



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DIVERGENCIA GENÉTICA DE LA REGIÓN ND4 DEL  
MTDNA DE *Sphyrna tiburo* EN COSTAS DEL GOLFO DE  
MÉXICO Y FLORIDA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

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

**ELSA GABRIELA MARTÍNEZ ANDRADE**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. PÍNDARO DÍAZ JAIMES  
2017**

**Ciudad Universitaria, CDMX**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## Hoja de datos del jurado

### 1. Datos del alumno

Martínez  
Andrade  
Elsa Gabriela  
58 41 94 52  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
307194325

### 2. Datos del tutor

Dr.  
Píndaro  
Díaz  
Jaimes

### 3. Datos del sinodal

Dr.  
Lev Orlando  
Jardón  
Barbolla

### 4. Datos del sinodal

M. en C.  
Enrique  
Scheinvar  
Gottdiener

### 5. Datos del sinodal

M. en C.  
Luis  
Espinosa  
Arrubarrena

### 6. Datos del sinodal

M en C.  
Nataly  
Bolaño  
Martínez

### 7. Datos del trabajo escrito

Divergencia genética de la región ND4 del mtDNA de *Sphyrna tiburo* en costas del Golfo de México y Florida.  
101 pp.  
2017

A mis padres  
por ser mis mayores soportes en la vida,  
por todo su cariño y amor incondicional.

*Todo estaba en suspenso, en completa calma, en silencio total, sin moverse, sin existir nada, ni el tiempo, ni el espacio.*

*En ese momento inicial no había hombres, animales, pájaros, pescados, árboles, piedras, barrancas, ni siquiera yerbas. Sólo estaba el vacío infinito del Cielo. Aún no se veía la superficie de la Tierra; sólo estaba el mar represado, y sólo el vacío del Cielo.*

*Sólo estaba el Creador y Formador; los gérmenes de las cosas estaban puestos por Él, con toda pureza, en las aguas.*

*Estos gérmenes iniciales estaban cubiertos, como el quetzal, por sus plumas verdes, por eso a ellos se les llama **Gucumatz**. Eran grandes sabios, de gran entendimiento. Por eso también al germen de lo que existe en el Cielo se le llama Corazón del Cielo...*

*Primero se dijo: “Esta agua se desembarace, y cuando se refine en mares y ríos, quede la Tierra. Así quedará todo limpio y se podrá sembrar cuando nazcan los hombres”.*

*Y sólo expresaron su idea, y con sólo decirlo, se formó todo el mundo*

*De las aguas fue surgiendo, en retazos, la neblina y al bajar de nivel las aguas, fueron surgiendo los montes, como carapachos de cangrejos...*

*Y en un instante empezaron a brotar los cipreses y los pinos en toda la superficie de la Tierra.*

*Y así, al ver que todo había germinado, se alegró **Gucumatz**.*

*En primer lugar quedó formada la Tierra con sus montes y llanos. Los caminos de agua, los ríos se dividieron en muchos arroyos que corrieron por valles.*

*Y así fue formada la Tierra, cuando se creó por Corazón del Cielo y por Corazón de la Tierra.*

**Popol Vuh. Anónimo.**

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi segunda casa, por brindar un espacio plural, intelectual y sobre todo gratuito. Al pueblo de México, sin ustedes todo esto no tendría sentido. A todas las personas que se han sentido agredidas en un país con tantos recursos en muchos sentidos, pero tan pobre gracias a las políticas maquiavélicas. A esos individuos que han sido privados de su libertad por su postura crítica, a todas las personas que trabajan para forjar un mejor país.

Al doctor Píndaro por darme la oportunidad de maravillarme cada día más de los tiburones y lo fantástico que es el mar, por todo su apoyo y dedicación a lo largo de éste trabajo, por los consejos y salidas a campo. Al doctor Uribe Alcocer gracias por brindarme la oportunidad de trabajar con peces. A mis sinodales Enrique Scheinvar, por las interminables horas de discusión para enriquecer este trabajo y por ser un excelente profesor, a Lev Jardón por compartir su conocimiento y ser un extraordinario maestro, a Luis Espinosa por su tiempo y valiosas aportaciones, a Nataly Bolaño por la gran inmersión en este mundo de depredadores (no, no hablo de los políticos, sino de tiburones) gracias por todo.

A Elena Escatel-Luna por permitirme trabajar con sus secuencias mitocondriales de la región control que serán analizadas en el presente estudio, por todo tu cariño y ser una gran amiga, ¡sí! por esos de momentos de discusión que mejoraron este trabajo. A todos mis amigos y compañeros del laboratorio: Cristóbal, Ángeles y Josué, gran apoyo siempre, Nadia, José, Nataly, Silvia, Paola y Andrea, por su alegría y por enseñarme tanto de tiburones, mantas y rayas. A Erika, Caro, “Huachi”, Natalia y Linda gracias por sus palabras de aliento, por todos los momentos juntos dentro y fuera del laboratorio.

A mi madre por nunca dejarme caer, por tu amor, por ser tan comprensiva, amable y la mejor persona que conozco en este mundo. A mi padre por darme ánimos cuando más lo necesitaba, por todo tu cariño, tu paciencia y ser un gran apoyo siempre. A Fer que voluntaria o involuntariamente contribuiste en este gran logro. A Balam gran e inseparable compinche de los mejores y peores momentos a lo largo de esta gran aventura, aunque sé que nunca leerás estas palabras. Por alentarme a conocer la naturaleza desde pequeña y por alimentar de aventuras mi mente ¡gracias abuelitas!, l@s amo.

A mis amigos que no me alcanzarían las palabras para agradecerles todo lo que significan para mí. Los de siempre Noé, Erika, Yara y Héctor. Los del bello campus sur Laura (por ser una excelente amiga y compartir el amor por la ciencia, por todo tu apoyo en la facultad), Yezi, Marco, Gilbaja, Miguel, Dominique. Los aventureros Braulio, Lalo, Vic, Evelyn, Lulú, Iris. Los de CU, Tania (gran amiga en los mejores y peores momentos, gracias por tus consejos, sin ti nada hubiera sido igual), Fer (por todos esos momentos difíciles de los que salimos adelante, por ser tan linda) y Viri. A Cris, gracias por todo tu apoyo y cariño, por los momentos en el laboratorio y por ayudarme en todo siempre. Rox, Anita, “Nahual”, Angie... y los que me faltan.

A los buenos maestros que forjan cada día a base de tremendo esfuerzo ciudadanos comprometidos por el país y que cimientan las bases del pensamiento crítico. En especial a Luis Rodolfo, Luz Elena Lara, Victoria Ortega, Erick de Gortari Krauss y Luis Velázquez.

Finalmente, al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación Tecnológica PAPIIT DGAPA-UNAM IN208112 por su financiamiento.

# ÍNDICE

RESUMEN .....	8
I. INTRODUCCIÓN .....	9
II. ANTEDECENTES .....	13
2.1. Características diagnósticas y generales de la familia Sphyrnidae .....	13
2.2. Diagnósis de <i>Sphyrna tiburo</i> .....	14
2.3. Hábitat y distribución del tiburón cabeza de pala .....	16
2.4. Biología de <i>Sphyrna tiburo</i> .....	17
2.5. Evolución de los Elasmobranchii .....	19
2.5.1. Impacto de las glaciaciones en organismos marinos .....	21
2.5.2. Formación del Istmo de Panamá .....	21
2.5.3. Glaciación del Plioceno-Pleistoceno en Florida y el Golfo de México .....	23
2.6. Área de estudio .....	25
2.6.1. Masas de agua y condiciones físico-químicas .....	27
2.6.2. Ecorregiones marinas .....	27
2.7. Pesquería de tiburón .....	29
III. HIPÓTESIS .....	34
IV. OBJETIVOS .....	34
4.1. Objetivo general .....	34
4.2. Objetivos particulares .....	34
V. MÉTODOS .....	35
5.1. Colecta y preservación del material biológico .....	35
5.2. Extracción y amplificación del mtDNA .....	37
5.3. Análisis de datos .....	38
5.3.1. Parámetros de diversidad genética .....	39
5.3.2. Análisis de enrarecimiento de muestras .....	40
5.3.3. Estructura poblacional .....	40
5.3.4. Demografía histórica .....	42
5.3.5. Reconstrucción de la filogenia y red de haplotipos .....	46
VI. RESULTADOS .....	48
6.1. Diversidad genética .....	48
6.2. Enrarecimiento de muestras .....	49
6.3. Estructura poblacional .....	50
6.4. Demografía histórica .....	57
6.5. Reconstrucción de la filogenia y red de haplotipos .....	63
VII. DISCUSIÓN .....	67
7.1. Zonas de variación y estructura genética .....	67
7.2. Procesos demográficos y posibles causas ambientales e históricas .....	74
VIII. CONCLUSIONES .....	78
IX. PERSPECTIVAS .....	80
LITERATURA CITADA .....	81
ANEXOS .....	96

Martínez-Andrade G. 2017. Divergencia genética de la región ND4 del mtDNA de *Sphyrna tiburo* en costas del Golfo de México y Florida. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 101 pp.

## RESUMEN

*Sphyrna tiburo* es un tiburón perteneciente a la familia Sphyrnidae, restringido al continente americano, se captura ampliamente en Florida y es la especie que se pesca con mayor frecuencia en la zona de Campeche y Tabasco en México. El presente estudio se llevó a cabo en el Atlántico noroeste y Golfo de México, en seis poblaciones de Florida y dos del sureste mexicano. Se amplificaron 260 muestras de la región mtND4 con una longitud de fragmento de 819 pb, para así determinar el grado de divergencia genética entre las poblaciones que está ligado a los procesos evolutivos, con posibles implicaciones en la conservación de la especie. Los análisis del marcador ND4 mostraron valores de diversidad haplotípica  $Hd=0.190$  y nucleotídica  $\pi=0.00026$  con sólo 18 haplotipos; éstos son relativamente bajos comparando la misma región en otros tiburones. Por otro lado, se detectó diferenciación genética significativa de tres grandes grupos: Florida oeste, este y sureste mexicano, dicha estructura poblacional puede deberse a aspectos biológicos de la especie y la escasa vagilidad del tiburón. También se percibió una estructura genética más puntual en la región de Florida oeste con el análisis AMOVA, sólo al realizarlo en conjunto con la región control y ND4. De acuerdo a los análisis de demografía histórica alrededor de 151,364-79,630 años las poblaciones de *S. tiburo* pasaron por una expansión demográfica poblacional que coincide con la mayor parte del período interglaciar Illinois-Wisconsin. Finalmente el uso de los marcadores moleculares nos permite hacer inferencias del pasado y presente en distintas poblaciones de *S. tiburo* para aportar información evolutiva y genética, que permitan generar planes de conservación y manejo pesquero.

## I. INTRODUCCIÓN

La estructura genética poblacional de una especie es el resultado de los procesos microevolutivos y demográficos que actúan entre y dentro de las poblaciones, así como de la biogeografía histórica de los linajes genéticos. Debido a lo anterior, examinar la variación genética en las poblaciones, en un contexto biogeográfico, puede revelar asociaciones históricas y procesos que han derivado en la divergencia genética, que en su momento puede conducir a la especiación. El primer paso para inferir los procesos evolutivos de las poblaciones, es entender como han sido derivados los patrones de variación geográfica y si tienen una base genética asociada (Eguiarte *et al.*, 2007). De acuerdo con la teoría neutral de la evolución, la tasa de divergencia entre secuencias de DNA se da como consecuencia de sustituciones que se van acumulando con el paso del tiempo, las cuales algunas se fijan por deriva génica y posteriormente son heredadas (Hamilton, 2009).

En este sentido, la filogeografía se encarga de abordar los principios y procesos que determinan la distribución de linajes genealógicos dentro y entre taxa cercanamente emparentados (Avice *et al.*, 1987). Asimismo, es auxiliar para inferir procesos históricos y demográficos mediante la superposición de filogenias moleculares a un espacio geográfico, en búsqueda de identificar patrones que expliquen la derivación de los linajes genéticos en relación con eventos geográficos o históricos (Piñero *et al.*, 2008). Siendo las variables demográficas las que definen los patrones y la forma de las genealogías de genes (Avice, 2000).

Por otro lado, el estudio de las relaciones históricas entre los linajes de genes se basa en la aplicación de métodos coalescentes (Avice, 2000). El concepto central de dichos métodos consiste en que un grupo de linajes (o alelos) en el presente, tuvieron un mismo ancestro común en el pasado, el cual se denomina ancestro común más reciente o MRCA, por sus siglas en inglés, que mediante modelos para predecir la probabilidad de posibles patrones de ramificación de los linajes, se van remontando en el tiempo hasta una sola línea ancestral (Hamilton, 2009). Dichas alteraciones en los patrones de coalescencia pueden detectar selección natural, estructura génica, precisar eventos migratorios y estimar sus tasas de migración en un contexto histórico (Frankham *et al.*, 2010).

En este sentido los mecanismos evolutivos que operan dentro y entre las poblaciones, y que resultan en divergencia genética se ven impulsados por barreras al flujo génico (que son conocidas por perturbar la conectividad de la población), ejemplos de esto en organismos marinos son la circulación oceánica, separación de las poblaciones por grandes escalas

geográficas, donde conviene resaltar que se relacionan directamente con la capacidad de dispersión de la especie, cambios en la temperatura superficial oceánica, surgencias, disponibilidad de recursos, entre otros (Palumbi, 1994; Chabot *et al.*, 2015).

La filopatría se considera como la inclinación de permanecer o regresar a un determinado sitio, primordialmente con fines reproductivos, de crianza, o alimentarios, y que puede provocar la divergencia entre poblaciones e incluso especiación (Mayr, 1963). Este proceso es una causa de divergencia sin barreras al flujo, debido a la dispersión de un solo sexo (Duncan y Holland, 2006; Dudgeon *et al.*, 2012).

Una conducta muy común en tiburones es la segregación sexual, la cual consiste en que las hembras utilizan algunas zonas como lagunas y/o pequeñas bahías como áreas de crianza que les permiten incrementar su adecuación (Springer, 1967; Klimley, 1987).

Las áreas de crianza en tiburones se caracterizan por consistir en regiones geográficamente aisladas, en las cuales las hembras grávidas dan a luz a sus crías o depositan sus huevos y los juveniles pasan los primeros estadios de vida que pueden ser semanas, meses o incluso años. Usualmente son áreas de escasa profundidad, que son usadas debido a la cantidad de alimento disponible y la protección que brindan ante la depredación por tiburones adultos, tanto de la misma especie como de otras (Castro, 1993; Hueter y Manire, 1994; Hueter *et al.*, 2004; Dudgeon *et al.*, 2012). Particularmente los tiburones costeros suelen encontrarse con frecuencia en dichas áreas, en las que incluso pueden cohabitar múltiples especies de tiburones, pero separadas temporal o espacialmente (Castro, 1993).

En este sentido las bahías y estuarios de la costa sureste de Estados Unidos, son consideradas áreas de crianza para varias especies de tiburones costeros; estas zonas también son atractivas para la pesca comercial y recreativa, además de ser muy propensas a disturbios antropogénicos donde el riesgo de que los tiburones sean capturados incidentalmente es muy elevado (Hueter y Manire, 1994; Duncan y Holland, 2006). Por lo tanto, dichas áreas deben ser cuidadosamente gestionadas a fin de mantener en equilibrio las actividades humanas y la presencia de tiburones en esas zonas, que como se dijo anteriormente, son importantes para las crías y los juveniles (Hueter y Manire, 1994).

A lo largo de la costa de Florida tanto en Golfo de México como en el Atlántico, las especies de tiburones más abundantes son *Rhizoprionodon terraenovae*, *Carcharhinus limbatus* y *Sphyrna tiburo*; en menor proporción y en áreas específicas se encuentran *Carcharhinus plumbeus*, *Carcharhinus acronotus*, *Carcharhinus isonodon*, *Carcharhinus leucas* y *Sphyrna lewini* principalmente (McCallister, 2012; Bethea *et al.*, 2015).

Por otra parte, las especies con un mayor número de registros de captura en aguas del Golfo de México y Mar Caribe son *Rhizoprionodon terraenova*, *Sphyrna tiburo* (la especie más significativa para las costas de Tabasco, Campeche y Yucatán), *Carcharhinus limbatus*, *Carcharhinus acronotus*, *Sphyrna lewini*, *Carcharhinus leucas*, *Carcharhinus falciformis*, *Carcharhinus porosus* y *Carcharhinus brevipinna* (INAPESCA, 2014). De esta manera al ser *S. tiburo* un recurso pesquero económicamente relevante, los estudios biológicos y evolutivos juegan un papel clave para su conservación.

Los primeros trabajos de *S. tiburo* tuvieron lugar en costas del Golfo de México de la península de Florida o Florida oeste, donde se analizaron rasgos de su historia de vida, encontrando evidencia a favor de un patrón de variación latitudinal o clinal, en tres diferentes poblaciones ubicadas en Florida Noreste (donde se encuentra Apalachicola Bay, cercano a Cedar Key), Tampa Bay (Centro) y Florida Bay (Sur), en el Golfo de México. Dichas diferencias se observan en el tamaño de los individuos de Florida Noreste los cuales poseen mayores tallas promedio, tasa de crecimiento, tamaño, peso de los embriones y edad de madurez sexual. En contraste, Florida Bay posee los valores más bajos y Tampa Bay intermedios en las características antes mencionadas (Parsons, 1993a; Carlson y Parsons, 1997; Lombardi-Carlson *et al.*, 2003).

Los meses de nacimiento de las crías difieren también en las tres poblaciones; en Florida Bay ocurre en el mes de julio, mientras que para Tampa Bay en agosto y Florida Noreste en septiembre (Lombardi-Carlson *et al.*, 2003). Por este motivo se ha sugerido que todas las diferencias antes mencionadas, se deben a la limitación de especies presas, así como a diferencias estacionales y ambientales (Parsons, 1993b; Carlson y Parsons, 1997) sin que se haya explorado la posibilidad de que tengan un componente genético/adaptativo.

Por otra parte, estudios basados en marcaje y recaptura de *S. tiburo* no han demostrado migraciones de las costas del Atlántico de Florida hacia el Golfo de México o viceversa; más aún, los movimientos de mayor distancia recorrida se produjeron en dirección Norte-Sur, donde se sugiere sean debido a la temperatura (Kohler *et al.*, 2013; Tyminski *et al.*, 2013).

En estudios genéticos previos basados en secuencias de la región control del DNA mitocondrial, se evaluaron poblaciones del Golfo y Atlántico de Florida, así como poblaciones del sureste mexicano (Campeche y Tabasco), en las que se observó divergencia genética de las poblaciones del Atlántico y el Golfo, junto con ligeras diferencias significativas respecto a estuarios vecinos y diferenciando por ende a las poblaciones mexicanas de las de Florida

(Escatel-Luna *et al.*, 2015). Entre tanto dichas diferencias provienen de unos cuantos nucleótidos debido a la baja tasa mutacional del mtDNA en elasmobranquios, lo que hace necesario incluir información adicional que permita corroborar en forma categórica las diferencias detectadas.

Lo anterior sugiere diferencias conductuales (fidelidad al sitio) con respecto a la reproducción e historia de vida de los organismos y posiblemente diferencias genéticas. Por lo cual definir si las poblaciones de *S. tiburo* mantienen flujo genético limitado y en consecuencia estructura genética de sus poblaciones, resulta relevante para su conservación (Frankham *et al.*, 2010).

Los estudios genéticos de elasmobranquios tienen una gran importancia y aplicación en el manejo de las pesquerías, así como en cuestiones de conservación, por otro lado, pretenden inferir los procesos históricos y contemporáneos responsables de los patrones observados de diferenciación genética espacial y para identificar las unidades de gestión y conservación de la pesca (Dudgeon *et al.*, 2012).

Por otra parte, la región mitocondrial ND4 analizada en el presente estudio es un gen que codifica para la subunidad 4 de la NADH llamado ubiquinona oxidoreductasa o complejo I, componente de la cadena de transporte de electrones (Hirst *et al.*, 2003).

También existen marcadores moleculares no codificantes como la región control o Displacement loop (D-loop) mitocondrial, con una tasa de mutación muy elevada de aproximadamente diez veces mayor que las regiones codificantes y alta variabilidad intrapoblacional (Aquadro y Greenberg, 1983; Greenberg *et al.*, 1983). El D-loop es una estructura del mtDNA que se genera durante la replicación, en donde la doble hélice del DNA se separa por una tercera hélice, de ésta manera forma el denominado bucle que se compone por tres hebras de DNA (Kasamatsu *et al.*, 1971).

