central, incluyó las localidades de Sinaloa (SIN), Nayarit (NAY) y Michoacán (MICH); y el tercer subgrupo, denominado grupo sur, incluyó las localidades de Oaxaca (OAX) y Chiapas (CHIP) ubicadas en el golfo de Tehuantepec (fig. 1). Estas tres regiones fueron usadas para el análisis de datos de ADNmt y microsatélites, con la salvedad de que para los datos de los microsatélites se utilizó una jerarquización diferente, donde el subgrupo norte fue conformado solo por BC; el grupo central por BCS, SIN, NAY y MICH; y el grupo sur por OAX y CHIP. Los valores de divergencia estimados como  $\Phi_{ST}$ ,  $F_{ST}$  y  $R_{ST}$  fueron obtenidos a partir de ambos marcadores para comparar pares de poblaciones y áreas. El programa STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard *et al.* 2000, Falush *et al.* 2003) se usó para evaluar la estructura poblacional y establecer la asignación de cada individuo a un deme genético. Para esto, se usó el modelo de correlación de frecuencias alélicas. Se identificaron entre 1 y 10 poblaciones ( $K$ ) con 30 iteraciones. Cada evaluación se realizó con 70,000 replicas de calentamiento (*burn-in*) y la aplicación de 70,000 MCMC. El valor de  $K$  real fue determinado usando la prueba estadística propuesta por Evanno *et al.* (2005).

Los parámetros de demografía histórica  $\theta_0$ ,  $\theta_1$  y  $\tau$ , así como los parámetros de expansión espacial  $\tau_e$ ,  $\theta_N$  y  $M$ , se estimaron mediante ARLEQUIN. La estimación de  $\theta$  es el producto de  $2\mu N_0$  y  $2\mu N_1$  (donde  $\mu$  es igual a la tasa mutacional y  $N$  es el tamaño efectivo poblacional de hembras en el tiempo 0 antes de la expansión y 1 después de la expansión). Adicionalmente,  $\tau$  es una medida relativa del tiempo desde la expansión poblacional, pero también puede ser utilizada para estimar el tiempo transcurrido desde la expansión ( $T$ ) mediante la fórmula  $T = \tau/2\mu$  (donde  $\mu$  es igual a la tasa

were estimated by Bayesian inference, using the model of sequence evolution for mitochondrial data and the random Brownian model with a constant mutation rate for microsatellites. Five runs with three replicates per chain and 10,000 genealogies for burn-in were performed to verify the consistency of the results; the data shown are the average of these five runs.

POWSIM 4 (Ryman and Palm 2006) was used to evaluate the statistical power of the data using Fisher's exact test and a  $\chi^2$  test, employing 500 replicas in simulation. Finally, PCAGEN 1.2.2 (Goudet 1999) was used to assess the relationship between populations and individuals using a principal component analysis (PCA), with the probability of attraction estimated through 10,000 genotype randomizations.

## RESULTS

### Genetic diversity

We analyzed 714 bp of the mtDNA control region and identified five haplotypes (table 1) in 149 of the 176 samples collected, resulting in a total haplotype diversity of  $h = 0.493$  and a nucleotide diversity of  $\pi = 0.011$ . The highest mtDNA sequence haplotype diversity was observed for the central region locations (SIN, NAY, and MICH), while the samples from the other locations showed no variation (table 1). The "E" haplotype was predominant in the Gulf of Mexico but was also detected with a low frequency in the Mexican Pacific, at SIN.

Using microsatellite data, the samples from BCS and OAX, with the smallest sample sizes, were found to have the lowest number of alleles. These locations diverged from other groups due to the presence of unique alleles with high frequencies at some loci (Cli-112 and Cli-13, respectively).

In the case of microsatellites, locus Cli-13 was monomorphic for samples from SIN, NAY and CHIP. The total average diversity value was  $He = 0.525$ , and the highest average allelic richness and heterozygosity were observed at NAY, while BC showed the lowest values. Genotype frequencies met the expectations of H-W equilibrium in 32 of the 42 tests for the analyzed locations, while the remaining nine could have null alleles at some of the analyzed loci (table 2). Only the BCS sample showed evidence of linkage disequilibrium in two loci, Cli-13 and Cli-112. The  $F_{IS}$  values were significant in the same loci showing H-W disequilibrium.

### Population divergence

The  $\Phi_{ST}$  pairwise sample values for mtDNA data showed significant differences only among ocean basins (table 3). There was no evidence of population divergence among samples from the Mexican Pacific Ocean, and they were not significant when the significance level was adjusted (data not shown). For pairwise-sample  $F_{ST}$  estimates using microsatellite data, a signal of population divergence was observed

mutacional). Para la expansión espacial,  $\tau_e = 2\mu T_e$  y  $T_e$  son los tiempos de crecimiento espacial dado el tiempo generacional,  $\theta_N$  es  $2N\mu$ , el tamaño efectivo poblacional de hembras en equilibrio demográfico, y  $M = 2Nm$  es la escala del tiempo de migración, donde  $N$  es el tamaño efectivo poblacional de hembras y  $m$  es la tasa a la que una muestra podría intercambiar migrantes con una población de tamaño infinito después de  $T$  generaciones. La expansión demográfica también fue evaluada mediante el análisis de distribución de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias (*mismatches*). El ajuste de este análisis se realizó bajo un modelo de expansión y se puso a prueba a través del índice de Harpending (*raggedness*) y la desviación de la suma de los cuadrados (SSD). Con el fin de explorar las tendencias demográficas a través del tiempo, se obtuvieron las estimaciones de tamaño poblacional (*skyline plots*) mediante la aproximación bayesiana implementada en el programa BEAST 1.7.1 (Drummond y Rambaut 2007). El programa MIGRATE 3.1.2 (Beerli 2002) se usó para estimar los tamaños efectivos poblacionales y el flujo génico entre las muestras. Los análisis se llevaron a cabo mediante la estimación de  $\Theta$ , que es igual a  $4N_e\mu$ , dado que  $N_e = \Theta/4\mu$ ;  $N_e$  corresponde al tamaño efectivo poblacional y  $\mu$  es la tasa mutacional, siendo esta última del  $8 \times 10^{-3}$  por locus por generación si se trata de datos de ADNmt (Duncan *et al.* 2006) y de  $10^{-4} - 10^{-3}$  si se trata de datos de microsatélites (Weber y Wong 1993, Tripp-Valdez *et al.* 2010). Los valores fueron estimados por inferencia bayesiana, usando el modelo de evolución de secuencias para datos mitocondriales y el modelo aleatorio browniano con una tasa mutacional constante para microsatélites. Cinco corrimientos con tres réplicas por cadena y 10,000 genealogías de *burn-in* fueron empleados para verificar la consistencia de los resultados, y se presenta el promedio de estos cinco corrimientos.

El programa POWSIM 4 (Ryman y Palm 2006) fue usado para evaluar el poder estadístico de los datos usando la prueba exacta de Fisher y la prueba de  $\chi^2$ , empleando una simulación con 500 réplicas. Finalmente, se usó el programa PCAGEN 1.2.2 (Goudet 1999) para evaluar la relación entre poblaciones e individuos usando el análisis de componentes principales (PCA), con una probabilidad de atracción estimada mediante la aleatorización de 10,000 genotipos.

## RESULTADOS

### Diversidad genética

Se analizaron 714 pb de la región control del ADNmt y se identificaron cinco haplotipos (tabla 1) en 149 de los 176 individuos recolectados, y se estimó la diversidad haplotípica total en  $h = 0.493$  y la diversidad nucleotídica en  $\pi = 0.011$ . Los valores más altos de diversidad haplotípica se observaron en las localidades de la región central (SIN, NAY y MICH), mientras que el resto de las localidades analizadas no mostraron variación (tabla 1). El haplotipo E fue dominante en el

between BC in relation to all other analyzed sites. By comparing samples grouped into regions, genetic divergence was found between the northern region (only BC) relative to the central ( $F_{ST} = 0.172$ ,  $P < 0.005$ ) and southern regions ( $F_{ST} = 0.095$ ,  $P < 0.005$ ); however, the divergence between the central and southern regions ( $F_{ST} = -0.034$ ,  $P = 0.479$ ) was not significant. The AMOVA gave significant values in the comparison between regions in the Mexican Pacific for microsatellites ( $F_{CT} = 0.130$ ,  $P < 0.005$ ), showing higher differences than the mtDNA data ( $\Phi_{CT} = 0.088$ ,  $P = 0.027$ ). The differences observed between BC and BCS justified the re-classification of the regions, in which BCS was moved from the northern region to the central region ( $F_{ST} = 0.1676$ ,  $P < 0.005$ ). This test confirmed the divergence of the BC population from the rest of the populations in the Mexican Pacific. Moreover, it should be highlighted that the difference observed among regions in the AMOVA with the mtDNA data is interesting considering the significant differences from pairwise-sample  $F_{ST}$  comparisons omitting the Bonferroni correction.