## II. ANTEDECENTES

### 2.1. Características diagnósticas y generales de la familia Sphyrnidae

La familia Sphyrnidae incluye a tiburones martillo o cornudas y consta de dos géneros *Eusphyra* y *Sphyrna*, con una y siete especies respectivamente las cuales son: *Eusphyra blochii*, *Sphyrna mokarran*, *S. zygaena*, *S. lewini*, *S. media*, *S. tudes*, *S. corona* y *S. tiburo* (Ebert *et al.*, 2013). Dichas especies se caracterizan por poseer inconfundibles cabezas en forma de martillo, pala, mazo o hacha en vista dorsoventral (Figura 1). El ancho de la cabeza es variado el cual es de aproximadamente 17 a 33% de la longitud total del tiburón (Compagno, 1984).

Ésta forma característica les provee una mejor maniobrabilidad, visión estereoscópica, capacidad para triangular las fuentes de fuentes de olores y señales electromagnéticas, esto mediante la detección de pulsos eléctricos producidos por los movimientos musculares de sus presas, las cuales producen cantidades pequeñas de electricidad. Dichos estímulos son captados por medio de unidades electroreceptivas llamadas ámpulas de Lorenzini presentes en todos los grupos de Elasmobranchii, los cuales se encuentran más desarrollados en la familia Sphyrnidae, confiriéndoles una orientación excepcional, reconocimiento intraespecífico (durante las interacciones sociales), mayor percepción de la temperatura y cambios de salinidad (Hueter *et al.*, 2004; Compagno *et al.*, 2006).

La familia Sphyrnidae es vivípara placentaria con un número de crías por camada muy variable, que va de seis a cuarenta y dos individuos en *Sphyrna mokarran* y de sólo dos en *S. corona*. Se alimentan principalmente de crustáceos, peces óseos, tiburones más pequeños, rayas, cefalópodos e invertebrados (Compagno *et al.*, 2006).

Habitán en zonas cercanas a las plataformas continentales e insulares y en montes submarinos a una profundidad de al menos 275 m, donde las aguas son principalmente cálido-templadas y tropicales (Compagno *et al.*, 2006).

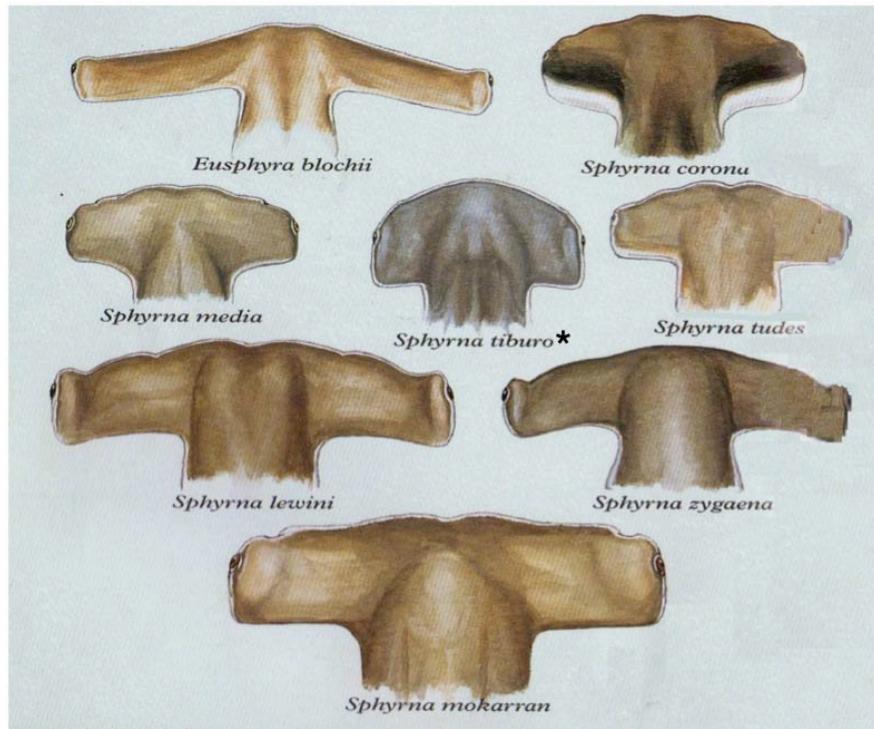


Figura 1. Morfología de las cabezas de la familia Sphyrnidae (Tomado de Compagno *et al.*, 2006) en \* se señala la especie *S. tiburo* que se encuentra catalogada por algunos autores como una subespecie, *S. tiburo tiburo* en el Atlántico y *S. tiburo vespertina* en el Pacífico.

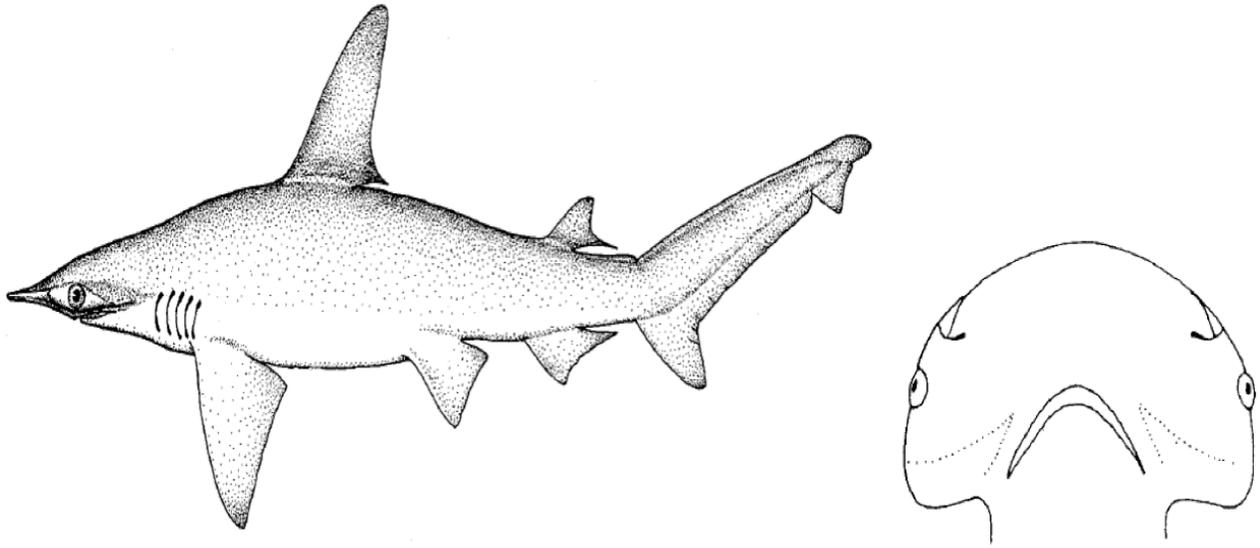
## 2.2. Diagnósis de *Sphyrna tiburo*

*S. tiburo* (Linnaeus, 1758) o tiburón cabeza de pala como se le conoce en México, es la única especie de la familia Sphyrnidae que posee una cabeza lisa, estrecha y en forma de pala, con el apéndice posterior de la primera aleta dorsal frente al origen de las aletas pélvicas y con el margen posterior de la aleta anal someramente cóncavo (Figura 2A). Posee una amplia cabeza en forma de pala bastante estrecha transversalmente, pero alargada longitudinalmente representando alrededor del 18-25% de la longitud total del tiburón y pudiendo alcanzar la talla total de hasta 1.5 metros (Compagno, 1984, Compagno *et al.*, 2006).

*S. tiburo* presenta un coloración gris o pardo gris en la parte dorsal del organismo y gris claro en parte ventral, a menudo con pequeñas manchas oscuras en los lados del cuerpo, como se puede observar en la Figura 2B (Compagno *et al.*, 2006).

Es una especie controversial en términos taxonómicos, pues se ha considerado como dos especies distintas *S. tiburo* y *S. vespertina*, para una posterior ubicación en subespecie y más tarde cayó en sinonimia; aunque estudios moleculares actuales sugieren que los individuos del Pacífico pueden ser una especie diferente (Ebert y Stehmann, 2013).

A



B



Figura 2. *Sphyrna tiburo*. (A) Esquema del tiburón cabeza de pala, obtenido de Compagno, 1984. (B) Fotografía de *S. tiburo*, tomado de la Institución Smithsonianiana de Investigaciones Tropicales (<http://biogeodb.stri.si.edu/caribbean/es/thefishes/species/117>).

### 2.3. Hábitat y distribución del tiburón cabeza de pala

*S. tiburo* se encuentra asociado a plataformas continentales e insulares, zonas costeras y arrecifales. Se puede localizar comúnmente en estuarios, bahías poco profundas y canales con profundidades de 10 a 25 m y por lo menos a 80 m en zonas de traslación y llanuras intermareales (Compagno, 1984). Habita preferentemente en pastos marinos (donde pasa más de un 90% de su tiempo) y zonas con fango y arena (Hueter y Manire, 1994). Aunque los organismos juveniles se encuentran comúnmente sobre los pastos marinos y en aguas estuarinas (Castro, 2011).

La distribución del tiburón cabeza de pala abarca las aguas cálidas del Hemisferio Occidental a lo largo de la costa Este de Norte América y el Pacífico Oriental. En el Atlántico occidental se han encontrado registros que van desde Nueva Inglaterra hasta el sur de Brasil, así como en Cuba y Bahamas. En el Pacífico Oriental su dispersión va desde el sur de California (Estados Unidos) hasta Ecuador (Ver Figura 3). Los mayores registros de la especie se encuentran en las aguas costeras de Georgia, Carolina del Norte y Sur en el verano; fuera de las costas de Florida en primavera y en el Golfo de México se localizan en verano y otoño, por último, en Dry Florida (localizado al final de Florida Keys) puede ser visto todo el año (Castro, 2011).

Según Hueter y Manire (1994) el tiburón cabeza de pala se ha registrado en las localidades de Charlotte Harbor y Tampa Bay en un rango entre los 16-33°C, a profundidades entre los 0 – 9.14 m, con una salinidad entre 21.5–33 UPS<sup>1</sup>

Por otra parte, es una especie que se caracteriza por sus cortas migraciones hacia el sur durante el invierno o hacia aguas más profundas fuera de las costas de Florida y el Golfo de México (Compagno *et al.*, 2006; Castro, 2011). Como muchos otros tiburones martillo, el cabeza de pala viaja a menudo en escuelas, que consisten en grupos de entre cinco a quince individuos, aunque en el año de 1962 hubo un registro excepcional de una escuela con 700 integrantes en el sitio de Lido Key, Sarasota, Florida (Clark, 1963; Castro, 2011).

---

<sup>1</sup> (Unidad Práctica de Salinidad gr kg-1 = ‰. Siendo los gramos de sales disueltas en un kilogramo de agua marina).



Figura 3. Distribución geográfica de *Sphyrna tiburo*. Tomado del Museo de Historia Natural de Florida (<http://www.flmnh.ufl.edu/fish/Gallery/Descript/Bonnethead/Bonnethead.html>)

#### 2.4. Biología de *Sphyrna tiburo*

*Sphyrna tiburo* es una especie vivípara placentaria, su temporada de apareamiento depende de la región geográfica en que se encuentre. En Florida, por ejemplo, se ha observado que puede tener dos temporadas de apareamiento anuales, las cuales ocurren durante la primavera y otoño, o en cualquier época del año en ciertas localidades; por el contrario, en Brasil su temporada reproductiva es en la primavera (Compagno, 1984).

Adicionalmente en *Sphyrna tiburo* se describió por primera vez en peces cartilagosos la reproducción asexual en cautiverio, la cual consiste en reproducción por partenogénesis automítica (que ocurre con una meiosis normal, dando como resultado cuatro núcleos haploides, uno de ellos se fusiona con un cuerpo polar de la propia hembra y no del espermatozoide). También para ésta especie ha sido reportada la presencia de monogamia (Chapman *et al.*, 2004; Chapman *et al.*, 2007).

El período de gestación de *S. tiburo* es de aproximadamente cuatro a cinco meses, siendo uno de los más cortos conocidos en tiburones. La implantación se produce alrededor de los dos meses y medio (Castro, 2011; Manire *et al.*, 1995). El número de crías por camada es de cuatro a dieciséis; las cuales crecen a un ritmo de 21-30 mm por mes en su primer año de vida (Compagno, 1984; Carlson y Parsons, 1997).

Los tiburones cabeza de pala, nacen con una talla que va de los 24-34 cm (Castro, 2011) y su edad de madurez sexual se ha estimado que es a los dos años en los machos (con

una talla de 52 y 75 cm), mientras que en las hembras varía de los 2.2 a los 2.4 años (con una talla aproximada de 84 cm), éstas diferencias en las tallas se atribuyen al cambio en la latitud geográfica. Todo lo anterior se reportado en las localidades de Florida Noreste, Tampa Bay y Florida Bay (Compagno, 1984; Parsons, 1993a; Carlson y Parsons, 1997).

En cuanto a las características de crecimiento en *S. tiburo*, difieren entre sexos y poblaciones de tiburones. Específicamente estas particularidades se han encontrado en las localidades de Tampa Bay y Florida Bay lo que conlleva a un ligero dimorfismo sexual; pues el tamaño promedio de las hembras adultas es de 130 cm, en contraste con los machos que alcanzan tallas de 124 cm. Sumado a que las hembras son aparentemente más longevas, esto se presenta en varias especies de tiburones (Compagno, 1984; Parsons, 1993a). De acuerdo con Parsons (1993a) las tasas de crecimiento son poco regulares, aumentando de tamaño más rápido los machos y teniendo menor talla, en cautiverio se encontró un crecimiento acelerado y tallas menores en las poblaciones de tiburones de aguas tropicales, creciendo a mayor velocidad a final del verano y otoño, pero más lento durante el invierno.

Respecto a su expectativa de vida, las pequeñas especies de tiburones que habitan aguas templadas en general son más longevas que aquellas que se encuentran en temperaturas tropicales (Parsons, 1993a), por lo cual *Sphyrna tiburo* tiene un promedio de vida teórico aproximado de más de ocho años para los machos y más de doce años para las hembras (Parsons, 1993a; Carlson y Parsons, 1997). Así pues, ésta especie presenta una alta tasa de crecimiento, rápida madurez sexual (dos-tres años) y tiene un promedio de vida relativamente corto (Carlson y Parsons, 1997).

Un comportamiento generalizado en tiburones es la segregación sexual por sexo y edad, debido a que se presenta un riesgo de canibalismo y depredación de tiburones juveniles y subadultos por individuos maduros. Por ello las hembras adultas a menudo predominan en aguas poco profundas durante la temporada de cría de los neonatos y se ha identificado sincronización reproductiva entre poblaciones del tiburón cabeza de pala, dadas por diferencias latitudinales. Donde las poblaciones de acuerdo a la latitud geográfica en que se encuentren, están condicionadas a ciertos períodos de tiempo para dar a luz a sus crías, de modo que no se traslapen entre poblaciones (Compagno, 1984; Castro, 2011).

*S. tiburo* es un organismo de hábitos alimenticios asociados al bentos, por ello basa su dieta principalmente en crustáceos como cangrejos. Su principal alimento es el cangrejo azul *Callinectes sapidus*, y en menor proporción *Squilla empusa*, *Penaeus dourarum*, *Menippe mercenaria*, *Arenaeus cribrarius*, camarones (entre los que se encuentran los mantis "*Squilla*"),

isópodos, percebes, bivalvos, pulpos, calamares y peces de la familia Ophichthidae incluyendo las anguilas serpiente (Compagno, 1984; Cortés *et al.*, 1996; Cortés y Parsons, 1996).

Se alimenta también de varias especies de pastos marinos como *Thalassia testudinum*, *Syringodium filiforme* y *Halodule wrightii*, este peculiar alimento se asocia a la protección de la mucosa gastrointestinal por lesiones de espinas, crustáceos o partes duras de otras presas (Compagno, 1984; Cortés *et al.*, 1996; Cortés y Parsons, 1996). Bethea *et al.* (2007) registraron la presencia de rocas, ganchos, coral, bentos y parásitos (nematodos) aunque de manera inusual.

Específicamente en Tampa Bay y Charlotte Harbor Florida, Cortés y Parsons (1996) demostraron que la dieta en el tiburón cabeza de pala es especializada, dependiendo de la temporada y el hábitat, pero homogénea entre sexos, ubicación geográfica y tamaño de los organismos. Más tarde Bethea *et al.*, (2007) reportaron diferencias entre la dieta de los organismos menores al año de edad, los cuales se alimentan principalmente de pastos marinos, crustáceos (cangrejos, langostas y camarones) y algunos moluscos, pero en menor proporción; siendo los crustáceos el alimento más común en todos los estadios de vida y en varias localidades de Florida.

En Campeche y Tabasco se ha reportado que el tiburón cabeza de pala basa su dieta principalmente en *Callinectes similis* (cangrejo pequeño azul), seguido por *Callinectes sapidus* y otros crustáceos, cefalópodos (calamares, pulpos) y teleósteos. La diferencia en la dieta entre poblaciones de Florida y costas mexicanas, puede deberse a la disponibilidad del alimento y la asociación de éste a zonas específicas (García-Álvarez, 2014).

La forma de alimentación de *S. tiburo* se denomina durofagia, que consiste en el consumo de una presa que se encuentra protegida por un esqueleto calcificado, la cual captura por el denominado “mecanismo ram”, donde la morfología del tiburón influye en la rapidez para aprisionar a la presa. Adicionalmente es la única especie entre los tiburones martillo en poseer dientes del tipo molariformes en el área dental posterior, los cuales están presentes desde su nacimiento y que sumado a su pequeña talla permiten una conducta de tipo “forrajeo” en pastos marinos, tomando así los recursos que no se encuentran disponibles para otros tiburones martillo, mismos que basan su dieta principalmente de peces (Wilga y Motta, 2000).

## **2.5. Evolución de los Elasmobranchii**

Primeramente, los elasmobranquios paleozoicos suelen dividirse en dos grupos

**Paleoselachii** que incluye a los xenacántidos, cladoseláquidos y squatináctidos, y los **Euselachii** que abarca a los ctenacántidos e hydobóntidos, que se distinguen anatómicamente de los tiburones y rayas actuales o neoseláceos (Mendoza-Vargas *et al.*, 2016).

La historia de los primeros elasmobranquios paleozoicos data del Devónico temprano hace 380 millones de años en Gondwana, con registros en depósitos de España, Australia, Antártica y Sudamérica. Sin embargo, se han encontrado peces con forma de tiburones desde el Ordovícico tardío de Norte América y el Silúrico temprano de Mongolia<sup>1</sup>; para la mitad del Devónico los elasmobranquios paleozoicos se expanden hacia todo el mundo<sup>2</sup> y al final del Devónico se conocen cincuenta especies<sup>3</sup> (Carroll, 1988; Derek *et al.*, 2007). En el Carbonífero se extinguen los cladoseláquidos y squatináctidos, posteriormente en el Triásico los xenacántidos y ctenacántidos también se extinguen a excepción de los hydobóntidos, que se conoce como el linaje más exitoso de elasmobranquios, con un gran número de especies y que abarcó aproximadamente 300 millones de años, desde el Devónico al Cenozoico, éste grupo predominó en los mares del Triásico y Jurásico y es el linaje de elasmobranquios extinto más cercano a los neoseláceos (Mendoza-Vargas *et al.*, 2016).

Con la aparición temprana de nuevas especies de tiburones, se cree que tuvieron lugar dos grandes radiaciones adaptativas, la primera durante el Silúrico-Devónico, en Gondwana (donde a finales del Pérmico se extinguen); la cual tiene especial relevancia al encontrarse similitud con los géneros más actuales de tiburones, (pero teniendo aún un esqueleto primitivo), ésta dió paso a la segunda radiación en el Triásico-Jurásico originando a los órdenes actuales de tiburones (Carroll, 1997; Derek *et al.*, 2007). Específicamente los tiburones o neoseláceos surgieron a finales del Triásico a partir de un ancestro común, cuando Pangea comenzaba a separarse por la apertura del mar de Tetis, donde se formaron los dos nuevos continentes Laurasia y Gondwana, más tarde en el Jurásico la ruptura de ambos continentes creó una vía de comunicación marina entre el océano Pacífico y el mar de

---

<sup>1</sup> Los primeros peces del Ordovícico tardío con rasgos de tiburones se cavila que carecían de dientes al estar ausentes en el registro fósil; posteriormente en los registros del Devónico se encuentra la presencia de dientes a la par de la evolución de la mandíbula en los tiburones (Carroll, 1988).

<sup>2</sup> Aparece el primer tiburón moderno, actualmente extinto del género *Mcmurdodus* (Carroll, 1988).

<sup>3</sup> Los registros de tiburones fósiles datadas desde el período Devónico son descritas por medio de dientes, pues debido a su dureza y su conformación de esmalte con una raíz de dentina son muy abundantes en el registro fósil (Carroll, 1988).

Tetis, en consecuencia se crearon nuevos hábitats y los neoseláceos pudieron radiar con mayor facilidad (Mendoza-Vargas *et al.*, 2016).

Específicamente la familia Sphyrnidae surge en el Eoceno temprano a medio y la primera división de los géneros *Eusphyra* y *Sphyrna* ocurre hace aproximadamente 15-20 millones de años en el Mioceno temprano a medio. Finalmente, los grandes tiburones martillo (*S. mokarran*, *S. zygaena* y *S. lewini*) surgen hace 10 millones de años y las especies más derivadas (*S. media*, *S. tudes*, *S. corona* y *S. tiburo*) se originaron hace aproximadamente 6 millones de años (Lim *et al.*, 2010). Considerando que algunas de las especies más grandes del género son tiburones transoceánicos y los más pequeños se encuentran restringidos al continente americano, hay factores ambientales como las glaciaciones que pudieron interferir en el flujo genético de especies pequeñas tal es el caso de *S. tiburo* (Awise, 1992; Lim *et al.*, 2010).

*2.5.1. Impacto de las glaciaciones en organismos marinos.* Los eventos glaciares jugaron un papel preponderante en la extinción de un gran número de especies marinas. Entre los principales cambios que debieron afrontar las especies, están el descenso en la temperatura y nivel del agua oceánica, el aumento de la capa de hielo continental, incremento del oxígeno en el agua y de la circulación oceánica profunda impulsada por la evaporación, además del enfriamiento de grandes volúmenes de agua de mar situadas alrededor de los márgenes continentales. Otros factores trascendentales fueron la baja proporción de alimento, incursión de metales tóxicos en el agua, así como en el plancton y necton, reducción de la fotosíntesis y aumento de la depredación por parte de organismos más adaptados (Panel of Past Global Change of Life, 1995).

Finalmente, esto provocó un cambio ambiental muy drástico para muchos organismos marinos, aunque propició la apertura de nuevos nichos ecológicos, con condiciones ambientales distintas (Panel of Past Global Change of Life, 1995).

*2.5.2. Formación del Istmo de Panamá.* Mediante trabajos geológicos actuales se estima que hace 25-23 millones de años tanto Sudamérica como Panamá experimentaron cambios geoquímicos o colisiones iniciales. Posteriormente hace 20 millones de años Panamá tuvo conexión parcial con América del Norte, 10 millones de años más tarde el intercambio de aguas profundas e intermedias se detuvo totalmente, aunque el de aguas superficiales continuó por millones de años más, surgiendo así los corredores marinos como se muestra en la Figura 4 (Farris *et al.*, 2011; Bacon *et al.*, 2015).

Finalmente, el cierre total del istmo ocurrió hace 3.5-2.8 millones de años, provocando la separación de las poblaciones de organismos marinos en Caribe y Pacífico, dando como resultado un efecto vicariante (Keigwin, 1978; Keigwin, 1982; Lessios, 2008; Woodburne, 2010), tal como ocurrió en *Sphyrna tiburo*.

Además del aislamiento de especies marinas, el cierre del istmo de Panamá tuvo implicaciones directas en el clima, la circulación oceánica y atmosférica además de la salinidad (Lessios, 2008; Hoorn y Flantua, 2015).

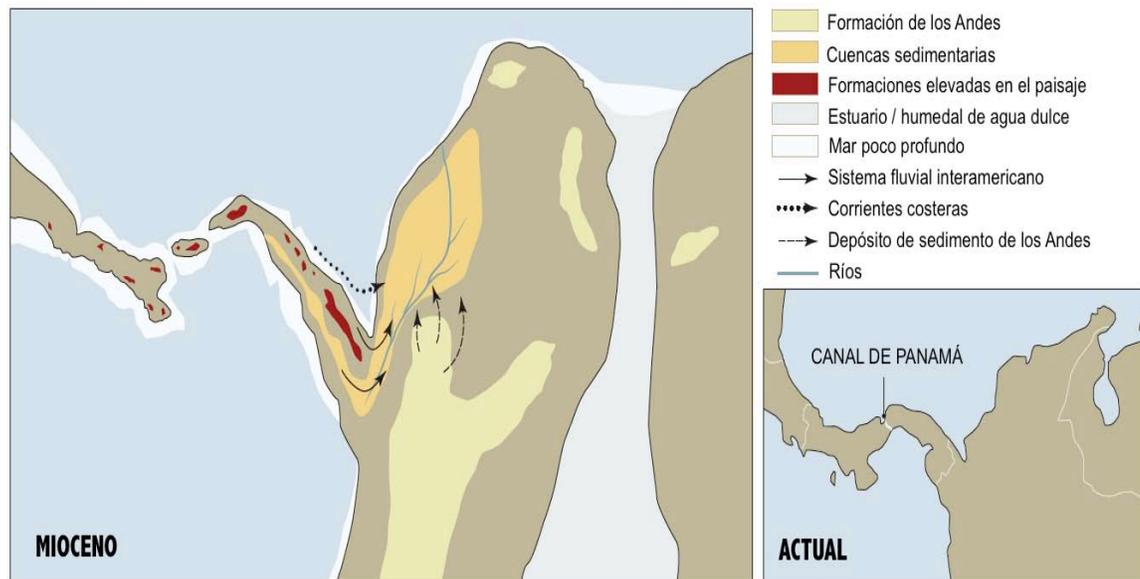


Figura 4. Reconstrucción del istmo de Panamá en el Mioceno (15-10 millones de años atrás), ilustrando los puentes de tierra que limitan parcialmente el flujo de aguas oceánicas entre el Pacífico y Atlántico (izquierda) y América central en la actualidad (derecha). Modificado de Hoorn y Flantua, (2015).

Un claro ejemplo del efecto vicariante, que ocurrió posterior al cierre definitivo del istmo de Panamá es la familia Sphyrnidae. Particularmente los pequeños tiburones como *Sphyrna corona* y *S. tudes* se encuentran restringidos al océano Pacífico oriental y el Atlántico occidental respectivamente; caso contrario de *S. media* y *S. tiburo* que se encuentran tanto en el Atlántico como en el Pacífico. Específicamente en *S. tiburo* se han descrito dos subespecies que son *S. tiburo vespertina* en el Pacífico y *S. tiburo tiburo* en el Atlántico, situación que se atribuye al cierre del istmo de Panamá (Martin *et al.*, 1992; Lim *et al.*, 2010).

Así pues, se considera que *S. tudes* se extinguió del Pacífico y *S. corona* del Atlántico, ya que desde el Mioceno tardío hasta el Plioceno la orogenia marina aumentaba, el nivel del mar aumentaba y disminuía y el istmo se cerraba, lo que ocasionó que tanto el océano Atlántico y

Pacífico cortaran por completo su comunicación y de esa manera se promoviera la especiación de los Sphyrnidae (Lim *et al.*, 2010).

*2.5.3. Glaciación del Plioceno-Pleistoceno en Florida y el Golfo de México.* Actualmente se conoce que durante el pasado geológico los movimientos de placas tectónicas fueron responsables de muchos cambios climáticos, al mismo tiempo que los continentes se desplazaban a posiciones latitudinales diferentes. Entre los cambios que se experimentaron, está la variación en la circulación oceánica, que alteró el transporte de la humedad y calor, dando como consecuencia el cambio del clima. De este modo se puede explicar el fenómeno de las glaciaciones extensas en el pasado debido a la tectónica de placas (Tarbuck y Lutgens, 2005).

Desde finales del Plioceno y principios del Pleistoceno hace aproximadamente 2.7 millones de años, la Tierra ha experimentado profundos cambios, éstos consisten en avances y retrocesos glaciares, tan sólo para el Pleistoceno se han descrito diez o más (Figura 5). Posterior a estos periodos la rápida deglaciación ocasionó cambios bruscos en la elevación del nivel del mar y carencia de oxígeno. Similarmente, el transporte de aguas de forma vertical y la intensidad del viento dieron como resultado un mayúsculo impacto en la distribución de los organismos marinos y costeros en el sureste de Florida (Avice, 1992; Panel of Past Global Change of Life, 1995; Sossian y Rosenthal, 2009). Ligado al descenso de la temperatura, las poblaciones que habitaban en aguas templadas se reubicaron en lugares más sureños, aumentando la probabilidad de contacto entre poblaciones del Atlántico y el Golfo (o bien oeste y este) en el sur de Florida (Avice, 1992).

Por lo tanto, en los períodos interglaciares del Pleistoceno, Florida estaba bordeada de marismas y estuarios más amplios favoreciendo a muchas especies. Sin embargo, durante los avances glaciales algunas poblaciones de la costa del Atlántico y del Golfo de México pudieron entrar en contacto, debido a una mayor superficie de tierra firme. Con el cambio climático, algunas especies estrictamente establecidas en aguas templadas, se separaron de las poblaciones del Atlántico y del Golfo de México, por las condiciones tropicales al sur de Florida; mientras que otras especies que no soportaron las drásticas variaciones de temperatura en el agua, encontraron un refugio pleistocénico en el Golfo de México (Avice, 1992).

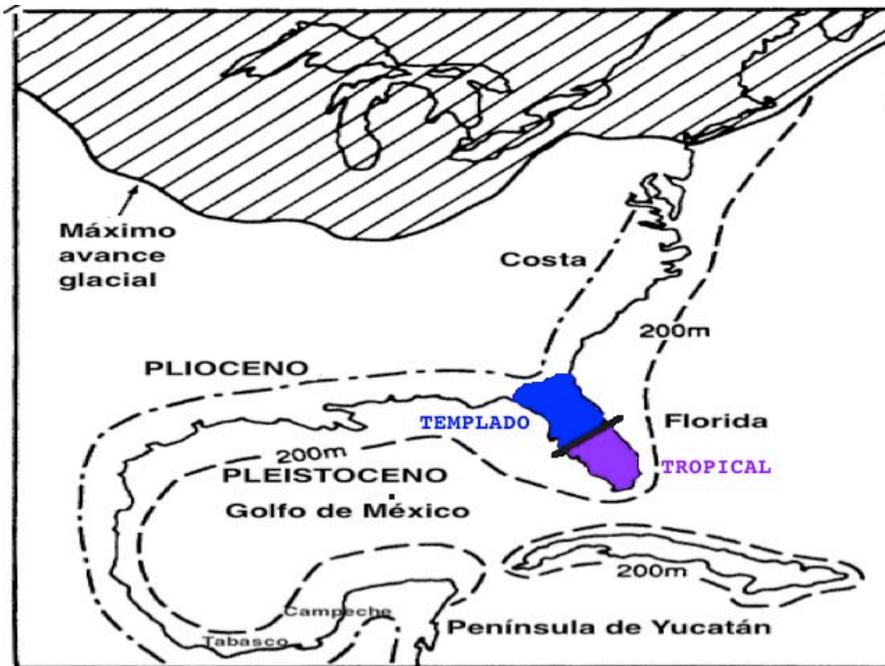


Figura 5. Línea de costa para Florida y el Golfo de México, además de la línea de costa actual (línea sólida) se puede observar el retroceso y avance glacial del Plioceno (-.-.-) y el Pleistoceno (----) con un contorno de 200 metros de profundidad y la transición de temperaturas en la península de Florida en color azul templado y en morado tropical (Modificado de Avise, 1992).

Extraordinariamente durante el último máximo glacial (Wisconsin) las oscilaciones climáticas fueron interrumpidas por siete episodios que tuvieron lugar en el Atlántico norte llamados eventos Heinrich (Heinrich, 1988; Andrews *et al.*, 1995).

Los eventos Heinrich se caracterizan por descargas de icebergs los cuales se formaron al desprenderse de la capa de hielo Laurentino, que cubría gran parte de América del norte durante los períodos glaciares, específicamente en la bahía de Hudson. Primeramente, el calor geotérmico se cree alentó el desprendimiento y la consecuente formación de icebergs que fueron guiados por el sedimento blando al mar de Labrador y por los vientos y corrientes fueron transportados hacia el océano Atlántico. Los icebergs acarreaban porciones de rocas que al fundirse en el agua marina se depositaban en forma de detritos a la deriva del hielo (IRD) en el fondo marino (Heinrich, 1988; Bond *et al.*, 1992; Broecker y Hemming, 2001). Al derretirse los icebergs, la capa de hielo se volvió a formar y así empezaba un nuevo episodio (Broecker y Hemming, 2001) cada evento Heinrich duraba entre 10-15 mil años y ocurrieron aproximadamente hace 80-20 mil años (Bond *et al.*, 1993).

La descarga y deshielo de icebergs vertidos al Atlántico se encuentra asociada a la reducción de la temperatura y salinidad del agua superficial oceánica, (Heinrich, 1988; Bond

*et al.*, 1992; Bard *et al.*, 2000), dichos aportes masivos de agua dulce pueden desencadenar reorganizaciones notables del clima (Broecker y Hemming, 2001), pues después de los largos períodos de descenso de temperatura “eventos Heinrich” se presenciaban cambios abruptos de aguas frías a cálidas, los llamados “ciclos Dansgaard-Oeschger” (Bond *et al.*, 1993; Broecker y Hemming, 2001).

## **2.6. Área de estudio**

El presente trabajo analiza muestras de *S. tiburo* de la península de Florida (con localidades del Golfo de México “oeste” y el océano Atlántico “este”) y de dos estados del sureste mexicano (Campeche y Tabasco).

El Golfo de México es una cuenca semi-cerrada que se localiza en una zona subtropical y se ve influida por el intercambio de masas de aire frío y seco originarias de Canadá y Estados Unidos, con las del Golfo y las tropicales. Se encuentra comunicado con el océano Atlántico por el canal de Yucatán y con el mar Caribe por el estrecho de Florida. Cuenta con aportes permanentes de masas de agua provenientes principalmente de los ríos Pánuco, Coatzacoalcos, Papaloapan, Grijalva-Usumacinta, Champotón, Bravo y Mississippi, (los cuales proveen sedimentos y nutrientes), e indirectamente por manglares y lagunas. El contenido de nutrientes puede incrementarse también a través de los giros ciclónicos (fríos) con el ascenso del agua marina que se encuentra a gran profundidad y la surgencia que se presenta en la plataforma continental de Yucatán (Caso *et al.*, 2004).

En el Golfo de México, la temperatura se rige por las aguas cálidas de la Corriente del Lazo (la cual entra por el Canal de Yucatán y la zona del Caribe), afectando la dinámica del Golfo en un 50%. En esta zona las temperaturas superficiales en el verano van de los 28 a 29°C y en el invierno de los 19 a 20°C, por la presencia de la Corriente del Lazo a causa del efecto de los frentes fríos provenientes del norte, que se oponen a las aguas cálidas del sureste (Caso *et al.*, 2004).

Las mareas se caracterizan por ser homogéneas predominando las diurnas, pero se encuentran algunas regiones con mareas mixtas como ocurre en Florida y el Caribe mexicano, debido a las irregularidades en la plataforma continental, las fases lunares-solares y los vientos de dicha región (Caso *et al.*, 2004).

Por otra parte, los dos sistemas de circulación de aguas del océano Atlántico se suelen representar como sistemas de corrientes circulares provocadas por los vientos alisios y la rotación de la Tierra. La primera es denominada *Atlántico norte* (Figura 6), donde dichas

corrientes giran a favor de las manecillas del reloj y están representadas por la Corriente Ecuatorial del norte, la Corriente del Golfo, la Corriente del Atlántico norte y la Corriente de las Canarias (Ramírez, 2006).

La segunda llamada *Atlántico sur* donde las corrientes giran en contra de las manecillas del reloj y constan de la Corriente Ecuatorial del sur, Corriente de Brasil, Corriente del Atlántico sur y la Corriente de Benguela (Ramírez, 2006).

La temperatura del mar varía en función de las masas de agua que dependen en gran medida de las estaciones del año y que afectan la ubicación y movilidad de los elasmobranchios tropicales como *S. tiburo* (Caso *et al.*, 2004; White y Sommerville, 2004).

Otros factores que determinan la movilidad y distribución de éstas especies son el flujo de las mareas, salinidad, disponibilidad de las presas, tipo de sustrato, oxígeno disuelto, profundidad y los factores sociales (White y Sommerville, 2004; Ubeda *et al.*, 2009; Speed *et al.*, 2010).

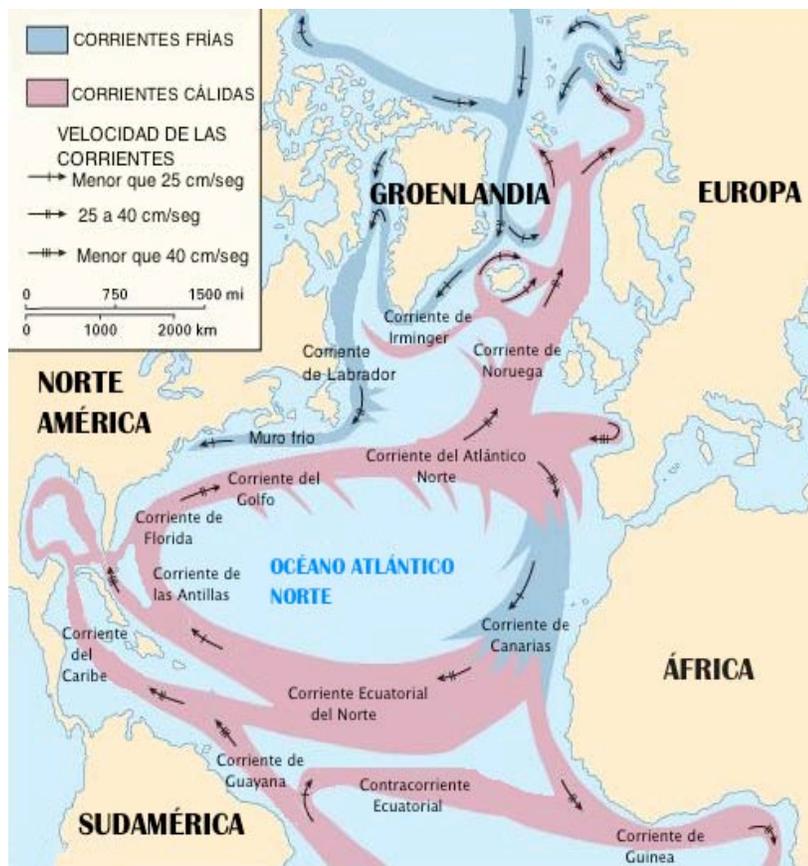


Figura 6. Mapa de corrientes marinas del océano Atlántico norte, en azul se muestran las corrientes frías y en rosa las cálidas.

2.6.1. *Masas de agua y condiciones físico-químicas.* Las masas de agua que entran en el Golfo de México a través del canal de Yucatán, que confluyen entre sí y se encuentran a diferentes profundidades son: el Agua Subtropical Subsuperficial del Caribe<sup>1</sup> (es el estrato superior), que al llegar al Golfo de México forma la Corriente del Lazo y encierra un giro anticiclónico de dirección opuesta a las manecillas del reloj (Caso *et al.*, 2004).

A una profundidad mayor se encuentra el Agua Intermedia Antártica<sup>2</sup>, con origen en los frentes polares antárticos, ésta representa el 73.1% del agua del Golfo. Sus aguas son movidas por el giro anticiclónico de la Corriente del Lazo y desemboca por el Estrecho de Florida. Al fondo, se encuentra el Agua Profunda Noratlántica<sup>3</sup>. Asimismo, se han tenido registros de masas de agua que originan a su vez el Agua Subsuperficial del Golfo de México<sup>4</sup> y el Agua Común del Golfo<sup>5</sup> (Caso *et al.*, 2004).

2.6.2. *Ecorregiones marinas.* La zona de estudio se encuentra constituida por cinco ecorregiones como se muestra en la Figura 7, las cuales fueron propuestas con base en sus características oceanográficas y por un contexto ecológico. La primera corresponde a la zona denominada Corriente del Golfo (CG), la cual se forma a partir de la corriente de Florida y transporta aguas tropicales cálidas hacia el Polo Norte. En esta se presentan abundantes surgencias que enriquecen las aguas superficiales y cuenta con temperaturas promedio de 23°C en invierno y entre 27 y 30 °C en verano (Wilkinson *et al.*, 2009).