The individual allocation analysis, performed by STRUCTURE including all populations (Mexican Pacific and Gulf of Mexico), showed a maximum value of  $L_n = 1677.83$  (Var = 313.23) for  $K = 6$ , indicating a potential genetic structure with probably six clusters. However, the Evanno test detected  $K = 2$ , suggesting that the population structure was between oceanic regions. The same analysis for the Mexican Pacific populations showed  $L_n = 1621.17$  (Var = 85.96) for  $K = 2$  as was also observed by the Evanno test ( $K = 2$ ). This corresponds to the last AMOVA for microsatellite data, which confirmed two different genetic units. The haplotype genealogy showed the existence of two lineages for the mtDNA control region: one represented by the "E" haplotype, which retains its ancestral characteristics in the Gulf of Mexico, while a second clade was formed by the rest of the haplotypes present in the Pacific Ocean and whose origin is more recent (fig. 1). The maximum difference between the Gulf of Mexico and the Mexican Pacific is the result of isolation due to the closure of the Panama Isthmus, and this is coincident with that previously published for the same species by Duncan *et al.* (2006).

#### Population expansion and gene flow

The estimate of  $\tau$  for the combined analyzed sequences was 0.666 (standard deviation = 1.247). Additionally, the estimates for time since population expansion ( $T$ ) were very similar to the value of  $\tau$  for each of the analyzed populations, especially those of SIN and MICH (table 1). This population expansion is estimated to have occurred approximately 262,600 years ago (SIN and MICH), while the spatial expansion is estimated to have occurred previously about 473,400 years ago (table 1). Tajima's D values were positive and not significant, suggesting recent population bottlenecks, while the distribution of paired nucleotide differences (mismatches)

golfo de México, pero también fue detectado con bajas frecuencias en el Pacífico, en SIN.

Las localidades de BCS y OAX fueron las de menor número de muestra y presentaron el menor número de alelos en el análisis de datos de microsatélites. Estas localidades divergen de los otros grupos debido a la presencia de alelos únicos con una alta frecuencia de algunos *loci* (Cli-112 y Cli-13, respectivamente).

El *locus* Cli-13 de microsatélites fue monomórfico para las muestras de SIN, NAY y CHIP. El valor promedio de heterocigosis total esperada fue de  $H_e = 0.525$ ; la mayor riqueza alélica y heterocigosis se presentaron en NAY, mientras que BC mostró los valores más bajos. Las frecuencias genotípicas con ajuste al equilibrio de H-W se presentaron en 32 de las 42 pruebas para el análisis de localidades, mientras que las nueve pruebas restantes podrían contener algunos alelos nulos en los *loci* analizados (tabla 2). Únicamente la muestra de BCS mostró evidencia de desequilibrio de ligamiento en dos *loci*, Cli-13 y Cli-112. Los valores de  $F_{IS}$  fueron significativos en los mismo *loci* que no mostraron equilibrio de H-W.

#### Divergencia poblacional

Los valores de  $\Phi_{ST}$  de los datos de ADNmt entre muestras pareadas mostraron diferencias significativas únicamente entre cuencas oceánicas (tabla 3). A pesar de que se observaron algunos valores significativos de  $F_{ST}$  entre pares de muestras de las localidades del océano Pacífico, éstos no resultaron significativos cuando se ajustó el nivel de significancia (no se muestran resultados). Los valores de  $F_{ST}$  entre muestras pareadas usando datos de microsatélites mostraron una señal de divergencia poblacional entre BC con respecto al resto de las localidades analizadas. Al comparar las muestras agrupadas por regiones, se encontró divergencia genética entre la región norte (conformada solo por BC) en comparación con las regiones central ( $F_{ST} = 0.172$ ,  $P < 0.005$ ) y sur ( $F_{ST} = 0.095$ ,  $P < 0.005$ ); sin embargo, la divergencia entre las regiones central y sur ( $F_{ST} = -0.034$ ,  $P = 0.479$ ) no fue significativa. El análisis de AMOVA dio valores significativos en la comparación entre las regiones del Pacífico mexicano para microsatélites ( $F_{CT} = 0.130$ ,  $P < 0.005$ ), contrastando con los datos de ADNmt ( $\Phi_{CT} = 0.088$ ,  $P = 0.027$ ). Las diferencias observadas entre BC y BCS justifican la reclasificación de las regiones, por lo que la muestra de BCS perteneciente a la región norte fue ubicada en la región central ( $F_{ST} = 0.1676$ ,  $P < 0.005$ ). Esta prueba confirmó la divergencia de la población de BC con el resto de las muestras del Pacífico mexicano. Por otra parte, cabe destacar que las diferencias observadas entre regiones en el análisis de AMOVA con datos de ADNmt son resultados interesantes teniendo en cuenta las diferencias significativas en la comparación de  $F_{ST}$  entre muestras pareadas al omitir la corrección de Bonferroni.

Table 1. Genetic variability of mtDNA control region sequences. Accession numbers of haplotype sequences: JN543266–JN543270.

Tabla 1. Variabilidad genética de la región control del ADNmt. Números de acceso de las secuencias de los haplotipos: JN543266–JN543270.

Location	Haplotype (Freq.)	$h$	$\pi$	$\theta_K$	$\tau$	$T$	$\theta_0$	$\theta_1$	$\tau_c$	$T_c$	$\theta_N$	$M$	$D(P)$
SIN	A (0.750)	0.415	0.007	1.031	3.0	262,600	0.0017	0.502 (7700)	5.408	473,400	0.006 (92.0)	0.721	-0.961 (0.17)
	B (0.071)												
	C (0.071)												
	E (0.107)												
NAY	A (0.724)	0.440	0.002	1.016	0.0	??	0.0000	99999.0 ( $1.5 \times 10^6$ )	4.655	407,500	0.001 (15.0)	0.916	-0.610 (0.288)
	B (0.069)												
	C (0.034)												
	D (0.172)												
MICH	A (0.764)	0.380	0.002	0.774	3.0	262,600	0.2173	0.442 (6800)	5.340	467,500	0.001 (15.0)	0.734	-0.777 (0.249)
	B (0.176)												
	C (0.058)												

$h$  = haplotype diversity.

$\pi$  = nucleotide diversities.

$\theta_K$  = nucleotide diversity estimator.

$\tau = 2\mu T$ , where  $\mu$  is equal to the mutation rate.

$T$  = Current time since population expansion.

$\theta_0$  = Theta at time 0. Historical demography parameters before population expansion.

$\theta_1$  = Theta at time 1. Historical demography parameters after population expansion.

$\tau_c = \tau = 2\mu T_c$ , where  $\mu$  is equal to the mutation rate.

$T_c$  = Current time since spatial expansion.

$\theta_N$  = Effective size of females.

$M$  = Generation time.

$D(P)$  = Tajima's haplotype-frequency neutrality tests and probability.

Castillo-Olguin *et al.*: Genetic differentiation of *Sphyrna lewini* in the Mexican Pacific

**Table 2.** Summary statistics for microsatellites:  $H_o$  = observed heterozygosity,  $H_e$  = expected heterozygosity,  $P_{H-W}$  = probability values for the Hardy-Weinberg equilibrium,  $R_s$  = allelic richness, and  $a$  = number of alleles per locus.

**Tabla 2.** Resumen estadístico para microsatélites:  $H_o$  = heterocigosis observada,  $H_e$  = heterocigosis esperada,  $P_{H-W}$  = valores de probabilidad para el equilibrio de Hardy-Weinberg,  $R_s$  = riqueza alélica y  $a$  = número de alelos por locus.