---

<sup>1</sup> Son aguas cálidas y salinas con temperaturas registradas de 22.5 °C y salinidades de 36.6 UPS

<sup>2</sup> Cuando llega al Canal de Yucatán registra temperaturas de 6.3 °C y salinidades de 34.86 UPS. Aunque ésta masa también se caracteriza por el mínimo de salinidad del Golfo (34.86 y 34.89 UPS) con temperaturas de 6.1-6.3 °C

<sup>3</sup> Ingresa al Golfo de México por el mar Caribe, tiene una salinidad de 34.9 UPS y temperaturas de 4.0-4.10 °C. Ésta masa de agua es la más profunda del Golfo de México.

<sup>4</sup> Se forma dentro del Golfo durante el invierno, como consecuencia del paso de frentes fríos atmosféricos que producen una mezcla convectiva en la capa de 200m., lo que provoca pérdida de calor sensible, latente y salinidad con valores de 36.4 UPS, además de 22 °C de temperatura.

<sup>5</sup> Se forma también dentro del Golfo de México por una mezcla convectiva, debido al enfriamiento en invierno, la salinidad es de alrededor de 36.4 UPS y 22.5 °C de temperatura, además conforma el 4.83% del agua que se encuentra en el Golfo.

La región *del Atlántico Carolino (AC)*, se define por numerosas vertientes de la planicie costera y se alimenta de descargas de agua dulce de varios ríos, principalmente de Georgia, Carolina del Norte y Sur. La temperatura va de los 15 a 22°C en invierno y registra un promedio de 28°C en verano; posee numerosos humedales y es una zona de crianza de varios peces y crustáceos (Wilkinson *et al.*, 2009).

*El Atlántico del sur de Florida y de Bahamas (ASFYB)* se define primero, por su clima y temperatura subtropical, segundo por su fauna de aguas cálidas. Es una ecorregión que recibe en mayor grado influencia de la corriente del Golfo con temperaturas de 22.5 °C en invierno y 28 °C en verano; presenta abundantes zonas de mangle y arrecifes coralinos, además de ser una zona de gran productividad (Wilkinson *et al.*, 2009).

*La región del Golfo de México norte (GMN)* contiene el 60% de las marismas intermareales y cuenta con el aporte de agua dulce de 37 ríos mayores. Posee corrientes tropicales y gran carga de nutrientes, igualmente presenta afluencias oceánicas del Golfo de México que provienen del mar Caribe formando la corriente del Lazo (ciclónica), corriente de Florida y el giro Tamaulipeco (anticiclónico). Se considera una zona semitropical y tropical con temperaturas de 14 -24 °C en invierno y de 28-30 °C en verano y su topografía consiste en una amplia plataforma continental (Wilkinson *et al.*, 2009).

Finalmente, la zona del *Golfo de México sur (GMS)* se diferencia del norte por la distribución de algunas especies de peces y los cambios en las temperaturas de las aguas superficiales durante el invierno. Las aguas se rigen por la corriente del Lazo, la cual transporta grandes cantidades de calor, sal y agua; con temperaturas promedio de entre 24 y 25 °C en invierno y 28-28.5 °C en verano (Wilkinson *et al.*, 2009).

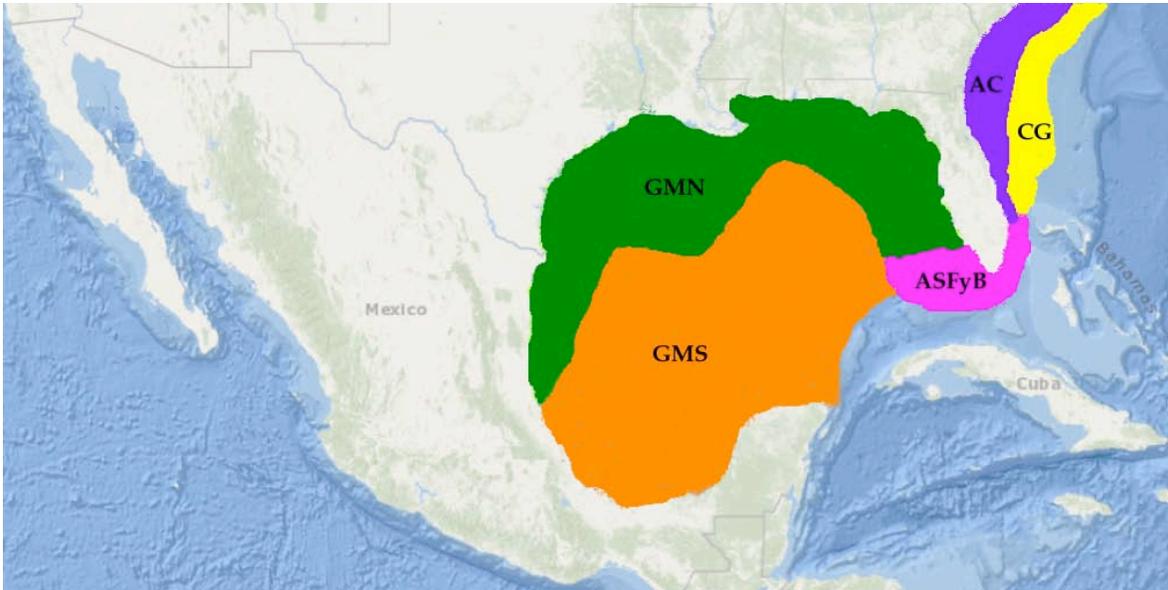


Figura 7. Mapa que muestra las ecorregiones marinas de la zona de estudio: en amarillo se encuentra la Corriente del Golfo (CG), morado Atlántico Carolino (AC), rosa Atlántico del sur de Florida y de Bahamas (ASFyB), verde Golfo de México norte (GMN), finalmente en anaranjado el Golfo de México sur (GMS).

### 2.7. Pesquería de tiburón

Las características en la historia de vida de los tiburones tales como baja fecundidad y tasa de crecimiento lento, los hace particularmente vulnerables a la sobrepesca, lo cual afecta sus poblaciones. Tan sólo para el año 2004 se registraron capturas a nivel mundial de 100, 000 toneladas de tiburones, de los cuales el 90% corresponden al grupo de los Carcharhinidae (Maguire *et al.*, 2006).

México se clasifica entre los países con mayor número de capturas de tiburones a nivel mundial (Figura 8 y 9). Específicamente se encuentra en el sexto puesto mundial con un promedio de capturas durante el período 2000 a 2009 de 33,653 toneladas anuales (Fischer *et al.*, 2012) y es una pesquería que desde los años 70 ha presentado un incremento constante, estable y que representó el 2.6% de la pesca a nivel nacional en el período de 1987-1991 (Bonfil, 1994).

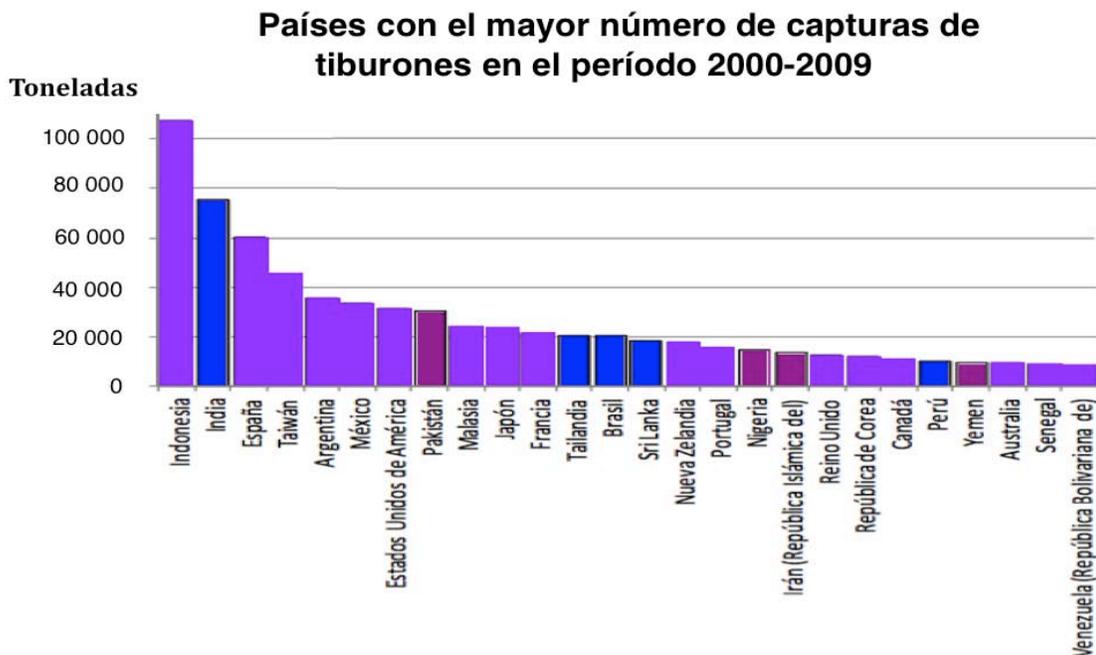


Figura 8. Captura en toneladas de tiburones por países. También se indica el Plan de acción internacional de la FAO en 1999 para la conservación y ordenación de los tiburones, donde se alentaba a los países a elaborar planes de acción nacionales, en morado aprobados, azul en preparación y guinda ausencia o desconocimiento de los planes (modificada FAO, 2012).

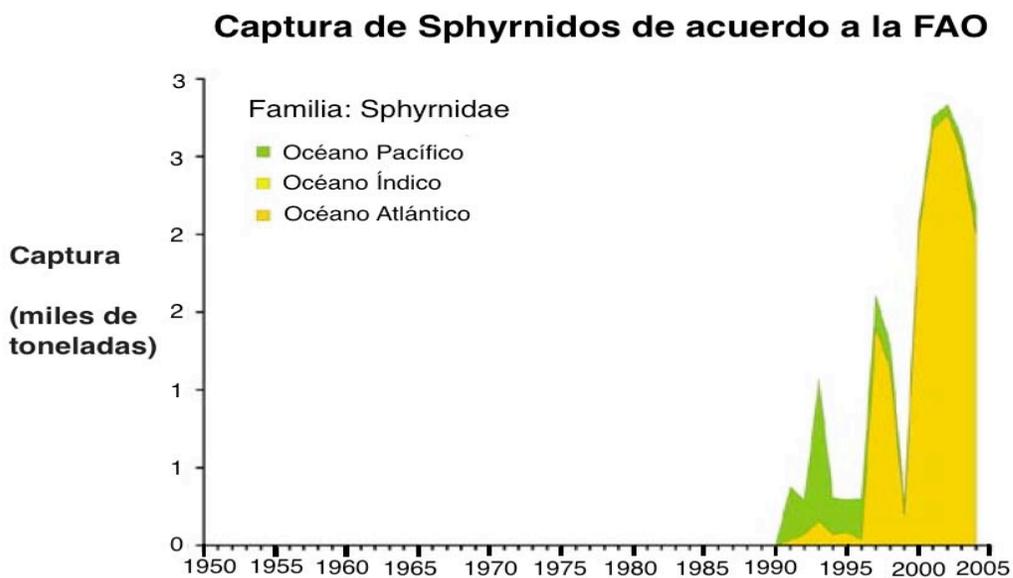


Figura 9. Captura de miles de toneladas de *Sphyrna tiburo*, *S. mokarran*, *S. lewini*, *S. zygaena* y *S. media* en el Océano Pacífico, Índico y Atlántico, con datos de la FAO en el período 1990-2004 (modificado de Maguire *et al.*, 2006).

Por su extensión costera, el Pacífico mexicano contribuye con el 60% de las capturas de tiburones, mientras que el Golfo de México y el Caribe proporcionan el 40% restante. Se capturan alrededor de 44 especies de tiburones en México siendo los géneros *Carcharhinus* y *Sphyrna* los más extraídos por la pesca como se observa en la Figura 10 (Bonfil, 1994; Fischer *et al.*, 2012).

La especie más importante en el Golfo de México y el Mar Caribe, en términos pesqueros es *Rhizoprionodon terraenovae*, (aunque desafortunadamente este organismo presenta indicios de sobreexplotación), en tanto que *Sphyrna tiburo* lo es en las costas de Tabasco, Campeche y Yucatán. Respecto a la pesca del tiburón cabeza de pala, la temporada con mayor número de capturas para Campeche se ha registrado en el período de junio a octubre, con un máximo en el mes de agosto y menor presencia en los meses de febrero a abril, aunque permanece en menor proporción en el estado todo el año. En Tabasco se encuentra mayoritariamente en abril y en menor cantidad en junio-julio, registrándose también a lo largo del año (Bonfil, 1994; CONAPESCA-INP, 2004; DOF, 2015).

En este sentido los daños ecológicos se deben a la alta incidencia de captura de tiburones, la talla y estadio de los organismos capturados (neonatos, juveniles y hembras preñadas). Por dichos motivos en el afán de mejorar, regular o conservar a las especies de tiburones, el gobierno mexicano ha diseñado períodos de veda en diferentes especies de la fauna acuática, dadas a conocer en el Diario Oficial de la Federación del numeral segundo, fracción XXIV incisos b y c, que se aplica en el Golfo de México y el Mar Caribe. Específicamente los períodos de vedas en Tabasco, Campeche y Yucatán comienzan el 15 de mayo-15 de junio y una segunda temporada del 1-29 (DOF, 2014).

Un gran problema de la pesca de tiburón son los altos niveles de extracción de individuos juveniles, pues aproximadamente el 50% de la pesca artesanal está integrada por organismos inmaduros, particularmente en Campeche y Yucatán (Bonfil, 1994; DOF, 2015). Esto incrementa la posibilidad de colapso de la pesquería de *S. tiburo* en ambas costas. Sin embargo, por el momento *Sphyrna tiburo* es una especie que se considera en la categoría de preocupación menor según la IUCN Red List of Threatened Species (Cortés, 2005). Aunque Pérez-Jiménez (2014) propone se modifique el estatus de *S. tiburo* a la categoría de en peligro o peligro crítico, debido a su potencial extirpación en el Pacífico mexicano.

### Captura de tiburones en México por grupos taxonómicos en el año 2010

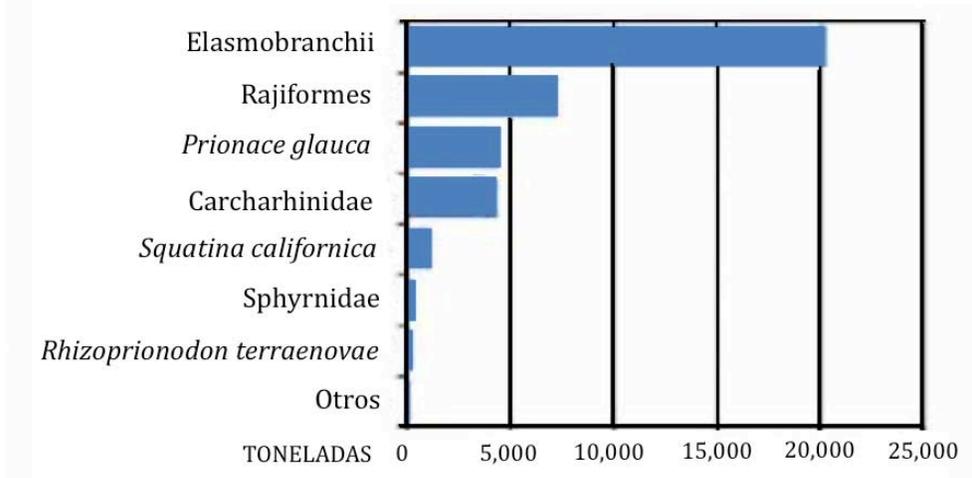


Figura 10. Captura en toneladas de grupos taxonómicos en México del año 2010, mostrando a la familia Sphyrnidae, modificada de Fischer *et al.*, 2012.

La pesca en las aguas de la costa Atlántica de Estados Unidos consiste en la división actual de 1) Grandes tiburones costeros: entre los que se encuentran *Sphyrna lewini*, *S. mokarran*, *S. zygaena*, *Carcharhinus limbatus*, *C. leucas*, entre otros 2) Pequeños tiburones costeros: *Rhizoprionodon terraenovae*, *S. tiburo*, *C. acronotus* y *C. isodon* 3) Tiburones pelágicos: entre los que destacan *Prionace glauca*, *Isurus oxyrinchus*, *C. longimanus* 4) Tiburones prohibidos: *Rhincodon typus*, *Carcharodon carcharias* y *Carcharias taurus* por mencionar algunos (Cortés y Neer, 2009).

Por lo tanto el plan de manejo en la costa del Atlántico de Estados Unidos consiste en la reducción anual de la captura de los grandes y pequeños tiburones costeros, incremento en la extracción de algunas especies de tiburones pelágicos, prohibición en la captura de diecinueve especies de tiburones, la extracción mínima recreativa de uno a dos tiburones con un tamaño mínimo de 137 cm y el informe a las autoridades de parte de las flotas pesqueras sobre decesos incidentales que pudieran causar (Cortés y Neer, 2009).

Respecto a los cuatro tiburones costeros capturados en el Atlántico de Estados Unidos *S. tiburo*, *R. terraenovae* y *C. acronotus* representan alrededor del 94% de las capturas totales. De éstas un pequeño porcentaje los extraen los desembarques y otros son capturados de manera incidental y descartados (Figura 11) (Cortés y Neer, 2009).

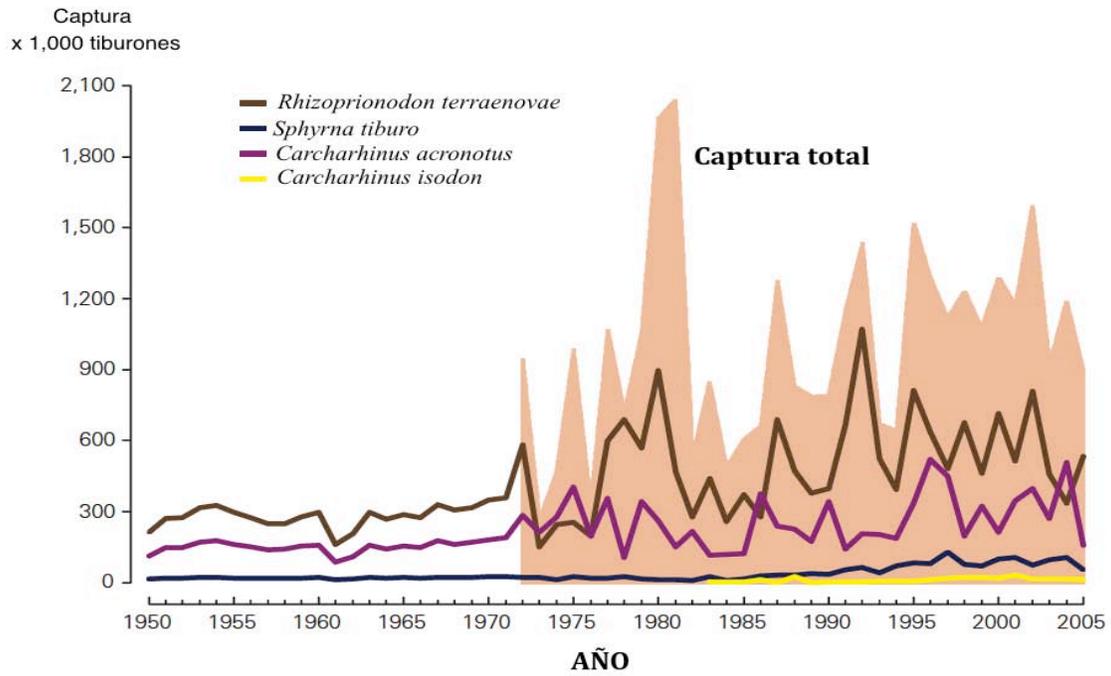


Figura 11. Captura de los cuatro tiburones costeros en el Atlántico de Estados Unidos en el período 1950-2005. Modificado de Cortés y Neer, 2009.

### III. HIPÓTESIS

Estudios de marcaje-recaptura en *S. tiburo*, han detectado migraciones limitadas o nulas, entre las costas del oeste y este de Florida, adicionalmente se han reportado diferencias en algunas características de la historia de vida del tiburón cabeza de pala, entre estuarios a lo largo de la costa del Golfo de México de la península de Florida, que han sido relacionadas con un gradiente térmico debido a la zona de transición entre aguas templadas y tropicales. Por lo tanto, se espera bajo flujo génico entre las costas del este y oeste en Florida y las del sureste mexicano, así como diferencias genéticas entre las poblaciones de la zona tropical y templada.

### IV. OBJETIVOS

#### 4.1. Objetivo general

- Evaluar los niveles de diversidad genética de *S. tiburo*, mediante el análisis de secuencias del mtDNA con el fin de determinar el nivel de estructura genética e inferir la historia demográfica en diferentes sitios de abundancia de las costas de Florida y aguas nacionales del Golfo de México.