Location (N)	Index	Locus					Total
		Cli-12	Cli-13	Cli-106	Cli-112	Cli-119	
BC (10)	$H_o$	1.0	0.600	0.6	0.1	0.625	0.69
	$H_e$	0.876	0.420	0.625	0.645	0.679	0.649
	$P_{H-W}$	1.0	1.0	0.253	0.000*	0.017	1.00
	$R_s$	8.35	2.0	3.90	4.32	3.98	4.41
	$a$	9	2	4	5	4	24
BCS (20)	$H_o$	1.0	0.0	0.0	0.4	0.888	0.457
	$H_e$	0.851	0.420	0.218	0.737	0.566	0.558
	$P_{H-W}$	1.0	0.000*	0.003	0.000*	0.999	0.014
	$R_s$	7.54	1.99	1.91	5.19	3.02	3.93
	$a$	12	2	2	7	4	27
SIN (42)	$H_o$	0.731	–	0.394	0.405	0.875	0.481
	$H_e$	0.793	–	0.524	0.444	0.586	0.469
	$P_{H-W}$	0.000*	–	0.007	0.000*	0.883	0.038
	$R_s$	6.45	1.0	3.21	3.57	3.21	3.488
	$a$	12	1	4	8	6	31
NAY (30)	$H_o$	0.4	–	0.033	0.566	0.766	0.353
	$H_e$	0.803	–	0.095	0.446	0.486	0.366
	$P_{H-W}$	0.000*	–	0.051	1.0	1.0	0.030
	$R_s$	5.87	1.0	1.55	2.82	2.0	2.648
	$a$	9	1	2	3	2	17
MICH (20)	$H_o$	1.0	0.647	0.5	0.75	0.764	0.732
	$H_e$	0.863	0.479	0.523	0.53	0.648	0.608
	$P_{H-W}$	1.0	1.0	0.294	1.0	0.015	0.067
	$R_s$	7.04	2.80	2.92	3.28	3.88	3.984
	$a$	8	3	3	5	5	24
OAX (9)	$H_o$	0.875	1.0	0.75	0.50	0.666	0.758
	$H_e$	0.632	0.5	0.468	0.60	0.666	0.573
	$P_{H-W}$	0.844	1.0	1.0	0.060	0.095	1.00
	$R_s$	3.0	2.0	2.0	3.86	3.92	2.956
	$a$	3	2	2	4	4	15
CHIP (16)	$H_o$	0.866	–	0.153	0.625	0.933	0.515
	$H_e$	0.866	–	0.378	0.503	0.611	0.471
	$P_{H-W}$	0.503	–	0.014	0.933	0.998	0.000*
	$R_s$	7.50	1.0	2.76	3.30	3.32	3.576
	$a$	10	1	3	5	4	23
CAM (11)	$H_o$	0.0	0.500	0.125	0.818	0.727	0.434
	$H_e$	0.545	0.505	0.554	0.557	0.495	0.531
	$P_{H-W}$	0.000*	0.059	0.000*	1.0	0.982	0.209
	$R_s$	3.74	2.92	3.86	2.96	2.0	3.096
	$a$	4	3	4	3	2	16
TAB (18)	$H_o$	0.176	0.222	0.0	0.444	0.666	0.302
	$H_e$	0.666	0.507	0.426	0.378	0.531	0.501
	$P_{H-W}$	0.000*	0.005	0.000*	1.0	0.888	0.021
	$R_s$	4.13	2.38	2.0	3.28	2.46	2.85
	$a$	5	3	2	5	3	18
Overall	$H_o$	0.841	0.558	0.494	0.626	0.600	0.624
	$H_e$	0.766	0.314	0.423	0.538	0.585	0.525
	$R_s$	7.24	2.81	2.95	4.06	3.11	4.03
	$a$	17	6	5	11	8	47

\* Significant values.

**Table 3.** Population divergence:  $\Phi_{ST}$  values (above the diagonal), and  $F_{ST}$  and  $R_{ST}$  values (below the diagonal);  $\Theta$  values from mtDNA (below each code, first row), and  $\Theta$  values from microsatellites (below each code, first column).

**Tabla 3.** Divergencia poblacional. Valores de  $\Phi_{ST}$  (por encima de la diagonal) y valores de  $F_{ST}$  y  $R_{ST}$  (por debajo de la diagonal). Valores de  $\Theta$  de ADNmt (debajo de cada clave, primera fila) y valores de  $\Theta$  de microsatélites (debajo de cada clave, primera columna).

Location	BC 60	BCS 27	SIN 47	NAY 62	MICH 84	OAX 127	CHIP 56	CAM 66	TAB 49
<b>Mexican Pacific</b>									
BC 114		0.0	0.029	0.057	0.049	0.0	0.0	1.0*	1.0*
BCS 115	0.144*		0.102	0.132	0.147	0.0	0.0	1.0*	1.0*
SIN 105	0.454*	0.076*		0.013	-0.02	0.05	0.072	0.679*	0.717*
NAY 77	0.411*	0.088*	-0.010		0.003	0.078	0.1	0.693*	0.73*
MICH 105	0.297*	0.045	0.033	0.011		0.075	0.104	0.76*	0.803*
OAX 111	0.324*	0.029	0.029	0.048	0.067		0.0	1.0*	1.0*
CHIP 97	0.314*	0.045	0.031	0.011	-0.022	0.083		1.0*	1.0*
	0.098	-0.011	0.022	0.186	0.105	0.716			
<b>Gulf of Mexico</b>									
CAM 96	0.263*	0.026	0.022	0.0005	-0.027	0.033	-0.014		0.0
	0.384	0.174	0.010	-0.016	-0.018	0.815	0.119		
TAB 86	0.455*	0.109*	-0.0003	-0.007	0.027	0.082	0.014	0.036	
	0.310	0.159	0.024	0.003	0.022	0.755	0.116	-0.047	

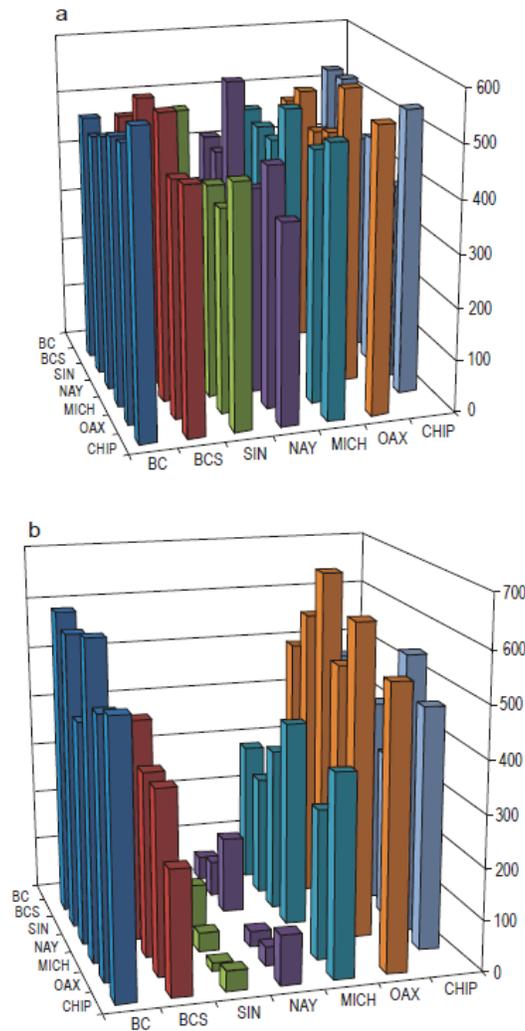
\* Significant values,  $P < 0.001$ .

did not yield significant deviations from a unimodal distribution, suggesting a recent expansion in these populations. Deviations observed at NAY and MICH ( $SSD = 0.307$ ,  $P < 0.005$ ;  $SSD = 0.204$ ,  $P = 0.032$ , respectively) suggest a possibility of bottlenecks in these populations. The Harpending raggedness index showed a range of 0.4019 (NAY) to 0.648 (MICH), with no significant values, in agreement with an expansion event (data not shown). The results of the Bayesian evolutionary analysis showed a recent decline in population size of females in the Mexican Pacific, estimated to have occurred some 2000 to 2500 years ago, whereas the estimated time for this reduction in size for the SIN, NAY, and MICH populations, which showed values different from zero, was more recent, around 600, 250, and 100 years ago, respectively.

The estimates of gene flow between locations, based on mtDNA data, were found to be in a range of 350 (NAY to SIN) to 567 migrants (CHIP to BC) per population. In general, there was significant gene flow ( $M = 448-567$ ) between locations from the northern and southern regions, and lower gene flow from SIN and NAY to all other locations. The estimates of gene flow using microsatellite data showed a similar

El análisis de asignación individual, realizado con los datos de microsatélite con el programa STRUCTURE incluyendo todas las poblaciones (Pacífico Mexicano y golfo de México), mostró un valor máximo de  $L_n = 1677.83$  ( $Var = 313.23$ ) con  $K = 6$ , indicando una estructura genética potencial de probablemente seis poblaciones. Sin embargo, la prueba de Evanno detectó una  $K = 2$ , sugiriendo estructura poblacional entre las dos regiones oceánicas. El mismo análisis para las localidades del Pacífico mexicano mostró un valor máximo de  $L_n = 1621.17$  ( $Var = 85.96$ ) para una  $K = 2$ , misma que fue observada en la prueba de Evanno ( $K = 2$ ). Esto coincide con el último análisis de la prueba de AMOVA para datos de microsatélites, el cual confirma la presencia de dos unidades genéticamente independientes. La genealogía de haplotipos mostró la existencia de dos linajes de la región control del ADNmt: uno estuvo representado por el haplotipo E, el cual conserva las características ancestrales en el golfo de México, mientras que un segundo clado se formó con el resto de los haplotipos presentes en el océano Pacífico y de origen más reciente (fig. 1). La máxima diferencia entre el golfo de México y el Pacífico mexicano es resultado del aislamiento por el cierre del istmo de Panamá, y esto coincide

Castillo-Olguín *et al.*: Genetic differentiation of *Sphyrna lewini* in the Mexican Pacific



**Figure 2.** Genetic flow. Values of immigrants between pairs of populations from (a) mtDNA data and (b) microsatellite data.  
**Figura 2.** Flujo genético. Valores de inmigrantes entre pares de poblaciones de datos de (a) ADNmt y (b) microsatélites.

pattern to that obtained using mtDNA data, with a range of 17 (OAX to SIN) to 668 migrants (SIN to OAX); however, the gene flow into SIN and NAY was considerably lower compared with the previous estimation (fig. 2). The estimated global  $\Theta$  value of mtDNA data from the Mexican Pacific region was 463, while with microsatellite data  $\Theta = 724$ . The statistical robustness test performed for microsatellite data presented a non-significant value ( $F_{ST} = 0.009$ ,  $P = 0.8$ ) with respect to the expected value ( $F_{ST} = 0.01$ ). This indicated that

con lo previamente publicado para la misma especie por Duncan *et al.* (2006).