- 

#### 4.2. Objetivos particulares

- Determinar la variabilidad genética en poblaciones de *S. tiburo* en Florida y costas del Golfo de México.
- Obtener estimadores de divergencia génica del tiburón cabeza de pala (estadísticos F, pruebas de homogeneidad) considerando la posibilidad de divergencia de las poblaciones del este y oeste de Florida y sureste mexicano, la transición de aguas templadas y tropicales y las posibles diferencias entre México y Florida.
- Estimar los parámetros de demografía histórica de *S. tiburo* mediante los modelos de expansión demográfica y espacial y relacionarlo con eventos geológicos.
- Verificar si los patrones filogeográficos coinciden con una señal de divergencia genética relacionada con un gradiente de temperatura y/o diferencias biológicas.

## V. MÉTODOS

### 5.1. Colecta y preservación del material biológico

Para el presente estudio se emplearon 260 muestras provenientes de diferentes puntos de la Península de Florida (costas del Golfo de México y océano Atlántico) entre 1996-2012 y del sureste mexicano (Campeche y Tabasco) del período 2011-2013 (Tabla 1, Anexo 1, Figura 12). Se obtuvieron alrededor de diez gramos de tejido muscular para las localidades de México (Campeche y Tabasco) y dos gramos de los organismos de Florida.

Los tejidos del sureste mexicano fueron obtenidos del tiburón entre la aleta pectoral y pélvica a una profundidad de al menos tres centímetros, en otros casos el tejido fue tomado de la cabeza del tiburón. La colecta se llevó a cabo con los pescadores que se encontraban en la costa y en mercados locales cercanos a la zona de estudio; posteriormente el tejido se preservó en tubos de muestreo con alcohol etílico al 70%, todas las muestras de México fueron reunidas por integrantes del equipo de trabajo de la UNAM.

Las muestras de Florida fueron colectadas en su totalidad por el Florida Fish and Wildlife Conservation Commission-fish and Wildlife Research Institute's (FWC-FWRI), a través de programas de monitoreo independiente de pesquerías, el cual realiza cruceros de investigación que se centran en estuarios y costas contiguas. De la misma forma, algunas muestras provienen de pesca comercial y deportiva en el Golfo de México y la Costa Atlántica de Florida, las cuales se preservaron en etanol al 70%.

Para cada uno de los ejemplares, tanto de México como de Florida, se registró el sexo, y la longitud total y furcal. El procesamiento y análisis de las muestras se llevó a cabo en el Laboratorio de Genética de Organismos Acuáticos en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM, campus central.

Tabla 1. Datos de la zona de colecta de *S. tiburo* y número de muestras.

<b>Año de colecta</b>	<b>Región</b>	<b>Localidad</b>	<b>Coordenadas aproximadas</b>	<b>Número de muestras</b>
<b>2010 y 2011</b>	Florida (CK)	<b>Cedar Key</b>	29° 08'23''N -83° 02'09''O	42
<b>2010-2012</b>	Florida (CH)	<b>Charlotte Harbor</b> (Peace River, Myakka River, Sanibel, Naples y Charlotte Harbor)	26° 57'30''N 82° 04'01''O	42
<b>2010-2011</b>	Florida (OFF)	<b>Offshore, Golfo de México</b>		14
<b>2003 y 2007</b>	Florida (FK)	<b>Florida Keys</b> (Florida Bay y Juno Beach)	25° 08'11''N 80° 14'15''O	5
<b>1996,2000-2001, 2004, 2007, 2009-2010 y 2012</b>	Florida (CENT)	<b>Florida Central</b> (Indian River Lagoon, Mosquito Lagoon, Cape Canaveral, Sebastián y Fort Pierce)	28° 03'19''N 80° 34'32''O	15
<b>2003-2004 y 2006-2012</b>	Florida (JX)	<b>Jacksonville</b> (Amelia City, Nassau Sound, Mayport, Flager beach, Fernandina Beach, Daytona y Jacksonville)	30° 19'49''N 81° 39'06''O	48
<b>2011 y 2012</b>	Campeche (CAM)	<b>Campeche</b> (Mercado: Cd. Del Carmen, Champotón; y Ciudad de Campeche)	18° 31'21''N 92° 39'06''O	57
<b>2013</b>	Tabasco (TAB)	<b>Tabasco</b> (Frontera: Mercado, La Barra y San Pedro)	18° 64'44''N 92° 40'15''O	37



Figura 12. Ubicación espacial de las localidades de éste estudio las abreviaturas corresponden a Cedar Key (CK), Charlotte Harbor (CH), Offshore “fuera de la costa” del Golfo de México de Florida o sin punto geográfico específico (OFF), Florida Keys (FK), Florida Central (CENT), Jacksonville (JX), Campeche (CAM) y Tabasco (TAB), en paréntesis se encuentra el tamaño muestral.

## 5.2. Extracción y amplificación del mtDNA

De las muestras colectadas de *S. tiburo* se extrajo el material genético siguiendo el protocolo de Laird *et al.*, (1991) como se detalla en el Anexo 2 con el Kit de purificación Promega, manteniendo el DNA a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  para evitar su degradación.

Posteriormente se amplificó la región ND4 (NADH deshidrogenasa subunidad 4) del DNA mitocondrial, con los primers o cebadores ND4 F 5' CACCTATGACTACCAAAAGCTCATGTAGAAGC 3' Arevalo *et al.*, (1994) y ND4 R 5' TTGCACCAAGAGTTTTTGGTTCCTAAGACC 3' Inoue *et al.*, (2001) mediante la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction o Reacción en Cadena de la Polimerasa).

Para el PCR, los reactivos se utilizaron a una concentración de  $0.025\text{ U}/\mu\text{l}$  de Taq Polimerasa de la marca invitrogen, una concentración de primer de  $1\text{ pmol}$ , Cloruro de Magnesio ( $\text{MgCl}_2$ )  $3\text{ mM}$ , por último  $20\text{ mM}$  de Tris-HCl (pH 8.4);  $500\text{ mM}$  de KCl, por cada  $1\text{ }\mu\text{l}$  de reacción, llevándola a  $15\text{ }\mu\text{l}$  de volumen final con un volumen de DNA en stock de  $0.30$  a  $1.5\text{ }\mu\text{l}$  de DNA, dependiendo de la calidad de éste, e incluso en diluciones 1:5 o 1:10.

En algunas muestras que no se lograban amplificar se recurrió a la cuantificación del DNA, la cual se estimó entre  $100\text{-}150\text{ ng}/\mu\text{l}$ , poniendo de ésta manera más volumen de DNA por muestra amplificada.

La amplificación de cada muestra se llevó a cabo con el equipo Axygen Maxygene y con un programa de amplificación que consistió de una desnaturalización inicial de 94 °C durante un minuto, seguida de treinta ciclos a 94 °C durante 30 segundos de desnaturalización, 50 °C durante 30 segundos de alineamiento, 72 °C 30 segundos de extensión y 72 °C 5 minutos de extensión final teniendo una duración aproximada de dos horas.

La verificación de los productos de PCR se llevó a cabo por medio de geles de agarosa ultrapura de invitrogen al 1%, con un buffer de corrida TBE 1X (Tris, Borato y ácido etilendiaminotetraacético "EDTA"), en una cámara de electroforesis marca BIO RAD, a 100 V, 400 mA por 30 minutos y visualizados finalmente en un transiluminador de rayos UV marca UVP. Los productos de amplificación bien definidos y con el menor barrido posible, fueron secuenciados en placa con la técnica *Sanger* en el Centro Genómico de Alto Rendimiento (High Throughput Genomics Center) ubicado en Seattle, Washington, Estados Unidos (<http://www.htseq.org>).

### 5.3. Análisis de datos

Se obtuvieron un total de 260 secuencias de buena calidad de la región ND4 del DNA mitocondrial, con una longitud de 819 pares de bases. Para cerciorarse que las secuencias se trataban del organismo de estudio, se realizó una búsqueda por herramienta de alineación local básica, Blast (Basic Local Alignment Search Tool) en la base de datos de secuencias genéticas de GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Las secuencias de este trabajo tuvieron identidades nucleotídicas con la deshidrogenasa subunidad 4 (ND4) de *Sphyrna lewini* con 91% de identidad y el código de acceso HQ530221.1 y con la región ND4 de *Eusphyra blochii* con un 90% de identidad y el código de acceso DQ422042.1; de tal modo que se observa una similitud nucleotídica significativa con la familia Sphyrnidae.

Para un posterior análisis, las secuencias fueron editadas manualmente mediante el programa BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999). Una vez revisadas las secuencias fueron alineadas con la herramienta Clustal W donde se verificó que las mutaciones fueran verdaderas y no artefacto del secuenciador también con el programa BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999).

Con fines prácticos los nombres de los sitios de estudio se abreviarán de la siguiente forma: Florida Central (CENT), Florida Keys (FK), Cedar Key (CK), Charlotte Harbor (CH), Jacksonville (JX), Offshore "fuera de la costa" donde agrupa individuos a lo largo del Golfo de México de Florida que no se encontraban cerca de la plataforma continental (OFF), Campeche (CAM) y Tabasco (TAB), como se observa en la Figura 12.

Finalmente éste trabajo incluyó secuencias reportadas y obtenidas por Escatel-Luna *et al.*, (2015) las cuales provienen de los mismos sitios de estudio que se describieron anteriormente, dichas secuencias provienen de la región control mitocondrial con una longitud de 942 pares de bases y un total de 252 muestras, que se concatenaron a las secuencias de ND4 obtenidas en el presente estudio (ambos marcadores ND4 y región control, se les denominará concatenados para mayor practicidad), dando como resultado una longitud de 1,761 pares de bases y 252 individuos. Los análisis realizados con ambos marcadores fueron los parámetros de diversidad genética, las estimaciones de diferenciación genética, el Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) y los perfiles demográficos bayesianos, esos análisis también se realizaron sólo para la región ND4 los cuales se encuentran en el apartado de anexos.

*5.3.1. Parámetros de diversidad genética.* Por medio de los programas DnaSP 5.10.01 (Librado y Rozas, 2009) y Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005), se estimó la diversidad haplotípica ( $Hd$ ) y nucleotídica ( $\pi$ ), el número haplotipos ( $H$ ), número de sitios segregantes o polimórficos ( $S$ ) por localidad presentes en los haplotipos resueltos, para la región ND4 y las secuencias concatenadas.

La diversidad haplotípica ( $Hd$ ) se define como la probabilidad de que dos haplotipos tomados al azar sean el mismo (Nei, 1987); donde  $k$ = número de haplotipos diferentes y  $p_i$  es la frecuencia de cada  $i$  haplotipo.

$$h = \frac{n}{n-1} \left( 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)$$

La diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) es el número de nucleótidos diferentes por sitio entre dos secuencias elegidas al azar (Nei y Li, 1979)

$$\pi = \sum_{ij} x_i x_j \pi_{ij}$$

Donde  $x_i$  es la frecuencia de la secuencia  $i$ ,  $x_j$  se refiere a la frecuencia de la secuencia  $j$  y  $\pi_{ij}$  es la proporción de nucleótidos diferentes entre las secuencias  $i$  y  $j$  (Nei y Li, 1979).

El número de haplotipos ( $H$ ), denota el número de genotipos haploides y la constitución genética de un cromosoma individual (FAO, 2010).

El número de sitios segregantes o polimórficos ( $S$ ) en una población son aquellos alelos presentes dos o más veces para un locus (Hamilton, 2009).

*5.3.2. Análisis de enrarecimiento de muestras.* Se llevó a cabo mediante el programa AZDE 1.0 Allelic Diversity Analyzer (Szpiech *et al.*, 2008), el cual consiste en encontrar el número “alelos distintos” (riqueza de alelos) de cada una de las poblaciones *versus* el número de “alelos privados” o que no se encuentran en ninguna otra población. Ambos conceptos de alelos dependen del tamaño de muestra, por ello la idea del enfoque de rarefacción es ajustar todas las localidades a un mismo tamaño muestral para comparar y no subestimar la diversidad de las poblaciones sujetas a estudio (Szpiech *et al.*, 2008). Finalmente se debe tener en consideración que los alelos son los haplotipos en éste trabajo.

*5.3.3. Estructura poblacional.* Con el programa Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005), se obtuvieron los índices de diferenciación genética  $F_{ST}$  entre localidades para secuencias mitocondriales y loci haploides; los cuales se representan como  $\Phi_{ST}$  pues utiliza la diversidad nucleotídica y no la heterocigosis observada para estimar las diferencias pareadas entre localidades, esto fue con 20,000 permutaciones (Excoffier *et al.*, 1992). Se evaluó el modelo evolutivo para el grupo de secuencias analizadas mediante jModeltest 2 (Darriba *et al.*, 2012) y se calculó posteriormente la matriz de distancias contemplando el modelo de sustitución obtenido con el modelo de Tamura 3 parámetros (Tamura, 1992; Tamura *et al.*, 2013) por medio del programa MEGA 6.06.

Las  $\Phi_{ST}$  pareadas se calcularon de la misma manera para las secuencias concatenadas con los mismos programas y parámetros, el modelo de sustitución que mejor se ajustaba coincidió con la región ND4 al ser Tamura 3 parámetros (Tamura *et al.*, 2013). También para estas muestras se usó el programa MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013) para elaborar un dendograma por el método de UPGMA, por medio de las  $\Phi_{ST}$  pareadas que se calcularon anteriormente.

Asimismo, por medio del programa Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005), se realizó la prueba de Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) con la matriz obtenida en MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013) y asumiendo el modelo de Tamura 3 parámetros con 10,000 permutaciones no paramétricas (Excoffier *et al.*, 2005) para determinar el grado de diferenciación genética en los diferentes niveles jerárquicos; dentro de las poblaciones, entre poblaciones y entre grupos de poblaciones,

El AMOVA divide en grupos las poblaciones para probar diferentes niveles de posible estructura genética, al evaluar los componentes de la varianza genética para los mismos, en tres niveles los cuales son: entre grupos ( $\Phi_{CT}$ ), entre poblaciones dentro de los grupos ( $\Phi_{SC}$ ) y los individuos dentro de las poblaciones ( $\Phi_{ST}$ ) (Excoffier *et al.*, 1992).

Los grupos propuestos para realizar la prueba de AMOVA fueron tres. El primero se definió debido a que las muestras provienen de dos regiones principales: Florida (Estados Unidos) y México. Siendo un criterio que tomó en cuenta la distancia geográfica que se encuentra entre ambos países. En Estados Unidos las localidades agrupan son CK, CH, FK, OFF, CENT, JX; y de jurisprudencia mexicana CAM y TAB.

El segundo criterio dividió a la península de Florida en el Golfo de México en la parte oeste (CK, CH, FK, OFF) y el Atlántico en la este (JX, CENT). También separó a las localidades mexicanas (CAM, TAB), nuevamente, al existir una distancia considerable entre éstas poblaciones y las de Estados Unidos. Esta división se sustenta, como se dijo anteriormente, con estudios de marcaje y recaptura del tiburón cabeza de pala, pues no se han reportado migraciones de las costas del Atlántico hacia el Golfo de México o viceversa, esto en la península de Florida (Kohler *et al.*, 2013; Tyminski *et al.*, 2013).

El tercer y último criterio agrupa a las localidades de JX y CK ambas ubicadas en la parte norte de Florida y en la parte sur congrega a CH, OFF, FK, CENT. Ésta regionalización es con base en un gradiente de temperatura de aguas tropicales y cálidas y la presencia de ecorregiones marinas con características distintivas (Figura 5 y 6), sumado a la evidencia del patrón de variación clinal (mencionado con anterioridad), es decir, que a mayor latitud las poblaciones de *S. tiburo* presentes en Florida de la parte del Golfo de México, son de mayor talla, con tasa de crecimiento superior, tardía edad de la madurez sexual, tamaño y peso considerable de los embriones, tanto en hembras y machos, en comparación con las poblaciones sureñas (Parsons 1993a; Parsons 1993b; Lombardi-Carlson *et al.*, 2003). Esto puede proporcionar un gran aporte desde un enfoque genético a los datos biológicos reportados *a priori* (aunque sólo se han reportado estas características para el Golfo, se esperaba que se emularan en el Atlántico de Florida). Finalmente, las poblaciones presentes en aguas mexicanas también fueron agrupadas.

De manera alterna, se hizo un análisis SAMOVA Análisis Espacial de Varianza Molecular, con el programa SAMOVA 2.0 (Dupanloup *et al.*, 2002), considerando de tres a cinco grupos y asumiendo el modelo evolutivo de Tamura con 1,000 permutaciones. SAMOVA define a los grupos de poblaciones incorporando un criterio geográfico y genético con base en

la búsqueda de estructura poblacional que maximiza las diferencias entre poblaciones, de forma que sea posible la identificación de barreras genéticas entre grupos. Su procedimiento maximiza la proporción de la varianza genética total dada por las diferencias entre los grupos de poblaciones (Dupanloup *et al.*, 2002) y se lleva a cabo mediante matrices: con coordenadas geográficas de cada población y mediante valores de  $\Phi_{ST}$ .

Ya que SAMOVA contempla las coordenadas geográficas para la agrupación de las poblaciones, la localidad que no cuenta con un punto geográfico específico, pues reúne individuos que se encuentran alejados de la costa y a lo largo del Golfo de México de Florida, es OFF, por lo que se decidió omitir del análisis.

Finalmente, para detectar posibles barreras geográficas que limiten el flujo genético se utilizó el programa Barrier 2.2 (Manni *et al.*, 2004) y se indicó que el número de barreras trazadas fuera tres. Barrier basa su método en la asociación de distancias genéticas ( $\Phi_{ST}$ ) y geográficas (coordenadas), los cuales son los dos ejes de simetría, con un enfoque en la geometría computacional (Manni *et al.*, 2004). El algoritmo implementado es el de máxima diferencia de Monmonier (Monmonier, 1973), el cual separa las poblaciones con mayor número de diferencias genéticas.

Por medio de un mosaico Voronoï se representa un barrido poligonal para cada población, que está constituido por aquellos puntos en el plano más cercanos a cada muestra. El mosaico, por lo tanto, indica que poblaciones son vecinos adyacentes si los polígonos de Voronoï tienen un borde común (Voronoi, 1908; Manni *et al.*, 2004). Para conectar el conjunto de puntos se ocupa la triangulación de Delaunay y los puntos que conecta son los vértices Voronoï (Brassel y Reif, 1979; Manni *et al.*, 2004). Como éste programa también requiere de coordenadas geográficas la localidad de OFF tampoco fue incluida.

Adicionalmente con las barreras trazadas por medio de Barrier en un mapa, se colocaron para cada localidad gráficas de pay obtenidas en Microsoft Excel 2013, que consideraron la presencia del haplotipo y la abundancia del mismo.

*5.3.4. Demografía histórica.* Se obtuvieron gráficas con la distribución de diferencias nucleotídicas entre pares únicos de secuencias de DNA (haplotipos) en las poblaciones de S. tiburo (conocido como análisis de distribución “*mismatch*” o distribución de diferencias pareadas) con el marcador mtND4. En este, la frecuencia del número de diferencias entre secuencias se representa mediante histogramas, los que presentan formas características dependiendo de cada población, relacionados con diferentes escenarios de su historia demográfica. Es una herramienta que puede ser usada para hacer inferencias de la historia

evolutiva de las poblaciones tales como cuellos de botella, tamaño efectivo de las poblaciones en el pasado y si han mantenido un tamaño constante o no en el tiempo (Slatkin y Hudson, 1991; Hamilton, 2009; Frankham *et al.*, 2010).

Esta herramienta se basa en el modelo de sitios infinitos de Watterson (1975), sin considerar la recombinación y bajo la hipótesis nula de que la población tiene un tamaño constante, por tanto, la distribución de diferencias pareadas es multimodal si la población se encuentra usualmente en equilibrio demográfico y es unimodal o con una distribución similar a la de Poisson cuando las poblaciones han sufrido expansión demográfica recientemente o un rango de expansión con altos niveles de migración entre poblaciones (Slatkin y Hudson, 1991; Excoffier *et al.*, 1992). Por medio de la distribución de diferencias pareadas se pueden obtener los parámetros  $\tau$ ,  $\theta_0$  y  $\theta_1$  de expansión demográfica, estos se calcularon por medio del programa Arlequin 3.1 con 10,000 permutaciones (Excoffier *et al.*, 2005). Las distribuciones de diferencias pareadas se graficaron en Microsoft Excel 2013, donde se descartó la población de FK debido a la baja cantidad de individuos (5).