#### Expansión poblacional y flujo genético

El valor de  $\tau$  para el conjunto de secuencias fue de 0.666 (desviación estándar = 1.247). Las estimaciones del tiempo desde la expansión poblacional ( $T$ ) fueron muy similares al valor total de  $\tau$  para cada una de las poblaciones analizadas, especialmente en las localidades de SIN y MICH (tabla 1). La expansión demográfica se estima que ocurrió hace aproximadamente 262,600 años (SIN y MICH), mientras que la expansión espacial se estimó que ocurrió hace 473,400 años (tabla 1). Los valores  $D$  de la prueba de Tajima fueron positivos y no significativos, sugiriendo cuellos de botella poblacionales recientes, mientras que la distribución entre pares de diferencias nucleotídicas (*mismatches*) no presentaron desviaciones significativas de la distribución unimodal, sugiriendo una expansión reciente en estas poblaciones. Las desviaciones observadas en NAY y MICH ( $SSD = 0.307$ ,  $P < 0.005$ ;  $SSD = 0.204$ ,  $P = 0.032$ , respectivamente) sugieren la posible existencia de cuellos de botella en estas poblaciones. El índice de *raggedness* de Harpending, mostró un intervalo de 0.4019 (NAY) a 0.648 (MICH), sin valores significativos, lo que coincide con los eventos de expansión (no se muestran resultados). Los resultados del análisis de evolución de estimación Bayesiana mostraron un reciente declive en el tamaño poblacional de las hembras en el Pacífico mexicano, que se estima ocurrió hace 2000 o 2500 años, mientras que el tiempo estimado de la reducción de los tamaños poblacionales en las poblaciones de SIN, NAY y MICH, que muestran valores diferentes de cero, fueron más recientes, alrededor de 600, 250 y 100 años respectivamente.

La estimación de flujo genético entre localidades, con base en datos de ADNmt, mostró un intervalo de 350 (NAY a SIN) a 567 migrantes (CHIP a BC) por población. En general, se presentó un flujo genético significativo ( $M = 448-567$ ) entre las localidades de la región norte y las del sur, y un flujo menor de SIN y NAY con el resto de las localidades. Las estimaciones de flujo genético mediante datos de microsatélites mostraron un patrón similar al obtenido mediante datos de ADNmt, con un intervalo de 17 (OAX a SIN) a 668 migrantes (SIN a OAX). Sin embargo, el flujo genético hacia SIN y NAY fue considerablemente menor comparando con la estimación previa (fig. 2). La estimación global del valor de  $\Theta$  para datos de ADNmt en la región del Pacífico mexicano fue de 463, mientras que con datos de microsatélites  $\Theta = 724$ . La prueba de robustez estadística realizada para microsatélites no presentó un valor significativo ( $F_{ST} = 0.009$ ,  $P = 0.8$ ) con respecto al valor esperado ( $F_{ST} = 0.01$ ). Esto indica que el poder de resolución de la prueba de  $F_{ST}$  fue adecuada para el grupo de datos analizado. El PCA mostró un valor global de  $F_{ST}$  de 0.13 para las muestras combinadas y de 0.136 para las localidades del Pacífico mexicano. Estos resultados indican

the resolving power of the  $F_{ST}$  tests was adequate for the data sets being examined. The PCA revealed global  $F_{ST}$  values of 0.13 and 0.136 for the combined samples and for the locations in the Mexican Pacific Ocean, respectively. These results indicated a trend for population differentiation between the BC and OAX samples in relation to the other locations. Supplementary material on data gene flow and AMOVA, and graphics of STRUCTURE, PCA, and BEAST analyses can be requested from the corresponding author.

#### DISCUSSION

In the Mexican Pacific, the presence of pregnant females and juveniles has often been reported in areas of high productivity, suggesting that these may be breeding and/or feeding grounds (Alejo-Plata *et al.* 2006a, b; Salomón-Aguilar *et al.* 2009). This observation and the philopatric behavior of *S. lewini* suggest the possibility of population structure.

#### Population divergence

Our results detected divergence between the northern (BC and BCS) and central locations relative to the southern locations, when compared as separate samples or pooled into regions using nuclear DNA, while mtDNA data did not show significant divergence for any comparison. These results suggest recent population divergence, strongly related to some extent of gene flow between the analyzed regions. The observed genetic diversity was similar to that reported in studies on other shark species using mitochondrial and nuclear markers (Keeney and Heist 2003, Stoner *et al.* 2003). The low levels of diversity observed using mtDNA data were in agreement with the levels previously reported for *S. lewini* in the Gulf of Mexico (Duncan *et al.* 2006).

The populations that showed H-W deviations in some loci also showed significant probability values in their fixation indexes  $F_{IS}$  in those loci, implying an important effect of endogamy and explaining the H-W deviation observed. However, the probability values of  $F_{IS}$  derived from all loci of every population were significant only for BC and BCS in the Mexican Pacific and for the two sites of the Gulf of Mexico. These results suggest a marked pattern of endogamy in these four populations, although the results obtained from the Gulf of Mexico sites may be enhanced by the low sample sizes for this region.

The genealogy of the analyzed haplotypes was similar to that reported by Duncan *et al.* (2006). A difference between ocean basins was also observed, with a clearly lower diversity in the Gulf of Mexico and the presence of two more haplotypes than those reported by Duncan for the Mexican Pacific, in populations of SIN, NAY, and MICH.

The evolutionary characteristics of mtDNA, including lack of recombination and maternal inheritance, have turned it into an important tool to obtain genetic information within a historical context. In contrast, microsatellite nuclear DNA

una tendencia de diferenciación poblacional entre las muestras de BC y OAX en relación con las demás localidades. Los datos de flujo génico y del análisis de AMOVA y las graficas de análisis de STRUCTURE, PCA y BEAST pueden solicitarse al autor principal.

#### DISCUSIÓN

La presencia de hembras preñadas y juveniles ha sido frecuentemente registrada en las zonas de alta productividad, en el Pacífico mexicano, sugiriendo que estas áreas pueden corresponder a zonas de alumbramiento y alimentación. (Alejo-Plata *et al.* 2006a, b; Salomón-Aguilar *et al.* 2009). Esta observación y el comportamiento filopátrico en *S. lewini* sugieren la posibilidad una estructura poblacional.

#### Divergencia poblacional

Nuestros resultados detectaron divergencia poblacional entre las localidades del norte (BC y BCS) y de la región central en comparación con las localidades del sur, tanto en las comparaciones de muestras individuales como en los grupos de regiones usando ADN nuclear, mientras que con datos de ADNmt no se observaron diferencias significativas en ninguno de los análisis. Estos resultados sugieren una divergencia poblacional reciente, fuertemente relacionada con el flujo génico entre las regiones analizadas. La diversidad genética observada fue similar a la registrada en estudios de otras especies de tiburones, que utilizaron marcadores mitocondriales y nucleares (Keeney y Heist 2003, Stoner *et al.* 2003). Los bajos niveles de diversidad observados con los datos de ADNmt coinciden con los niveles de diversidad de *S. lewini* encontrados previamente en el golfo de México (Duncan *et al.* 2006).

Las poblaciones que mostraron desviación de H-W en algunos loci también mostraron valores de probabilidad significativa en los índices de fijación  $F_{IS}$  de los mismos loci, lo que implica un importante efecto endogámico y explica las desviaciones de H-W observadas. Sin embargo, los valores de probabilidad de  $F_{IS}$  derivados de los loci en todas las poblaciones resultaron significativos únicamente para las muestras de BC y BCS en el Pacífico mexicano y para las dos localidades del golfo de México. Estos resultados sugieren un marcado patrón de endogamia para estas cuatro poblaciones, aunque los resultados obtenidos para las localidades del golfo de México pueden deberse a efectos de una muestra reducida de esta región.

El análisis de la genealogía de los haplotipos fue similar al registrado por Duncan *et al.* (2006). La diferencia entre las cuencas oceánicas fue clara, así como la baja diversidad en el golfo de México y la presencia de dos haplotipos más que los registrados por Duncan en el Pacífico mexicano, en las poblaciones de SIN, NAY y MICH.