Para calcular los modelos de expansión demográfica y espacial se utilizó el programa Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005), considerando 10,000 réplicas con reemplazo (*bootstrap*), bajo el modelo de diferencias pareadas.

De esta forma el modelo de **expansión demográfica**, asume que una población que se encuentra en equilibrio y estacionaria pasó en  $\tau$  generaciones de un tamaño efectivo poblacional  $N_0$  a un tamaño  $N_1$  después de una reducción o crecimiento considerable. El parámetro  $\tau$  (tiempo mutacional desde la ocurrencia de la expansión en generaciones) tiene la siguiente fórmula:  $\tau = 2\mu t$  donde  $\mu$  es la tasa de mutación por generación de la secuencia y  $t$  = el tiempo transcurrido (generaciones) desde la expansión demográfica (Rogers y Harpending, 1992).

Para la tasa de mutación de *S. tiburó* se tomó un rango de 1.21% por millón de años registrada en *S. lewini* de la región control (Nance *et al.*, 2011) y 2.3% por millón de años del Citocromo B de *S. tiburó* (Martin *et al.*, 1992), al no haber una tasa de mutación específica para el ND4 de *S. tiburó*.

Los tamaños efectivos poblacionales de genomas haploides, como el ND4 mitocondrial, que se heredan de forma uniparental por ser genoma de hembras antes de la expansión ( $\theta_0$ ) y posterior a la expansión demográfica ( $\theta_1$ ), se calcularon por medio de las ecuaciones:  $\theta_0 = 2\mu N_0$  y  $\theta_1 = 2\mu N_1$ ; donde  $N$  representa el tamaño efectivo poblacional de las

hembras para la población inicial denotada como  $N_0$  y que crece hasta un tamaño efectivo  $N_1$  (Rogers y Harpending, 1992).

Debido a que una distribución unimodal de diferencias pareadas puede resultar de una **expansión espacial** se calcularon los parámetros  $\tau$ ,  $\theta$  y  $M$ , a través del programa Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005), que basa su método en un símil del modelo continente-isla y considera las distribuciones de diferencias (Excoffier *et al.*, 2005). Los parámetros se simulan en un rango de expansión el cual consiste en una matriz bidimensional de demes (subpoblaciones) que intercambian una determinada proporción de migrantes ( $m$ ) con las poblaciones vecinas, mediante un enfoque coalescente para generar la diversidad genética en una muestra de genes (Ray *et al.*, 2003).

Los patrones generados por la diversidad dentro de los demes, no solo dependen de la expansión espacial que puede llevar a la misma señal de la distribución de diferencias pareadas de una expansión demográfica en una población panmíctica, solo si los demes intercambian cincuenta o más migrantes; en otras palabras, se asocia con el nivel de flujo de genes entre demes vecinos medida por el producto  $Nm$  donde  $N$ = tamaño dentro de un deme (Ray *et al.*, 2003).

Las simulaciones de Ray *et al.*, (2003) se realizan en dos fases, la primera es la “fase de dispersión” la cual suele ser rápida y concluye cuando toda la variación se distribuye en los demes (homogenización) y se caracteriza por una serie de eventos coalescentes iniciales y eventos de migración en los demes. La segunda fase es la de “recolección”, la cual tiene una duración temporal mayor y describe el proceso de coalescencia entre el final de la fase de dispersión y el evento coalescente final, ésta se caracteriza por varios eventos migratorios y pocos eventos coalescentes.

Cada deme con tamaño  $N_f$  intercambia  $m$  migrantes por generación, que en un tiempo  $t$  bajo el modelo continente-isla estuvo reducido a solo una población con tamaño  $N_0$ . Para calcular los migrantes por generación ( $m$ ) se utiliza la ecuación  $M= 2Nm$  y del valor  $\theta$ . Con la tasa de mutación se calculó el tamaño efectivo de los demes  $N_f$  gracias a la fórmula  $\theta=2\mu N_0$  (Ray *et al.*, 2003). Adicionalmente se necesita conocer la edad de madurez sexual de *S. tiburo* que es de 2-3 años (Carlson y Parsons, 1997) del cual se tomó un promedio (2.5 años).

Las desviaciones en la suma de los cuadrados (*SSD*), se emplearon para probar la validez del modelo de expansión demográfica entre valores observados provenientes de una población en expansión, éste parámetro adquiere valores bajos o altos en una población

estacionaria según la distribución de diferencias pareadas, todo bajo el modelo de expansión súbita (Excoffier *et al.*, 2005).

Para comprobar si las mutaciones del marcador ND4 eran selectivamente neutras (Kimura, 1983), se aplicaron dos pruebas de neutralidad:  $D$  de Tajima y  $F_s$  de Fu. Ambas pruebas se realizaron mediante el programa Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005), con 1,000 réplicas, las cuales asumen el modelo de sitios infinitos. La primera se basa en las diferencias de los estimadores  $\pi$  y  $\theta$ , cuando  $\pi$  es mayor que  $\theta$ ,  $D$  obtiene valores positivos que indican un proceso de estabilidad poblacional o selección positiva, por otro lado, cuando  $D$  adquiere valores negativos hay presencia de mutaciones deletéreas o expansión poblacional y si  $\pi$  es igual a  $\theta$ , se asume un equilibrio neutro (Tajima, 1989).

La segunda prueba fue la  $F_s$  de Fu, la cual también asume el modelo sitios infinitos, en donde se busca la probabilidad de que una muestra tomada al azar sea neutra en una población dada. Supone también que las mutaciones antiguas se van a encontrar con mayor probabilidad en las ramas más ancestrales (ramas internas) y las mutaciones más recientes en las ramas más nuevas (ramas externas). Cuando se presentan eventos de expansión los valores  $F_s$  de adquieren valores negativos (Fu y Li, 1993; Fu, 1997).

Por último se efectuó el análisis Bayesian Skyline Plot o Perfil Demográfico Bayesiano por medio del programa BEAST 1.6.1 “*Bayesian evolutionary analysis by sampling trees*” (Drummond y Rambaut, 2007), con 200 millones de iteraciones para el marcador ND4, considerando la tasa de mutación de 2.3% por millón de años del Citocromo B de *S. tiburo* (Martin *et al.*, 1992) y la tasa de 1.21% por millón de años de la región control en *S. lewini* (Nance *et al.*, 2011), nuevamente al no existir una tasa de mutación específica para la región ND4 en *S. tiburo*.

También se realizó el mismo análisis para las muestras concatenadas con 100 millones de iteraciones, las cuales se dividieron por localidades considerando las gráficas de distribución de diferencias pareadas (Escatel-Luna *et al.*, 2015), agrupando juntas a aquellas localidades con tiempos de coalescencia similares que fueron CK-CH, CENT-JX y CAM-TAB. Se consideró nuevamente la tasa de mutación de 1.21% por millón de años de *S. lewini*, obtenida de la región control (Nance *et al.*, 2011); y la reconstrucción de los Perfiles Demográficos se hicieron con el programa Tracer 1.5 (Drummond y Rambaut, 2007).

El Perfil Demográfico Bayesiano es un método que estima la dinámica de las poblaciones en el pasado a través del tiempo mediante una muestra de secuencias

moleculares, sin requerir un modelo paramétrico pre-especificado de historia demográfica (Drummond *et al.*, 2005).

Los procedimientos de muestreo se logran mediante Cadenas de Markov por algoritmo Monte Carlo, donde se combinan los perfiles demográficos para generar una distribución posterior de tamaño efectivo poblacional a través del tiempo. Posteriormente se traza un horizonte bayesiano con los datos simulados de forma coalescente, reconstruyendo la historia demográfica, con un margen de error del 95% (Drummond *et al.*, 2005).

*5.3.5. Reconstrucción de la filogenia y red de haplotipos.* De acuerdo a los datos obtenidos del marcador ND4, se buscó el modelo evolutivo de sustitución nucleotídica que mejor se ajustara a los resultados por medio del programa jModelTest 2 (Darriba *et al.*, 2012), seleccionando el Criterio de Información Akaike (AIC) y obteniendo como resultado el modelo evolutivo TPM1uf (Kimura, 1981), para posteriormente calibrar con éste modelo los análisis posteriores.

El dendograma de haplotipos se construyó a través del programa MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013) mediante el método de Neighbor-joining con base en datos de distancia evolutiva. El principio básico del método es encontrar pares de Unidades Taxonómicas Operacionales (*OTU's* por sus siglas en inglés), con lo cual va minimizando la longitud total de la rama en cada agrupamiento de *OTU's*. Adicionalmente éste método asume que las secuencias tienen un rango distinto de evolución a lo largo del tiempo, por lo tanto no considera la existencia de un reloj molecular (Saitou y Nei, 1987; Zvelebil y Baum, 2008).

La evaluación de los nodos, se llevó a cabo por el método de re-muestreo sin reemplazo con 10,000 réplicas, el cual consiste en puntos de remuestreo de los mismos datos por medio de sustitución, la variación resultante de las estimaciones indica el tamaño del error; de esa manera se obtiene el soporte de las ramas en las filogenias (Felsenstein, 1985; Zvelebil y Baum, 2008).

De forma complementaria se aplicó la inferencia Bayesiana, para estimar el árbol filogenético de los dieciocho haplotipos del marcador ND4 presentes en este estudio. El análisis se llevó a cabo mediante el programa MrBayes 3.2.6 "Bayesian Analysis of Phylogeny" (Ronquist y Huelsenbeck, 2003) y las probabilidades posteriores se calcularon con cuatro cadenas de Markov y diez millones de generaciones cada una.

La inferencia bayesiana aplica la distribución de la probabilidad posterior de un árbol, que se puede explicar cómo la probabilidad que un árbol sea el que dibuje la historia de los

haplotipos presentes en las poblaciones. Estas probabilidades posteriores están dadas por el resultado del teorema de Bayes (Yang y Rannala 1997; Huelsenbeck y Ronquist, 2001; Eguiarte *et al.*, 2007).

El método para la optimización numérica en la inferencia bayesiana es conocido como Cadenas de Markov por algoritmo Monte Carlo (MCMC), donde en cada repetición el algoritmo va sugiriendo un nuevo árbol que se ve influido en forma por el vector de longitud de las ramas y los parámetros del modelo de sustitución (Eguiarte *et al.*, 2007).

La especie con la que se decidió enraizar el dendograma y el árbol de inferencia Bayesiana fue *S. lewini* (con código de acceso a GeneBank HQ530221.1), que como se mencionó anteriormente comparte un 91% de identidad con *S. tiburo* en la región ND4.

En cuanto a la red de haplotipos, se construyó por medio del programa Network 4.4.1.3 (Polzin y Daneschmand, 2003) que usa el algoritmo de median-joining (*MJ*) con base en la introducción limitada de las posibles secuencias ancestrales (haplotipos) en una red de expansión mínima de las secuencias observadas, las secuencias ancestrales probables se identifican por medio del cálculo de la mediana de los haplotipos. Asimismo, se utiliza con mayor frecuencia para los haplotipos intraespecíficos estrechamente relacionados (Jobling *et al.*, 2004).

## VI. RESULTADOS

### 6.1. Diversidad genética

Para un total de doscientas sesenta secuencias de ND4 mtDNA de *S. tiburo*, se encontraron dieciocho sitios polimórficos que resultaron en un total dieciocho haplotipos, la diversidad haplotípica y nucleotídica promedio, fue de 0.190 y 0.00026 respectivamente. La localidad que presentó un mayor número de haplotipos fue JX (ocho) y la de menor número fue FK (uno). La diversidad haplotípica se ubicó en un rango de 0.0-0.341 mientras que la nucleotídica se estimó entre 0.0-0.0005. Ambos estimadores fueron bajos en cada una de las localidades. La localidad de FK presentó la diversidad haplotípica y nucleotídica más baja, mientras que JX obtuvo los valores más altos para ambas diversidades. Los parámetros se muestran desglosados para cada localidad y como un promedio (Anexo 3A).

Al concatenarse las regiones ND4 (este estudio) y región control (Escatel-Luna *et al.*, 2015), se obtuvieron valores mucho más elevados comparados con el marcador ND4 por sí mismo, atribuyendo este efecto a la región control, pues cuenta con una elevada tasa de sustitución (Lunt *et al.*, 1998). El número de haplotipos se incrementó a noventa y cuatro, la diversidad haplotípica total fue de 0.899 y la nucleotídica de 0.00137. A la localidad de TAB le corresponden los mayores niveles de diversidad nucleotídica y haplotípica 0.979 y 0.00193 respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2. Diversidad genética del marcador ND4 y región control (concatenadas) del mtDNA en Florida (Golfo de México y costa Atlántica) y aguas del sureste mexicano.

Localidad	$n$	$Hd$	$\pi$	$H$	$S$
Costas del Golfo de México (Florida)					
CK	42	0.880	0.00120	16	19
CH	42	0.715	0.00058	11	10
OFF	14	0.978	0.00151	12	15
FK	5	0.900	0.00114	4	5
Costas del Atlántico de Florida					
CENT	13	0.628	0.00060	5	6
JX	48	0.768	0.00089	19	23
Sureste del Golfo de México					
CAM	54	0.928	0.00169	33	31
TAB	34	0.979	0.00193	26	28
TOTAL	252	0.899	0.00137	94	73

Donde ( $n$ ) representa el número de individuos, ( $Hd$ ) diversidad haplotípica, ( $\pi$ ) diversidad nucleotídica, ( $H$ ) número de haplotipos, ( $S$ ) número de sitios polimórficos o segregantes.

## 6.2. Enrarecimiento de muestras

El análisis de enrarecimiento de muestras con el marcador ND4 establece que la población con menor número de haplotipos seguiría siendo FK, considerando que el tamaño muestral de ésta población es de cinco individuos y que la población con el mayor número de haplotipos es JX (Anexo 4).

A diferencia de las muestras concatenadas la localidad de FK aparece como una de las poblaciones con mayor diversidad. En tanto que TAB presenta el mayor número de haplotipos y CH el menor (Figura 13).

### Análisis de enrarecimiento concatenado

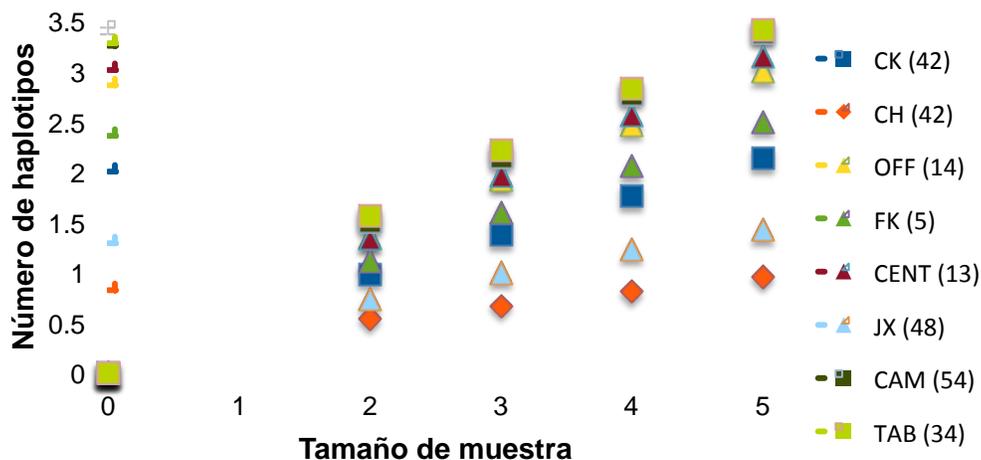


Figura 13. Gráfica de enrarecimiento de muestras con los marcadores ND4 y región control concatenados, considerando un tamaño máximo muestral de cinco individuos. En colores se indican cada una de las poblaciones y en paréntesis el número muestral real.

### 6.3. Estructura poblacional

Los índices de diferenciación genética  $\Phi_{ST}$  con el marcador ND4, entre pares de localidades, calculados por medio de la matriz de distancia (con el modelo evolutivo Tamura-3-parámetros), mostraron bajos niveles de diferenciación genética. Las localidades pareadas que presentaron estimaciones estadísticamente significativas asumiendo una  $P < 0.05$  fueron cuatro: CK-JX, CK-CAM, CK-TAB, JX-CAM. De ellas el valor de  $\Phi_{ST}$  mayor fue de 0.057 para CK-TAB y el menor 0.010 para JX-CAM. El valor  $P$  más significativo de 0.002 corresponde a CK-JX y el valor de significancia  $P$  más bajo fue de 0.028 para CK-TAB. Cabe mencionar que las poblaciones de CK-CH se encontraron cercanas a la diferenciación genética, con valores de  $\Phi_{ST}=0.081$ ,  $P=0.055$  (Anexo 5A).

Con los marcadores concatenados las  $\Phi_{ST}$  pareadas lograron ser estadísticamente significativas para la mayoría de las poblaciones. De manera general los valores de  $\Phi_{ST}$  aumentaron mientras que la significancia estadística  $P$  disminuyó, dando buen indicio de la clara diferenciación genética entre localidades (Tabla 3). En general se observaron diferencias significativas entre las localidades de ambas costas de Florida y de éstas últimas con Campeche y Tabasco. El patrón de diferenciación genético resulta similar al del marcador ND4, aunque con mayor significancia estadística de las regiones estructuradas. El dendrograma UPGMA de las secuencias concatenadas mostró agrupadas a las poblaciones de CK-CH, JX-

CENT, CAM-TAB-FK (teniendo en cuenta que ésta última localidad posee un tamaño muestral pequeño con un único haplotipo) y por último se encuentra a la localidad de OFF con organismos fuera de las costas de Florida en el Golfo de México (Figura 14).

Tabla 3. Estimaciones de diferenciación genética pareadas de las regiones ND4 y control concatenadas de *S. tiburo*.

Localidad	CK(42)	CH(42)	OFF(14)	FK(5)	CENT(15)	JX(48)	CAM(57)	TAB(37)
CK(42)	*	0.032	0.016	0.152	0.003	0.000	0.000	0.000
CH(42)	<b>0.025</b>	*	0.051	0.234	0.002	0.002	0.000	0.000
OFF(14)	<b>0.058</b>	0.047	*	0.601	0.032	0.016	0.034	0.101
FK(5)	0.050	0.039	-0.021	*	0.003	0.017	0.855	0.875
CENT(15)	<b>0.090</b>	<b>0.143</b>	<b>0.069</b>	<b>0.247</b>	*	0.772	0.000	0.000
JX(48)	<b>0.056</b>	<b>0.061</b>	<b>0.053</b>	<b>0.136</b>	-0.016	*	0.000	0.000
CAM(57)	<b>0.142</b>	<b>0.114</b>	<b>0.035</b>	-0.045	<b>0.210</b>	<b>0.190</b>	*	0.625
TAB(37)	<b>0.136</b>	<b>0.121</b>	0.024	-0.046	<b>0.197</b>	<b>0.187</b>	-0.004	*

Los índices de diferenciación genética se obtuvieron calculando una matriz de distancias con el modelo de Tamura-3 parámetros por medio del programa MEGA 6.06, posteriormente fueron corridas en Arlequin 3.1. Arriba de la diagonal se muestran los valores de significancia estadística  $P$  y por debajo de la diagonal los  $\Phi_{ST}$ . Para cada estimación de  $\Phi_{ST}$ , se resaltan con negritas los valores significativos con una  $P < 0.05$ . Entre paréntesis se señala el número de individuos presentes para cada población.

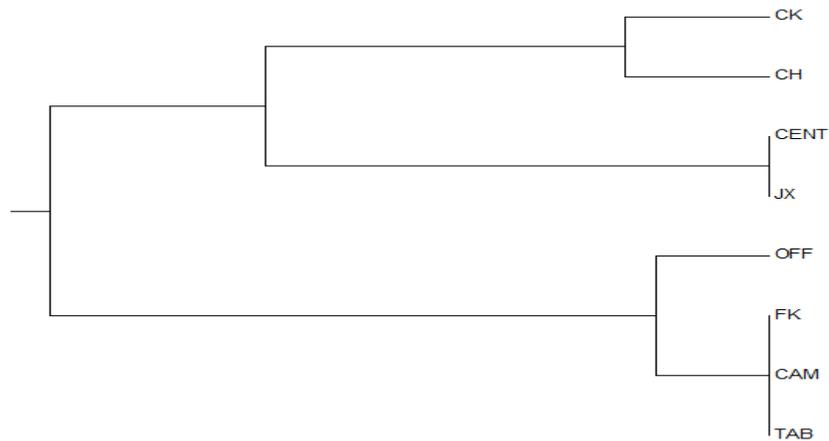


Figura 14. Dendrograma UPGMA el cual se construyó a partir de las estimaciones pareadas de  $\Phi_{ST}$  de las muestras concatenadas.

Posteriormente el análisis AMOVA con la región ND4 probó tres diferentes criterios, los cuales arrojaron valores de  $\Phi_{ST}$  estadísticamente significativos para todos los grupos evaluados. Es también con esta  $\Phi$  donde se obtienen los mayores porcentajes de variación de alrededor de 98% en cada uno de los grupos. En contraparte no se obtuvieron valores significativos para las  $\Phi_{CT}$  y  $\Phi_{SC}$  en ninguna estructura probada (Anexo 6).

Para la región concatenada (ND4 + región control) también se realizó el análisis AMOVA y se probó los mismos tres agrupamientos mencionados anteriormente con ND4, dando como resultado una significancia estadística contundente en dos de los agrupamientos. El primer agrupamiento significativo consiste en tres grupos de localidades, ambas costas de Florida (Golfo de México y Atlántico) y aguas nacionales del Golfo de México (Campeche y Tabasco). El segundo AMOVA (considerando la división latitudinal entre las ecorregiones de aguas tropicales con las coordenadas geográficas de 27° 12' 52" N, 82° 36' 41" O y templadas 28° 39' 48" N, 80° 25' 30" O aproximadamente) consistió en Florida Norte, Florida sur y México. Los valores de  $\Phi_{CT}$  para ambos agrupamientos fueron estadísticamente significativos (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) de *S. tiburo* con los marcadores ND4 y región control concatenados probando criterios geográficos, históricos y biológicos, con asterisco se señalan los valores estadísticamente significativos con una significancia de  $P < 0.05$ .

<b>Estructura probada</b>	<b>Fuente de variación</b>	<b>Componente de la varianza</b>	<b>Porcentaje de variación</b>	<b>Valor de <math>\Phi</math></b>	<b>Valor P</b>
<i>FLORIDA (E.U.) Y MÉXICO</i>	Entre grupos ( $\Phi_{CT}$ )	0.2304	13.41	0.134	0.036*
	Entre poblaciones dentro de grupos ( $\Phi_{SC}$ )	0.0430	2.50	0.029	0.000*
	Dentro de las poblaciones ( $\Phi_{ST}$ )	1.4449	84.09	0.159	0.000*
<i>FLORIDA OESTE, FLORIDA ESTE Y MÉXICO</i>	Entre grupos( $\Phi_{CT}$ )	0.1986	11.99	0.120	0.010*
	Entre poblaciones dentro de grupos( $\Phi_{SC}$ )	0.0129	0.78	0.009	0.000*
	Dentro de las poblaciones( $\Phi_{ST}$ )	1.4449	87.23	0.128	0.000*
<i>FLORIDA NORTE, FLORIDA SUR Y MÉXICO</i>	Entre grupos( $\Phi_{CT}$ )	0.1517	9.23	0.092	0.080
	Entre poblaciones dentro de grupos( $\Phi_{SC}$ )	0.0472	2.87	0.032	0.010*
	Dentro de las poblaciones( $\Phi_{ST}$ )	1.4449	87.90	0.121	0.000*

Para el análisis SAMOVA, se decidió agrupar a las poblaciones en tres, cuatro y cinco grupos, teniendo éste último una mayor significancia estadística. Los grupos que se definieron quedaron de la siguiente manera:

TRES: 1) CH, FK, CENT, CAM, TAB; 2) JX; 3) CK

CUATRO: 1) JX; 2) CK; 3) CAM; 4) CH, FK, CENT, TAB

CINCO: 1) CH, FK, CENT 2) JX; 3) TAB; 4) CAM; 5) CK

Los valores  $\Phi$  que fueron significativos corresponden a  $\Phi_{CT}$  y  $\Phi_{ST}$  (Tabla 5) para cada

uno de los grupos que se decidieron probar. El porcentaje de variación se encuentra mayormente en las  $\Phi_{ST}$  con un 98%. En términos generales a mayor cantidad de grupos definidos en SAMOVA, se incrementa también la significancia no solo de  $\Phi_{ST}$  incluso de  $\Phi_{CT}$ .

Tabla 5. Valores del Análisis SAMOVA, con asterisco se señalan los valores estadísticamente significativos con una  $P < 0.05$ .

Cantidad de grupos probados	Fuente de variación	Componente de la varianza	Porcentaje de variación	Valor de $\Phi$	Valor P
<i>TRES</i>	Entre grupos ( $\Phi_{CT}$ )	0.0057	5.29	0.053	0.041*
	Entre poblaciones dentro de grupos ( $\Phi_{SC}$ )	-0.0019	-1.82	-0.019	0.746
	Dentro de las poblaciones ( $\Phi_{ST}$ )	0.1039	96.52	0.035	0.041*
<i>CUATRO</i>	Entre grupos ( $\Phi_{CT}$ )	0.0053	5.03	0.050	0.031*
	Entre poblaciones dentro de grupos ( $\Phi_{SC}$ )	-0.0029	-2.76	-0.029	0.432
	Dentro de las poblaciones ( $\Phi_{ST}$ )	0.1039	97.74	0.023	0.039*
<i>CINCO</i>	Entre grupos ( $\Phi_{CT}$ )	0.0070	6.65	0.066	0.024*
	Entre poblaciones dentro de grupos ( $\Phi_{SC}$ )	-0.0051	-4.78	-0.051	0.559
	Dentro de las poblaciones ( $\Phi_{ST}$ )	0.1039	98.13	0.019	0.036*

De acuerdo al trazo de barreras hechas por el programa Barrier 2.2, la principal barrera geográfica está dada por CK, la cual se encuentra en la parte Norte de Florida en el Golfo de México (barrera a), con respecto de las demás poblaciones de *S. tiburo*. La segunda barrera detectada fue la separación de las localidades del Golfo de México (CH, FK) y Atlántico en Florida (JX, CENT) barrera b. La tercer y última barrera divide a las poblaciones mexicanas *versus* las de Florida (barrera c) como se muestra en la Figura 15.

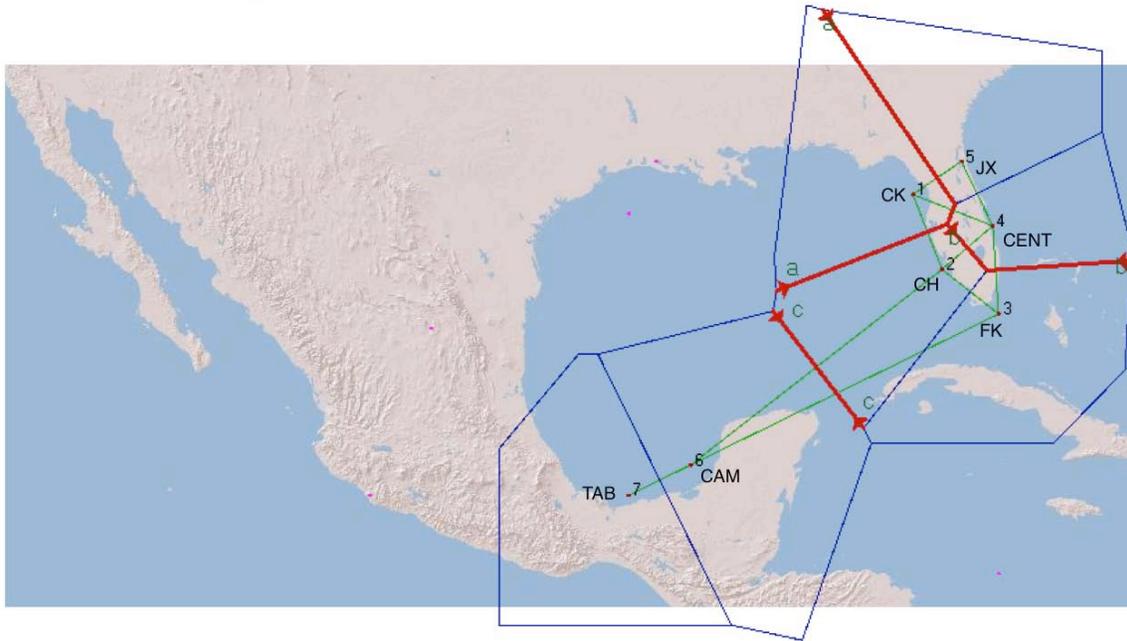


Figura 15. Barreras geográficas detectadas entre poblaciones de *S. tiburo* en Florida y México. Las líneas en rojo muestran las barreras geográficas, ordenadas alfabéticamente respecto a su importancia.

Considerando el mapa en el que se aprecia las tres barreras obtenidas para éste estudio y superponiendo las gráficas de pay, en las que se muestra la cantidad de haplotipos presentes por localidad sin contemplar la abundancia (Figura 16), se observa claramente que las poblaciones con la mayor presencia de haplotipos son JX y CAM, por otro lado las localidades de CAM y TAB comparten el haplotipo 12 y JX, CENT y OFF presentan cada una el haplotipo 2.

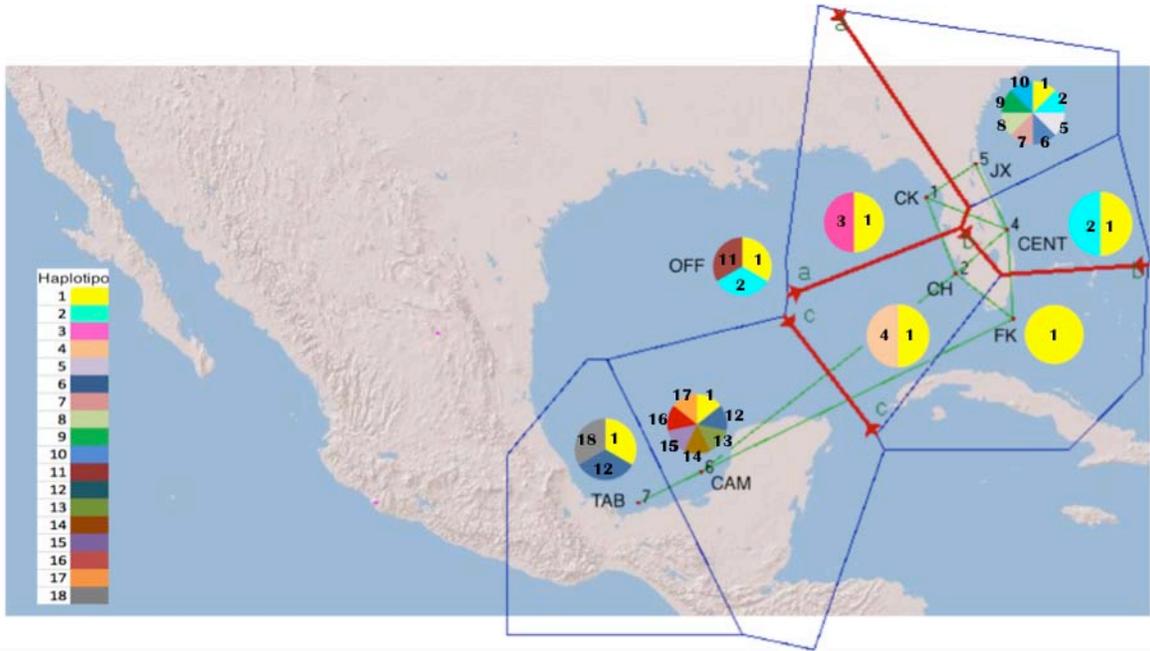


Figura 16. Mapa que muestra las tres barreras genéticas identificadas por el programa Barrier y el número del haplotipo presente para cada localidad en gráficas de pay. En la barra se muestran los colores asignados a cada haplotipo.

Asimismo, considerando la frecuencia de los haplotipos presentes por localidad, se percibe que en las poblaciones de CAM y JX no se hallan distribuidos los haplotipos de manera abundante, por el contrario se presentan en unos cuantos organismos, esto se debe a que ambas poblaciones son las que cuentan con el mayor número de haplotipos únicos (Figura 17).

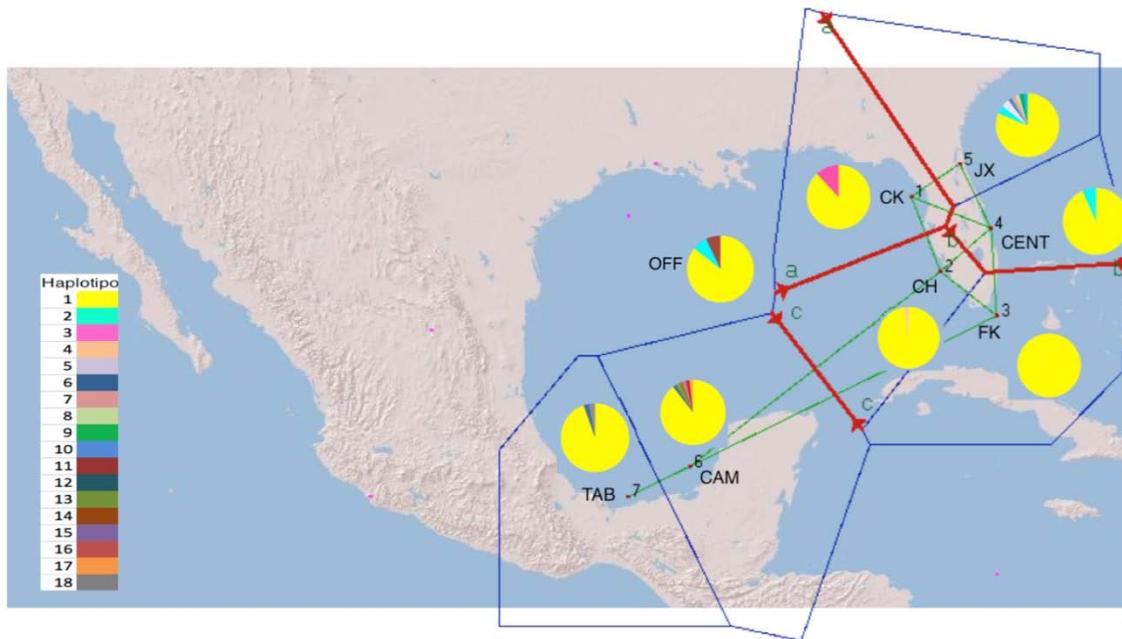


Figura 17. Mapa que muestra las tres barreras genéticas obtenidas por Barrier y la frecuencia de los haplotipos presentes para cada localidad con gráficas de pay. En la barra se muestran los colores asignados a cada haplotipo.

#### 6.4. Demografía histórica

El análisis de distribución de diferencias pareadas reveló que los valores muestran una tendencia hacia una distribución de tipo unimodal, la cual establece que las poblaciones de *S. tiburo* han pasado por procesos de expansión demográfica y/o espacial reciente y por lo tanto poseen niveles de crecimiento/migración elevados. Para respaldar dicho análisis, se calcularon las desviaciones de la suma de cuadrados, respecto de lo esperado bajo el modelo de expansión (*SSD*) Ver Tabla 6, las cuales apoyaron que las poblaciones experimentaron expansiones demográficas/espaciales recientes, al presentar valores bajos y no significativos (Figura 18).

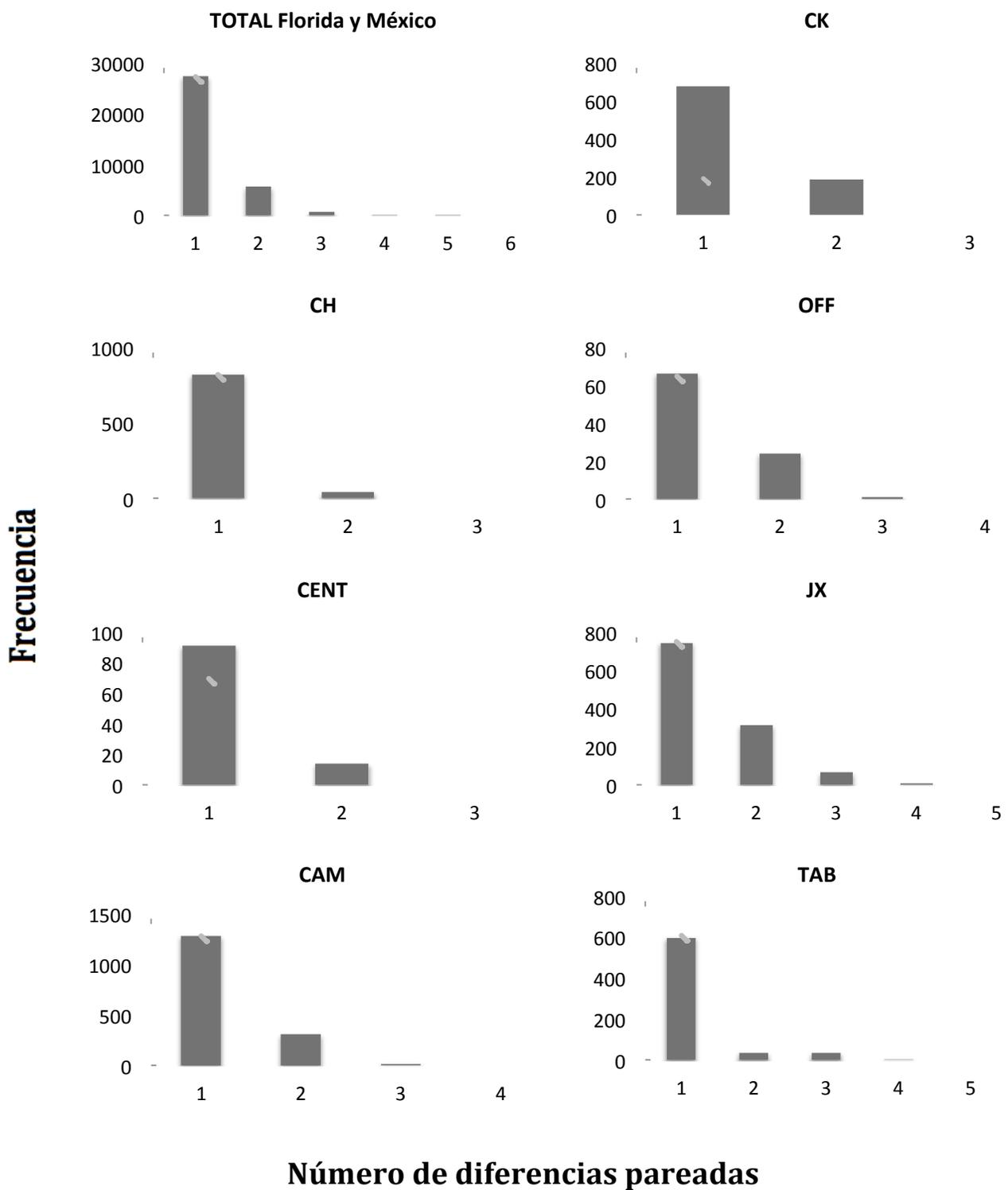


Figura 18. Gráficas de la distribución *mismatches* de *S. tiburo*, por localidad. Las barras representan los valores observados y las líneas los valores esperados por el modelo de expansión.

Considerando las pruebas de neutralidad, el índice  $F_s$  de  $F_u$  obtuvo valores negativos y estadísticamente significativos en todas las poblaciones (con valores totales de  $F_s$  muy elevados) excepto para CK y CENT. Excluyendo solo a estas poblaciones, las estimaciones muestran que se han presentado expansiones para casi todas las localidades, lo cual es apoyado por la distribución de diferencias pareadas (Tabla 6).

Para la  $D$  de Tajima todas las localidades presentaron valores negativos y estadísticamente significativos con excepción de las poblaciones de CENT, CK y OFF, sugiriendo nuevamente una expansión poblacional (Tabla 6). Finalmente se destaca que en ninguna de las dos pruebas la localidad de CK resultó ser significativa al igual que CENT.

Tabla 6. Pruebas de neutralidad y estadísticos asociados al modelo de expansión demográfica.

Localidad	$D$	$P$	$F_s$	$P$	$SSD$	$P$
CK	-0.106	0.316	0.362	0.341	0.314	0.128
CH	<b>-1.12</b>	<b>0.044</b>	<b>-1.491</b>	<b>0.033</b>	0	0.182
OFF	-1.481	0.07	<b>-1.475</b>	<b>0.007</b>	0.006	0.494
CENT	-1.159	0.151	-0.649	0.102	0.038	0.096
JX	<b>-1.971</b>	<b>0.003</b>	<b>-7.416</b>	<b>0</b>	0.003	0.576
CAM	<b>-2.079</b>	<b>0</b>	<b>-8.639</b>	<b>0</b>	0.001	0.423
TAB	<b>-1.722</b>	<b>0.012</b>	<b>-1.893</b>	<b>0.013</b>	0.175	0.710
Total	<b>-2.376</b>	<b>0</b>	<b>-3.4x10<sup>37</sup></b>	<b>0</b>	0.00025	0.463

Donde  $D$  es la prueba de Tajima,  $F_s$  la prueba de  $F_u$ .  $SSD$  corresponde a las desviaciones en la suma de cuadrados de la distribución de diferencias pareadas observada con respecto a la esperada de acuerdo al modelo de expansión demográfica, con su respectivo valor de significancia  $P$ ; en negritas se resaltan los valores estadísticamente significativos con  $P < 0.05$ .