Las características evolutivas del ADNmt, incluyendo la ausencia de recombinación y la herencia materna, lo han

possesses a high mutation rate, allowing for the detection of evolutionary processes in a more recent scale. For this reason, the divergence signal observed between the northern region and the rest of the populations using microsatellite data was not detected by mtDNA, and may be due to a signal of historical gene flow between the locations in the Mexican Pacific Ocean. Thus, the genetic similarity between spatially separate locations may be the result of past gene flow facilitated by the current system. The north-to-south California Current and the south-to-north Costa Rica Coastal Current may have favored the exchange of individuals between these two regions during the demographic and/or spatial expansion processes. Our results of the mtDNA analysis showed a pattern of genetic homogeneity that has been observed for *S. lewini* in the same area (Duncan *et al.* 2006, Nance *et al.* 2011), suggesting a strong ancestral interaction among populations of the Mexican Pacific. This same pattern of genetic homogeneity has been observed for other pelagic fish species in the same area of the Mexican Pacific using mitochondrial markers (Díaz-Jaimes *et al.* 2006).

Our data are consistent with a recent population divergence, detected by microsatellite analysis in some of the locations in the Mexican Pacific (BC in relation to the rest of the locations, and SIN and NAY in relation to BCS). The differences observed in the divergence indexes showed two patterns that are related to the different evolutionary times of each marker, suggesting that the recent divergence between BC and BCS could be related to changes in population sizes and that females are moving among the different nursery areas. The BC population showed the highest levels of allelic richness and genetic diversity, which in turn could be related to the observed divergence in this location. Significant diversity values can be the result of population expansion events, as some populations with high levels of diversity have also shown evidence of recent population growth (Liu *et al.* 2006); however, the observed divergence may also be the result of a small sample size. Although the sample size for BC ( $n = 10$ ) and OAX ( $n = 9$ ) was relatively small, it is comparable to previously published elasmobranch studies (Duncan *et al.* 2006). The low frequency of alleles 226, 228, and 230 in the *Cli-12* locus for the BC population, alleles that showed the highest frequency in the rest of the locations studied, may have resulted from the lack of representative samples, producing an artificial divergence signal at that site. Nance *et al.* (2011) also detected, using microsatellite data, significant population divergence among samples from the Mexican Pacific and Central America and a reduction in size of populations.

#### Population expansion and gene flow

The gene flow values observed suggest a recent pattern of gene flow for microsatellite data, showing a significant decrease in migration to the central region, while the northern and southern regions have similar levels of gene flow. This

convertido en una herramienta importante para la obtención de información genética dentro del contexto histórico. En contraste, el ADN nuclear, como los microsátélites, posee una alta tasa mutacional, lo que permite la detección de procesos evolutivos en una escala más reciente. Por estas razones, la señal de divergencia observada con datos de microsátélites entre la región norte con respecto al resto de las poblaciones, no detectada con los datos de ADNmt, puede deberse a una señal histórica de flujo génico entre las localidades del océano Pacífico mexicano. Así, la similitud entre las localidades separadas espacialmente puede ser el resultado de flujo génico ancestral propiciado por el sistema de corrientes de la región. La corriente de California, con dirección norte-sur, y la corriente costanera de Costa Rica, con dirección sur-norte, pueden estar favoreciendo el intercambio de individuos entre estas dos regiones durante los procesos de expansión demográfica y/o espacial. Nuestros resultados del análisis de ADNmt muestran un patrón de homogeneidad genética que ha sido observado en *S. lewini* en la misma área (Duncan *et al.* 2006, Nance *et al.* 2011), sugiriendo una fuerte interacción ancestral entre las poblaciones del Pacífico mexicano. Este mismo patrón de homogeneidad genética ha sido observado en otras especies de peces pelágicos de la misma área mediante el uso de marcadores mitocondriales (Díaz-Jaimes *et al.* 2006).

Sin embargo, nuestros datos son congruentes con una divergencia reciente, detectada mediante el análisis de microsátélites en algunas de las localidades del Pacífico mexicano (BC en relación con el resto de las localidades, y SIN y NAY en relación con BCS). Las diferencias observadas en los índices de divergencia mostraron dos patrones que están relacionados con los tiempos evolutivos de cada marcador, sugiriendo que la reciente divergencia entre BC y BCS puede estar relacionada con el cambio del tamaño poblacional y la migración de hembras entre diferentes áreas de crianza. La población de BC mostró los niveles más altos de riqueza alélica y diversidad genética, que a su vez podrían estar relacionadas con la divergencia observada en esta localidad. Los valores significativos de diversidad pueden ser el resultado de eventos de expansión poblacional, ya que los altos niveles de diversidad genética de algunas poblaciones también han mostrado evidencia de un crecimiento poblacional reciente (Liu *et al.* 2006); sin embargo, la divergencia observada también puede ser el resultado de tamaños de muestra pequeños. Aunque los tamaños de muestra de BC ( $n = 10$ ) y OAX ( $n = 9$ ) son relativamente pequeños, son comparables con los de publicaciones previas de estudios sobre elasmobranchios (Duncan *et al.* 2006). La baja frecuencia de los alelos 226, 228 y 230 del *locus Cli-12* en BC, alelos que muestran una alta frecuencia en el resto de las localidades estudiadas, puede ser el resultado de una disminución relativa de la muestra, produciendo una señal de divergencia artificial en esta localidad. Nance *et al.* (2011) también detectaron divergencia poblacional significativa, mediante datos de

pattern is consistent with the differentiation observed between the northern and southern regions suggesting the existence of the two genetic units shown by the analysis of population structure using STRUCTURE and Evanno. The pattern of population divergence detected with microsatellites may be the result of recent migration among the regions examined and, consequently, we did not observe differences with the mitochondrial data. In addition, the decrease in effective population size reported for this species (Nance *et al.* 2011) may be involved in the process of population divergence.

A prolonged residence of individual hammerhead sharks has been observed off coastal areas and islands near Hawaii (Kohler and Turner 2001). In this case, the presence of males off the islands of the central region of the Mexican Pacific, either for feeding or mating, limits their dispersal and produces a different signal of divergence in the mtDNA data compared to that observed in microsatellites.

The signal of the recent divergence observed might be due to the decline of populations and to their confinement to areas of high productivity such as the mouth of the Gulf of California and the Gulf of Tehuantepec, resulting in a diminished connectivity among populations because of the prolonged residence of individuals in these areas. The decline in population size is congruent with the low or absent diversity observed in the populations of the northern (BC and BCS) and southern (OAX and CHIP) sites of the Mexican Pacific. Moreover, the cases where population structure detected by mtDNA does not show a clear signal of recent divergence are associated with the low mutation rate of the mtDNA control region.

The evidence of bottlenecks for the central populations in the Mexican Pacific (NAY and MICH) detected through mtDNA data is similar to that found by Nance *et al.* (2011) with microsatellite data for different populations of *S. lewini* in the Mexican Pacific, as well as globally. These bottlenecks may be related to the significant decline of population sizes observed for this species through both markers.

The trend towards a reduction in the effective number of females in the populations of the Mexican Pacific is consistent with that reported by Nance *et al.* (2011) for the north-eastern Pacific region. The time when this reduction occurred in the Mexican Pacific is seemingly recent, 2000–2500 years ago according to mtDNA data, more recent than the estimate of 6000–8000 years obtained by Nance *et al.* (2011) for the same area through microsatellites.

Populations exhibiting higher genetic diversity are likely the result of migration from populations with different genetic characteristics. Migrating individuals may modify the genetic pool of recipient populations and produce higher allelic/haplotype diversity. The recipient populations are localized in highly productive areas that serve as feeding grounds promoting the arrival and mixture of individuals from distant populations. Highly diverse populations allow

microsatélites, dentro de muestras del Pacífico mexicano y de América Central y una reducción en el tamaño de las poblaciones.

#### Expansión poblacional y flujo génico

Los valores de flujo génico detectados muestran un flujo reciente según los datos obtenidos de los microsatélites, con una notable disminución migratoria hacia la región central, mientras que las regiones norte y sur muestran niveles similares de flujo génico. Este patrón es consistente con la diferenciación observada entre las regiones del norte y del sur, sugiriendo la existencia de las dos entidades genéticas detectadas mediante el análisis de estructura poblacional realizado con STRUCTURE y Evanno. El patrón de divergencia poblacional detectado mediante los microsatélites puede estar influenciado por migraciones recientes entre las regiones analizadas y, consecuentemente, no se observaron diferencias mediante los datos mitocondriales. Adicionalmente, la disminución del tamaño efectivo poblacional detectado en esta especie (Nance *et al.* 2011) puede formar parte del proceso de divergencia poblacional.

Se ha observado que algunos tiburones martillo permanecen largos periodos frente a las áreas costeras y las islas cercanas a Hawaii (Kohler y Turner 2001). En estos casos, la presencia prolongada de machos frente a las islas de la región central del Pacífico mexicano, ya sea para alimentarse o para aparearse, limita su dispersión y genera una señal de divergencia diferente en los datos del ADNmt en comparación a la observada mediante microsatélites.

La señal de divergencia reciente observada puede deberse a la disminución de los tamaños de las poblaciones y a su confinamiento en zonas de alta productividad como la boca del golfo de California y el golfo de Tehuantepec, resultando en una conectividad disminuida entre las poblaciones debido al largo tiempo de residencia de algunos tiburones en esas áreas. La disminución de los tamaños poblacionales concuerda con la baja o nula diversidad observada en las poblaciones de las zonas norte (BC y BCS) y sur (OAX y CHIP) del Pacífico mexicano. No obstante, los casos en que la estructura poblacional detectada por ADNmt no muestra una señal clara de divergencia reciente se asocian con las bajas tasas de mutación de la región control del ADNmt.

La evidencia de cuellos de botella en las poblaciones del Pacífico central mexicano (NAY y MICH) detectada por datos procedentes del ADNmt es similar a la encontrada por Nance *et al.* (2011) con datos de microsatélites provenientes de diferentes poblaciones de *S. lewini* del Pacífico mexicano y de otras partes del mundo. Esos cuellos de botella pueden estar relacionados con el declive significativo de los tamaños poblacionales detectados en esta especie mediante ambos marcadores.

La tendencia hacia la reducción del número efectivo de hembras en las poblaciones del Pacífico mexicano es congruente con los resultados de Nance *et al.* (2011) sobre lo

for the maintenance of equilibrium between genetic drift and migration becoming a genetic richness reservoir that should be conserved (e.g., avoiding overfishing in order to maintain the population's genetic diversity).

Historical climate processes, such as the glacial-interglacial cycles that occurred during the Pleistocene, have produced changes in the direction of ocean currents as well as modified both surface temperature and sea level (Alvarado-Bremer *et al.* 2005). The resultant drastic changes in ecological patterns have caused extinction-recolonization processes and/or population expansions (Grant and Bowen 1998). In this study, the parameters of historical demography were consistent with the occurrence of population growth processes preceded by a significant reduction in population size, according to the sudden expansion model. It has been documented that such processes can have an impact on the current genetic composition of populations (Lecomte *et al.* 2004). Therefore, the divergence signal observed by microsatellite analysis (SIN and NAY) must be the result of population expansion processes in the central Mexican Pacific region. The demographic and/or spatial expansion in central Mexican Pacific locations could be caused by a decrease in surface water temperature, as has been observed for other pelagic species (Rohfritsch and Borsa 2005). The spatial expansion of populations may have occurred in response to the emergence of oceanographic conditions favorable for the species, which may be related in turn to geological events that occurred during interglacial periods, some 350,000–450,000 years ago. It has been suggested that during the glacial-interglacial cycles of the Pleistocene, significant changes occurred in oceanographic processes, like increased nutrient concentrations associated with thermocline depth (Cannariato and Ravelo 1997). These oceanographic changes that occurred in the eastern Pacific Ocean during the Plio-Pleistocene era could have generated new environments with advantageous features, which led to expansion and recolonization processes and population growth for *S. lewini*. Due to the oceanographic changes, new areas were generated with favorable conditions that promoted these expansion processes and population growth.

#### CONCLUSIONS

Our results clearly show different patterns of genetic structure in the scalloped hammerhead shark *S. lewini*, possibly reflecting different evolutionary times, according to the characteristics of each marker. This new information about the genetic structure of *S. lewini* in the northern Mexican Pacific is relevant to fisheries management processes. Based on the presence of populations with high genetic diversity and divergence, the areas of the mouth of the Gulf of California and the Gulf of Tehuantepec may be considered genetic diversity reservoirs since both areas are also recognized as breeding and feeding sites that foster the residence of organisms from different populations.

que ha ocurrido en la región nororiental del Pacífico. La época de esta disminución en el Pacífico mexicano es aparentemente reciente, hace 2000–2500 años de acuerdo con nuestros datos de ADNmt, más reciente que la estimación de 6000–8000 años obtenida por Nance *et al.* (2011) para la misma zona mediante microsatélites.

Las poblaciones que muestran mayor diversidad genética son probablemente el resultado de migraciones procedentes de poblaciones con características genéticas diferentes. Los individuos migrantes pudieran modificar el acervo génico de las poblaciones receptoras y producir una mayor diversidad alélica y haplotípica. Las poblaciones receptoras se encuentran en zonas de alta productividad, que sirven como áreas de alimentación, promoviendo la llegada y la mezcla de individuos provenientes de poblaciones distantes. Las poblaciones con mayores niveles de diversidad permiten el mantenimiento del equilibrio entre la deriva génica y la migración, convirtiéndose en reservorios de riqueza genética que debe ser conservada (e.g., evitando la sobrepesca a fin de mantener la diversidad genética de las poblaciones).

Los procesos climáticos históricos, como los ciclos glaciales e interglaciales que han ocurrido durante el Pleistoceno, han producido tanto cambios en la dirección de las corrientes oceánicas como modificaciones de la temperatura superficial y el nivel de los océanos (Alvarado-Bremer *et al.* 2005). Estos cambios drásticos en los patrones ecológicos han llevado a procesos de extinción y de recolonización y/o a expansiones poblacionales (Grant y Bowen 1998). En el presente estudio, los parámetros de demografía histórica fueron congruentes con la incidencia de procesos de crecimiento poblacional precedidos de una reducción significativa del tamaño de la población, de acuerdo con el modelo de expansión poblacional súbita. Se ha documentado que tales procesos pueden afectar la composición genética de las poblaciones en ese momento (Lecomte *et al.* 2004). Por ello, la señal de divergencia observada mediante el análisis de microsatélites (SIN y NAY) debe ser el resultado de procesos de expansión poblacional en la región central del Pacífico mexicano. Las expansiones demográficas y/o espaciales en las localidades del Pacífico central mexicano pudieron haber sido causadas por una disminución en la temperatura superficial del agua, tal como se ha observado en otras especies pelágicas (Rohfritsch y Borsa 2005). La expansión espacial de las poblaciones pudo haber ocurrido en respuesta a la aparición de condiciones oceanográficas favorables para la especie, que a su vez pueden estar vinculadas a los eventos geológicos acontecidos durante los periodos interglaciales hace aproximadamente 350,000–450,000 años. Se ha sugerido que durante los ciclos glaciales-interglaciales del Pleistoceno ocurrieron cambios importantes en los procesos oceanográficos, como concentraciones acrecentadas de nutrientes asociadas con la profundidad de la termoclina (Cannariato y Ravelo 1997). Estos cambios oceanográficos del Pacífico oriental durante la era Plio-Pleistocénica

The mouth of the Gulf of California and the Gulf of Tehuantepec are relevant for the migration of sharks because of their high productivity. In these areas, important numbers of pregnant females arriving from different places are observed yearly (Alejo-Plata *et al.* 2006a, b; Salomón-Aguilar *et al.* 2009). Management measures, such as establishing closed seasons for fishing, permanently monitoring the size and age of fished individuals, and setting catch quotas based on population dynamics parameters, should be implemented for the areas considered feeding/breeding grounds. The northern (BC and BCS) and central (SIN and NAY) locations of the Mexican Pacific Ocean may represent genetically discrete population units, a possibility that must be considered when designing management strategies for their exploitation.

Likewise, the migration patterns estimated using both markers and the possible differential migration patterns between males and females should be further examined. The region of the Gulf of Tehuantepec likely represents a breeding and/or feeding area, where the size of captured individuals ought to be carefully regulated. It should be noted that high catch quotas in the northern and southern parts of the Mexican Pacific Ocean could bring about a reduction in population size. This would be particularly serious if the cohorts of *S. lewini* were composed mainly of juveniles and females, which are common in the Gulf of Tehuantepec. Overfishing would also seriously affect the migration of some of these individuals to other regions, movements that are required to maintain the gene flow between locations outside the central region of the Mexican Pacific Ocean.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) through the Support Program for Technological Innovation and Research Projects (PAPIIT IN-208408 and PAPIIT IN-223206). The first author acknowledges receipt of a postgraduate scholarship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, Mexico) and the training received during her doctoral studies in biological sciences at UNAM. We thank V Anislado-Tolentino, F Galván-Magaña, and J Sandoval-Castillo for help in obtaining the samples in Michoacán, Baja California, and Baja California Sur.

#### REFERENCES

- Alejo-Plata MC, Cerdanars GLG, González GM. 2006a. La pesca de tiburón en la costa chica de Oaxaca, México, 2000–2003. In: Salas S, Cabrera MA, Ramos J, Flores D, Sánchez J (eds.), *Memorias Primera Conferencia de Pesquerías Costeras en Latinoamérica y el Caribe: Evaluando, Manejando y Balanceando Acciones*. EPOMEX, México, pp. 22–38.
- Alejo-Plata MC, Ramos SC, Cruz JLR. 2006b. La pesquería artesanal del tiburón en Salina Cruz, Oaxaca, México. *Ciencia y Mar* 30: 37–51.

podieron haber generado nuevos entornos con características ventajosas que propiciaron los procesos de expansión y recolonización y de crecimiento poblacional de *S. lewini*. Debido a los cambios en la oceanografía, se generaron nuevas áreas con condiciones favorables que facilitaron estos procesos de expansión y de crecimiento poblacional.

#### CONCLUSIONES

Nuestros resultados mostraron claramente patrones de estructuración genética en el tiburón martillo *S. lewini*, probablemente reflejando momentos evolutivos distintos, de acuerdo con las características de cada uno de los marcadores utilizados. La nueva información sobre la estructura genética de *S. lewini* en el región norte del océano Pacífico mexicano es de relevancia para los procesos de gestión de las pesquerías. Con base en la presencia de poblaciones con alta diversidad y divergencia genética, las zonas de la boca del golfo de California y el golfo de Tehuantepec podrían ser consideradas como reservorios de diversidad genética, ya que ambas regiones, que han sido reconocidas como sitios de alimentación y reproducción, fomentan que organismos provenientes de diferentes poblaciones allí residan.

La boca del golfo de California y el golfo de Tehuantepec son relevantes para las migraciones de los tiburones por su alta productividad. En estas zonas se observan anualmente grandes cantidades de hembras preñadas llegadas de diferentes lugares (Alejo-Plata *et al.* 2006a, b; Salomón-Aguilar *et al.* 2009). Se deben adoptar medidas de manejo para estas áreas de alimentación o de crianza, tales como temporadas de veda, monitoreo permanente del tamaño y edad de los tiburones capturados y como la determinación de una cuota de captura basada en los parámetros derivados de la dinámica de sus poblaciones. Las localidades del norte (BC y BCS) y el centro (SIN y NAY) del Pacífico mexicano pueden representar unidades poblacionales genéticamente diferenciadas, lo que debe ser considerado en el diseño de las estrategias de manejo para su explotación.

De la misma manera, los patrones migratorios estimados a través del uso de ambos marcadores y la factible migración diferencial entre machos y hembras deben ser estudiados con mayor detalle. En la región del golfo de Tehuantepec, que se ha identificado como un área de crianza y de alimentación, el tamaño de los individuos capturados debería ser cuidadosamente regulado. Debe hacerse notar que altas cuotas de captura en las regiones norte y sur del Pacífico mexicano podrían ocasionar una reducción en el tamaño poblacional. Esto sería particularmente serio si las cohortes de *S. lewini* estuvieran conformadas principalmente por juveniles y hembras, que son frecuentes en el golfo de Tehuantepec. La sobrepesca igualmente afectaría la migración de algunos de estos individuos a otras regiones, migración que es necesaria para mantener el flujo génico entre las localidades fuera de la región central del océano Pacífico mexicano.

Castillo-Olguín *et al.*: Genetic differentiation of *Sphyrna lewini* in the Mexican Pacific

- Alvarado-Bremer JR, Viñas J, Mejuto J, Ely B, Pla C. 2005. Comparative phylogeography of Atlantic bluefin tuna and swordfish: The combined effects of vicariance, secondary contact, introgression, and population expansion on the regional phylogenies of two highly migratory pelagic fishes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 36: 169–187.
- Beerli P. 2002. MIGRATE Documentation. Version 1.6, <http://evolution.genetics.washington.edu/lamarc/MIGRATE.html>, Seattle, WA, accessed on 07 June 2010.
- Cannariato KG, Ravelo AC. 1997. Pliocene-Pleistocene evolution of eastern tropical Pacific surface water circulation and thermocline depth. *Paleoceanography* 12: 805–820.
- Carvalho GR, Hauser L. 1994. Molecular genetics and the stock concept in fisheries. *Rev. Fish Biol. Fish.* 4: 326–350.
- Creste S, Tulmann AN, Figueira A. 2001. Detection of single repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Mol. Biol. Rep.* 19: 299–306.
- Díaz-Jaimes P, Uribe-Alcocer M, Ortega-García S, Jehn-Dominique D. 2006. Spatial and temporal mitochondrial DNA genetic homogeneity of dolphinfish populations (*Coryphaena hippurus*) in the eastern central Pacific. *Fish. Res.* 80: 333–338.
- Drummond AJ, Rambaut A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analyses by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 7: 214.
- Duncan KM, Martin AP, Bowen BW, De Couet HG. 2006. Global phylogeography of the scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*). *Mol. Ecol.* 15: 2239–2251.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: A simulation study. *Mol. Ecol.* 14: 2611–2620.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin version 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online* 1: 47–50.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567–1587.
- FAO. 2009. Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service 24/04/2009. <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-capture-production/query/es>
- Goudet J. 1999. PCA-GEN version 1.2.2, <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/pcagen.htm>. Accessed on 09 September 2010.
- Goudet J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/softwares/fstat.html>. Accessed on 10 September 2010.
- Grant WS, Bowen BW. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *J. Hered.* 89: 415–425.
- Guo SW, Thompson EA. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48: 361–372.
- Hall T. 2004. BioEdit Sequence Alignment Editor, version 7. Copyright 1997–2004.
- Hayashi K. 1999. Recent enhancements in SSCP. *Gen. Anal. Biomol. Eng.* 14: 193–196.
- Keeney DB, Heist EJ. 2003. Characterization of microsatellite loci isolated from the blacktip shark and their utility in requiem and hammerhead sharks. *Mol. Ecol. Notes* 3: 501–504.
- Klimley AP, Butler SB. 1988. Immigration and emigration of a pelagic fish assemblage to seamounts in the Gulf of California related to water mass movements using satellite imagery. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 49: 11–20.
- Kohler NE, Turner PA. 2001. Shark tagging: A review of conventional methods and studies. *Environ. Biol. Fish.* 60: 191–223.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado con presupuesto otorgado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) mediante el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) a través de los proyectos IN-208408 y IN-223206. Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada al primer autor y al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por la formación recibida durante sus estudios de Doctorado. También se agradece a V Anislado-Tolentino, F Galván-Magaña y J Sandoval-Castillo su ayuda para obtener las muestras de Michoacán, Baja California y Baja California Sur.

- Kukita YK, Tahira T, Sommer SS, Hayashi K. 1997. SSCP Analysis of long DNA fragments in low pH gel. *Hum. Mutat.* 10: 400–407.
- Kumar S, Tamuna K, Nei M. 2004. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* 5: 150–163.
- Lecomte F, Grant WS, Dodson JJ, Rodriguez-Sanchez R, Bowen BW. 2004. Living with uncertainty: Genetic imprints of climate shifts in East Pacific anchovy (*Engraulis mordax*) and sardine (*Sardinops sagax*). *Mol. Ecol.* 13: 2169–2182.
- Liu JX, Gao TX, Zhuang ZM, Jin XS, Yokogawa K, Zhang YP. 2006. Late Pleistocene divergence and subsequent population expansion of two closely related fish species, Japanese anchovy (*Engraulis japonicus*) and Australian anchovy (*Engraulis australis*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 40: 712–723.
- Nance HA, Klimley P, Galván-Magaña F, Martínez-Ortiz J, Marko PB. 2011. Demographic processes underlying subtle patterns of population structure in the scallop hammerhead shark, *Sphyrna lewini*. *Plos One* 6: 21459–21459.
- Orita M, Iwahana H, Kanasawa H, Hayashi K, 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.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
- Rice WR. 1989. Analyzing tables of statistical test. *Evolution* 43: 223–225.
- Rohlfritsch A, Borsa P. 2005. Genetic structure of Indian scads mackerel *Decapterus russelli*: Pleistocene vicariance and secondary contact in the central Indo-West Pacific seas. *Heredity* 95: 315–326.
- Rousset F. 2008. Genepop'007: A complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resour.* 8: 103–106.
- Ryman N, Palm S. 2006. POWSIM: A computer program for assessing statistical power when testing for genetic differentiation. *Mol. Ecol. Notes* 6: 600–602.
- SAGARPA, Secretaría 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, México, pp. 1–4.

*Ciencias Marinas*, Vol. 38, No. 4, 2012

- Salomón-Aguilar CA, Villavicencio-Garayzar CF, Reyes-Bonilla H. 2009. Shark breeding grounds and seasons in the Gulf of California: Fishery management and conservation strategy. *Cienc. Mar.* 35: 369–388.
- Stoner DS, Grady JM, Priede KA, Quattro JM. 2003. Amplification primers for the mitochondrial control region and sixth intro of nuclear-encoded lactate dehydrogenase A gene in elasmobranch fishes. *Conserv. Genet.* 4: 805–808
- Tripp-Valdez MA, García de León FJ, Ortega-García S, Lluch-Cota D, López-Martínez J, Cruz P. 2010. Population genetic structure of dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) in the Gulf of California, using microsatellite loci. *Fish. Res.* 105: 172–177.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills PMD, Shipley P. 2004. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* 4: 535–538.
- Ward RD. 2000. Genetics in fisheries management. *Hidrobiologia* 420: 191–201.
- Weber JL, Wong C. 1993. Mutation of human short tandem repeats. *Hum. Mol. Genet.* 2: 1123–1128.

*Received January 2012,  
received in revised form August 2012,  
accepted August 2012.*

## ANEXOS

### Anexo 1

Valores de migrantes obtenidos en cada corrida de MIGRATE para datos de mtDNA.

<b>M</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
M 2-1	361,5	350,7	551	474,4	641,8
M 3-1	587	321	493,4	506,8	400,5
M 4-1	358,4	438,8	529,6	638,3	430,9
M 5-1	682,1	380,9	351,4	656,6	405,5
M 6-1	678,4	269,9	608,9	652,3	567,7
M 7-1	661,7	342,1	670,8	588,6	650,6
M 8-1	265,7	679,3	749	593,8	446,8
M 9-1	563,4	250,4	514,4	416	554,3
M 1-2	364	553,4	603,9	424,9	279,5
M 3-2	576,5	650,2	384,6	471,4	624,4
M 4-2	498,4	495,8	707,9	433,3	180,1
M 5-2	711,7	479,6	541,4	696,5	417,8
M 6-2	434,4	551,7	474,1	387,2	391,7
M 7-2	390,6	539,1	586,6	563,2	189
M 8-2	253,7	428,7	364,3	525,8	279,9
M 9-2	430,8	425,7	349,1	606,3	155,6
M 1-3	640,5	523,8	280,8	529,4	107,5
M 2-3	226,5	573	516,8	556,7	404
M 4-3	174,3	364	273,9	299,4	215,9
M 5-3	443,2	570,3	329,5	595,9	203,9
M 6-3	497,2	283,2	215,9	380,6	254,1
M 7-3	647	650,9	425,4	309,8	228,9
M 8-3	271,5	397,4	167,5	561,8	296,9
M 9-3	197,4	784,5	326,5	223,6	200,4
M 1-4	311	524,2	544,8	246,9	260,8
M 2-4	333,9	125,8	540,1	479	334,1
M 3-4	688	319,9	573,6	742	658,4
M 5-4	672,7	119,5	238,5	602,5	293,1
M 6-4	729,6	547	378,5	426,9	518,1
M 7-4	529,6	188	484	378,4	221,2
M 8-4	160,7	226,3	195,4	445,4	158,6
M 9-4	154,1	130,6	150,7	205,3	128,2
M 1-5	207,1	721,6	490,3	365,1	660,5
M 2-5	418,2	649,4	466,8	218,6	572,3

---

M 3-5	756,5	500	143,2	434,3	477,8
M 4-5	666,7	752,6	222,4	232,8	541,6
M 6-5	478,9	630,9	457,2	114,7	710,7
M 7-5	625,5	507,6	685,6	180,6	522,1
M 8-5	289,6	492,5	315,8	337,4	406,5
M 9-5	223,8	506,3	203,4	277,8	225,1
M 1-6	555,3	320,2	614,7	437,7	410
M 2-6	526,2	220,4	552	756,4	554,5
M 3-6	419,6	458,3	403,2	287,5	396,8
M 4-6	400,8	264,5	660,7	691,5	414
M 5-6	781,2	408,6	686,9	491,3	445,5
M 7-6	432,7	588,1	513,9	516,7	659,6
M 8-6	298,3	298,2	442,5	459,5	383,6
M 9-6	510,4	440,6	453,6	315,9	618,7
M 1-7	392,6	567,9	707,1	589	415,3
M 2-7	685,6	503,2	701,3	545,6	422
M 3-7	174,2	418,7	661,9	423,2	520
M 4-7	200,8	519,9	473,2	476,7	493,1
M 5-7	258,1	544,1	425,5	408,4	281,3
M 6-7	660,8	464,4	516,9	512,8	532,4
M 8-7	482,9	402,7	339,9	548,3	470,7
M 9-7	657,5	382,8	536,8	400,4	294,2
M 1-8	342,9	311,4	251,9	571,5	515,8
M 2-8	44,6	489	268,5	452	558,8
M 3-8	365,1	600,8	558,6	444,2	528,9
M 4-8	613	603,4	195,7	451,8	307,2
M 5-8	457,3	456,4	596,8	511,7	350,4
M 6-8	405,8	555,6	346,3	494,7	406,9
M 7-8	356,9	499,1	542,5	567,8	504,5
M 9-8	760,5	533,9	378,9	565	661,9
M 1-9	473,4	271,4	380,5	544,2	529,8
M 2-9	381,5	546,1	412,6	483	294,8
M 3-9	483,5	486,5	375,2	213,8	473,2
M 4-9	685,9	443,2	455,8	210,9	551,3
M 5-9	671,1	534,3	578,4	281,1	320,3
M 6-9	585,8	303,7	470,4	221,3	298,3
M 7-9	743,9	346,4	468	241,7	412,2
M 8-9	513,5	361,8	511,5	230,5	579,9

---

Anexo 2

Valores de migrantes obtenidos en cada corrida de MIGRATE para datos de microsatélites.

<b>M</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
M 2-1	436.417	570.010	708.908	551.767	728.915
M 3-1	463.961	543.614	674.218	617.685	581.526
M 4-1	387.190	320.872	661.388	313.772	485.216
M 5-1	545.505	654.782	748.480	404.482	693.957
M 6-1	619.728	355.999	702.132	418.997	389.415
M 7-1	424.325	356.445	644.613	571.111	600.810
M 8-1	437.335	734.125	696.973	557.554	572.330
M 9-1	669.855	480.639	799.536	488.062	574.674
M 1-2	242.478	354.656	546.931	101.213	394.077
M 3-2	199.368	361.208	166.824	460.012	296.560
M 4-2	492.052	254.380	639.538	287.526	471.776
M 5-2	195.600	384.823	528.834	394.366	284.836
M 6-2	401.871	399.587	221.027	542.203	218.592
M 7-2	289.180	173.610	542.044	135.033	55.564
M 8-2	412.950	360.879	466.227	405.952	534.413
M 9-2	420.617	134.935	527.023	339.213	372.640
M 1-3	34.981	19.410	15.437	47.074	12.383
M 2-3	46.336	22.023	30.252	39.530	192.853
M 4-3	100.337	136.951	120.475	80.264	42.963
M 5-3	32.104	37.103	28.396	70.510	21.558
M 6-3	25.875	23.470	23.762	7.304	7.142
M 7-3	29.070	35.381	40.192	72.946	20.556
M 8-3	50.884	25.231	10.163	10.198	16.003
M 9-3	111.931	162.752	21.363	29.236	30.379
M 1-4	44.537	44.804	7.970	127.460	11.288
M 2-4	81.837	212.982	11.394	28.013	14.950
M 3-4	130.268	307.888	46.601	159.069	104.280
M 5-4	32.866	81.516	7.529	15.867	14.092
M 6-4	25.609	33.500	9.884	114.607	5.746
M 7-4	156.987	206.888	20.828	60.872	39.918
M 8-4	154.385	87.255	59.876	47.623	21.166
M 9-4	83.254	78.163	9.607	37.406	19.563
M 1-5	279.059	213.876	147.649	299.905	438.166
M 2-5	177.283	174.535	168.643	192.830	460.436
M 3-5	322.431	249.980	272.464	384.053	375.834

---

M 4-5	151.369	542.503	360.938	431.547	514.019
M 6-5	388.782	247.617	116.878	456.701	239.462
M 7-5	468.996	196.877	548.392	130.198	594.693
M 8-5	325.986	106.564	439.909	232.904	336.316
M 9-5	76.455	484.289	233.942	608.630	385.660
M 1-6	431.243	410.822	607.487	546.107	427.133
M 2-6	730.279	350.002	671.745	547.592	528.580
M 3-6	700.782	694.527	542.686	755.662	646.074
M 4-6	539.228	624.253	182.575	594.282	601.820
M 5-6	744.647	568.999	563.988	563.375	616.593
M 7-6	544.320	510.894	591.229	585.622	487.451
M 8-6	449.490	684.003	256.267	484.650	680.763
M 9-6	616.453	524.503	683.159	696.866	657.427
M 1-7	660.356	401.105	36.348	603.959	584.827
M 2-7	391.177	450.062	523.530	416.502	397.252
M 3-7	581.746	547.318	180.796	667.900	31.452
M 4-7	529.904	148.294	503.324	383.490	405.153
M 5-7	539.075	526.855	460.728	652.732	540.492
M 6-7	541.355	634.055	328.254	588.431	253.512
M 8-7	577.507	486.470	271.202	562.299	242.334
M 9-7	660.200	678.160	349.899	652.892	34.091
M 1-8	697.617	320.360	629.568	610.345	138.871
M 2-8	528.278	826.968	572.713	595.489	452.295
M 3-8	563.235	653.905	650.074	644.560	573.635
M 4-8	398.063	500.436	745.594	714.288	502.225
M 5-8	648.022	431.278	609.124	540.357	360.288
M 6-8	540.300	351.980	733.679	296.673	536.386
M 7-8	626.620	638.136	402.548	698.066	392.055
M 9-8	794.762	218.093	565.617	720.881	643.807
M 1-9	301.070	39.384	235.787	389.724	206.018
M 2-9	413.049	393.638	209.777	609.201	285.625
M 3-9	399.122	178.190	385.096	511.367	522.107
M 4-9	472.934	266.642	240.640	432.836	213.268
M 5-9	334.106	240.196	107.329	607.595	170.001
M 6-9	130.755	248.003	188.198	516.442	72.286
M 7-9	394.341	89.515	77.772	532.319	325.954
M 8-9	651.404	142.378	293.461	250.587	229.988