Por su parte en el modelo de expansión demográfica, se obtuvieron estimaciones del tiempo de la expansión, considerando un rango de valores debido a la carencia de una tasa de mutación específica para la región ND4 de *S. tiburo*, por ello se consideró la tasa mutacional del Cyt B de *S. tiburo* estimado en 2.3% por millón de años (Martin *et al.*, 1992) y de 1.21% para la región control (Nance *et al.*, 2011) en *S. lewini* y un tiempo de madurez sexual promedio de 2.5 años (Compagno, 1984; Parsons, 1993a; Carlson y Parsons, 1997). Las estimaciones del tiempo de expansión demográfica se ubicaron en 151,364-79,630 años que concuerdan en mayor medida con el último período interglaciar Illinoiois-Wisconsin (Muhs *et al.*, 2002); en tanto que la población que presentó los valores más bajos fue CK y CENT mostró valores intermedios; las localidades restantes mostraron los mayores tiempos de expansión al igual que las estimaciones del tamaño efectivo poblacional (Tabla 7).

Los tamaños efectivos poblacionales totales de las hembras antes de la expansión ( $\theta_0$ ) variaron de 0-0.24 al fin de la expansión ( $\theta_1$ ), los mayores valores de éstos parámetros se presentaron en CK y CENT. Es preciso mencionar que la localidad de JX que presentó una  $\theta_0=0$  obtuvo uno de los valores más altos de  $\theta_1= 0.530$ .

Los tamaños efectivos poblacionales también concuerdan con lo mencionado con anterioridad pues el  $N_0$  total (antes de la expansión) fue de 0 y el  $N_1$  total (después de la expansión) tuvo el valor de 2,548-4,844 tiburones.

Tabla 7. Parámetros de demografía histórica por localidad para *S. tiburo* bajo el modelo de expansión demográfica.

Localidad	$\tau$	$T$	$\theta_0$	$\theta_1$	$N_0$	$N_1$
CK	2.930	77772-147832	0.900	3.600	9556-18164	38223-72655
CH	3	79630-151364	0	0.051	0	541-1029
OFF	3	79630-151364	0	0.399	0	4236-8053
CENT	2.982	79153-150456	0.112	0.450	1189-2260	4778-9082
JX	3	79630-151364	0	0.530	0	55627-10696
CAM	3	79630-151364	0	0.264	0	2803-5328
TAB	3	79630-151364	0	0.098	0	1041-1978
Total	3	79630-151364	0	0.24	0	2548-4844

Donde  $\tau=$  es el tiempo de expansión en generaciones en pasar de un tamaño efectivo poblacional  $N_0$  a un  $N_1$  y  $T=$  tiempo en años respecto a las generaciones transcurridas desde la expansión demográfica y los tamaños efectivos poblaciones de las hembras antes ( $\theta_0$ ) y después ( $\theta_1$ ) de la expansión. Para  $t$ ,  $N_0$  y  $N_1$  se muestran valores con rango considerando primero la tasa de mutación de *S. tiburo* para el Cyt B y el segundo corresponde a la tasa de mutación de *S. lewini* para la región control.

El análisis de expansión espacial muestra que, en el momento de la expansión poblacional, un fragmento  $m$  de migrantes se distribuye entre demes vecinos. En este sentido el análisis detectó una  $m$  total de 0.004-0.0005, donde la tasa más considerable de migrantes fue para OFF con alrededor de 26,162-3,840 y la menor para CK con 9,418-1,382. Las localidades que no alcanzaron tener un migrante por generación fueron CENT, CH y TAB, por lo tanto fueron las poblaciones con un menor flujo génico. El deme con el mayor tamaño efectivo lo obtuvo CAM (1125-7668), seguido de CENT (11121-31974) y el menor correspondió a tres poblaciones OFF, JX y TAB (8-52). El tiempo promedio desde la expansión espacial fue de 4,140-11,904 años (Tabla 8).

Tabla 8. Parámetros de demografía histórica por localidad para *S. tiburo* bajo el modelo de expansión espacial.

Localidad	$\tau$	$T$	$\theta_N$	$N_f$	$M$	$m$
CK	0.255	6768-19479	0.002	21-145	99999	9418-1382
CH	0.155	4114-11828	0.012	127-868	0.391	0.006-0.0009
OFF	0.333	8838-25412	0.0007	8-52	99999	26162-3840
CENT	0.163	4326-12438	0.051	541-3689	2.452	0.009-0.001
JX	0.419	11121-31974	0.0007	8-52	2377.074	621-91
CAM	0.131	3477-9996	0.106	1125-7668	99999	178-26
TAB	1.265	35577-96535	0.0007	8-52	0.179	0.047-0.007
Total	0.156	4140-11904	0.140	1486-10127	2.69	0.004-0.0005

Basado en las distribuciones de diferencias pareadas (*mismatch*)  $T$  representa el tiempo en años desde la expansión espacial,  $N_f$  que representa el tamaño efectivo de las subpoblaciones (demes), las cuales intercambian un fragmento  $m$  de migrantes entre demes vecinos. Para los cálculos se requirió la edad de madurez sexual de *S. tiburo* la cual se estableció en 2.5 años.

Finalmente, los perfiles demográficos bayesianos con el marcador ND4 mostraron una tendencia constante, sin señal de fluctuaciones en el tamaño efectivo poblacional (Anexo 7).

Del mismo modo los perfiles demográficos bayesianos de la región concatenada (ND4 y región control), que se dividieron por localidades, se realizaron considerando la tasa de mutación de 1.21% por millón de años en *S. lewini* de la región control (Nance *et al.*, 2011), mismos que muestran la ausencia de fluctuaciones en su tamaño efectivo poblacional (Figura 19, 20 y 21), al igual que al considerar únicamente la región ND4 (Anexo 7). Las localidades que lograron el mayor tiempo de coalescencia fueron CAM-TAB con 60 mil años (Figura 21).

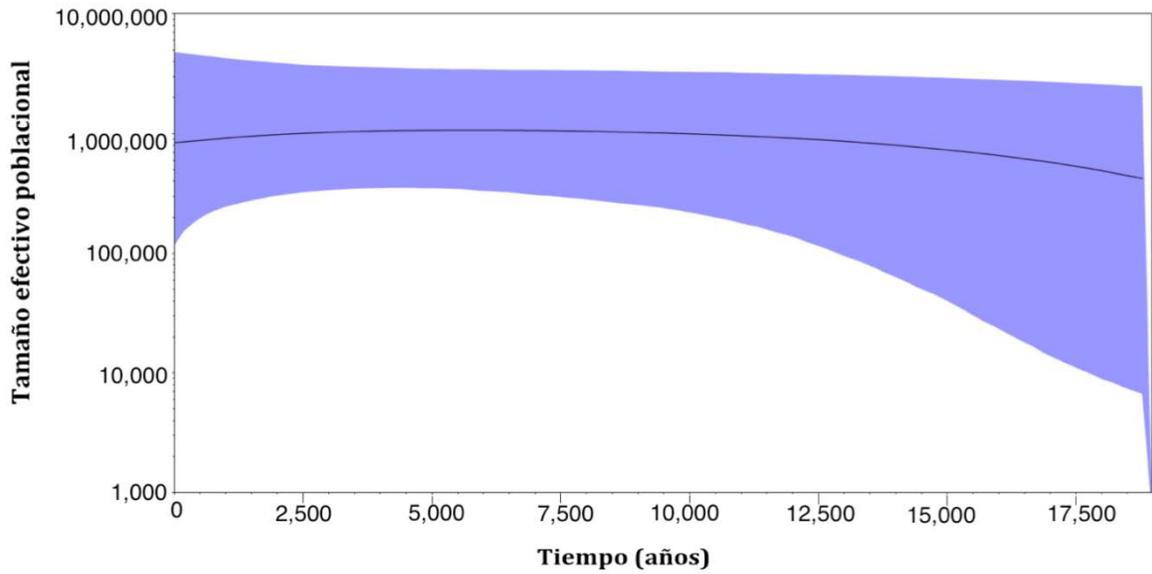


Figura 19. Perfil Demográfico Bayesiano de las poblaciones CK-CH con muestras concatenadas. La línea negra continua representa la estimación y el área en morado los intervalos de confianza del 95%.

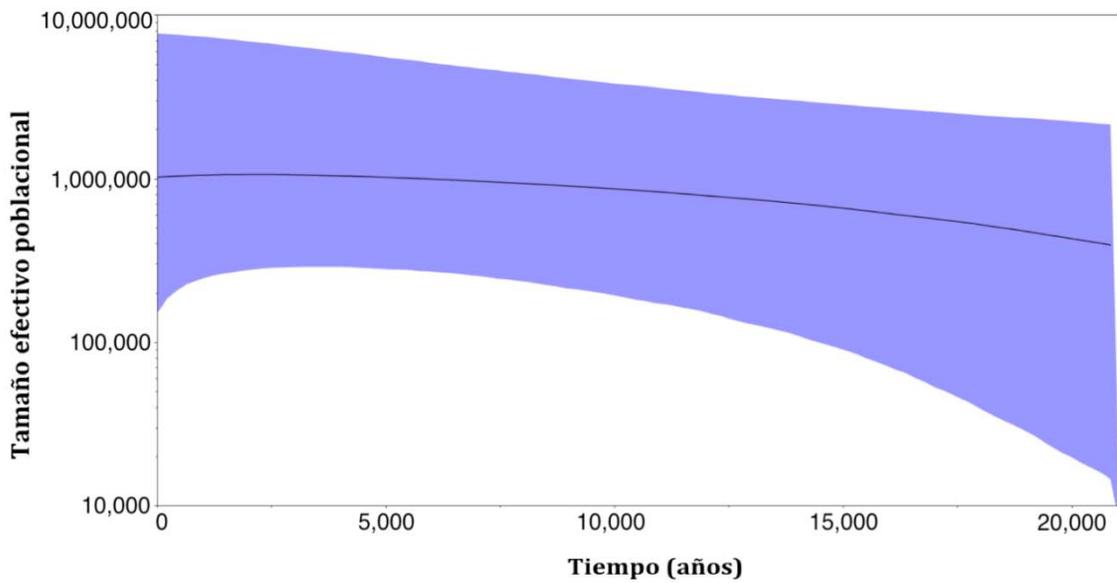


Figura 20. Perfil Demográfico Bayesiano de las poblaciones CENT-JX con muestras concatenadas. La línea negra continua representa la estimación y el área en morado los intervalos de confianza del 95%.

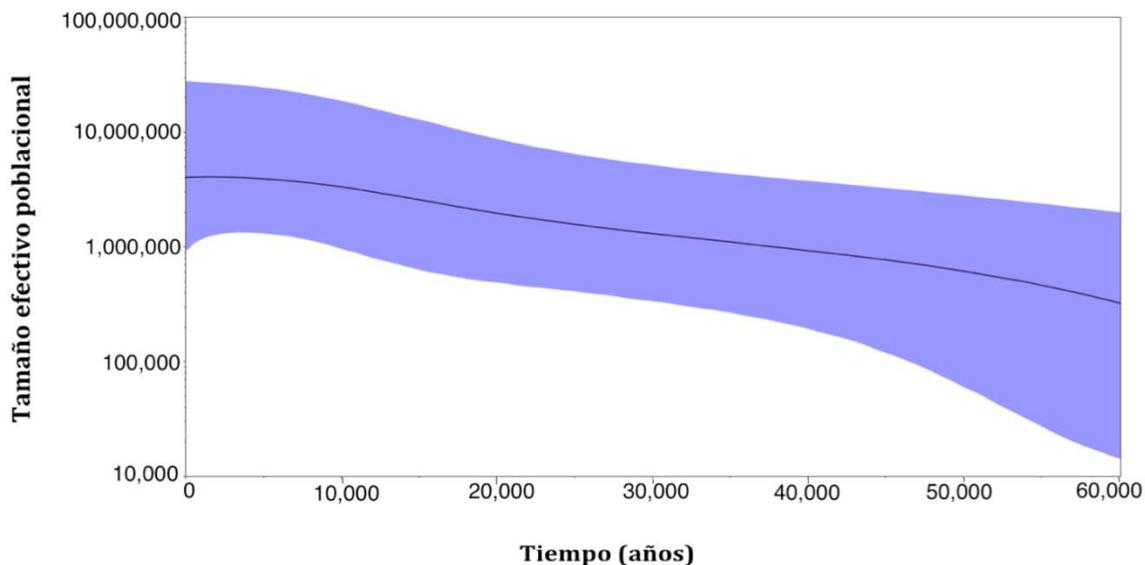


Figura 21. Perfil Demográfico Bayesiano de las poblaciones CAM-TAB con muestras concatenadas. La línea negra continua representa la estimación y el área en morado los intervalos de confianza del 95%.

### 6.5. Reconstrucción de la filogenia y red de haplotipos

La reconstrucción del dendograma de haplotipos por medio del método de Neighbor-joining con el marcador ND4 se realizó con los trece haplotipos únicos, de los cuales cinco se encontraron exclusivamente en CAM y cinco también en JX, entre tanto en CH, TAB y OFF se halló uno para cada una de las localidades. Por lo tanto la localidad que carece de haplotipos únicos es CK, pues cinco de sus individuos comparten el haplotipo 3. Finalmente las localidades de FK y CENT poseen solo individuos que comparten el haplotipo 1, pues es el más abundante en las secuencias mitocondriales, por ello no se representan como localidades en el dendograma (Figura 22).

En cuanto a la topología del dendograma, el patrón filogeográfico no presenta un arreglo de los haplotipos relacionado con las posibles barreras al flujo genético entre poblaciones o la separación geográfica de las mismas, siendo un árbol con orígenes mezclados o flujo génico actual a excepción del agrupamiento del haplotipo 6 y 10 que pertenecen a JX. El dendograma incluyó una secuencia de *Sphyrna lewini* como grupo externo.

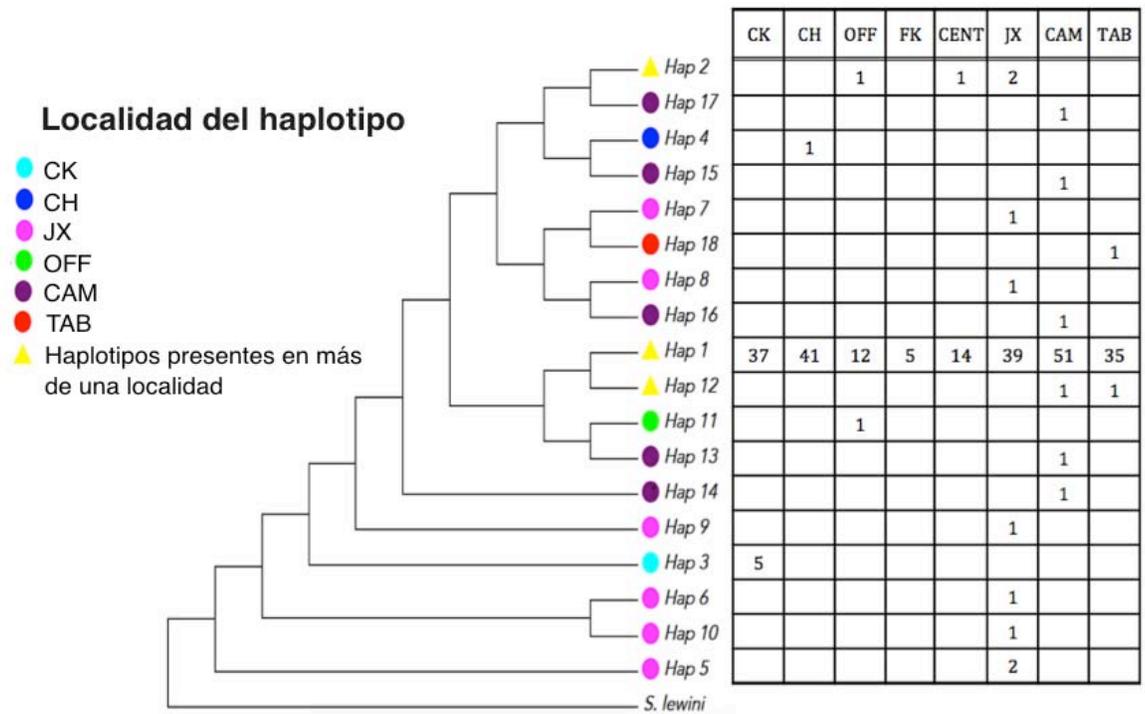


Figura 22. Dendrograma de haplotipos de *S. tiburo*. En los círculos de colores se representan las localidades que poseen haplotipos únicos o compartidos en la misma población y con triángulos se señalan los haplotipos compartidos en más de una población. En la tabla se presentan por localidad el número de individuos que poseen determinado haplotipo. El grupo externo utilizado fue *S. lewini*.

El árbol de inferencia Bayesiana concuerda con el dendrograma el cual agrupa a los haplotipos 6 y 10, presentes en la localidad de JX, con un soporte estadístico de 72%. El árbol también resultó tener orígenes mezclados sin un patrón de agrupamiento claro, lo cual sugiere un intercambio genético entre poblaciones. El grupo externo usado fue también la especie *S. lewini* (Figura 23).

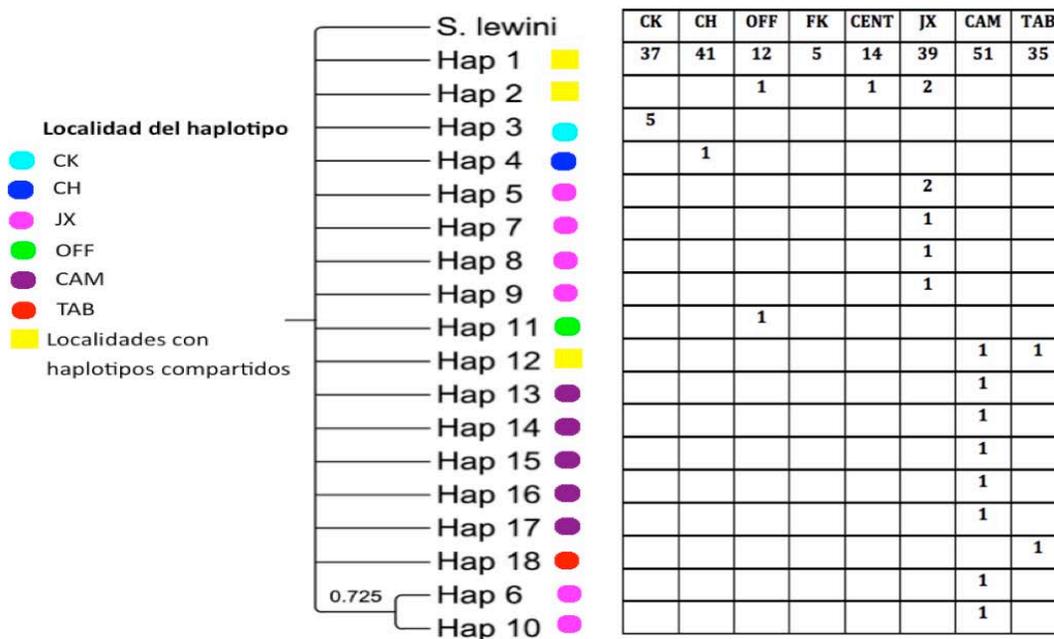


Figura 23. Árbol de inferencia Bayesiana del tiburón cabeza de pala. En los círculos de colores se observan las localidades que poseen haplotipos únicos o compartidos en la misma población y con cuadrados se señalan las localidades con haplotipos compartidos. En la tabla se presentan por localidad el número de individuos que poseen determinado haplotipo y el grupo externo que fue utilizado *S. lewini*.

La red de haplotipos mostró el haplotipo 1 se encuentra en todas las poblaciones y aunado a su abundancia y número de conexiones permite reconocerlo como el haplotipo ancestral. Por otro lado, a excepción del haplotipo 18 correspondiente a TAB y el 10 de la localidad de JX, los cuales contienen dos pasos mutacionales, los demás haplotipos poseen solo una mutación que los distingue del ancestral y se encuentran dispuestos en un arreglo en forma de estrella, característico de poblaciones en expansión. Como se mencionó anteriormente las localidades que tiene el mayor número de haplotipos únicos son CAM y JX (Figura 24).

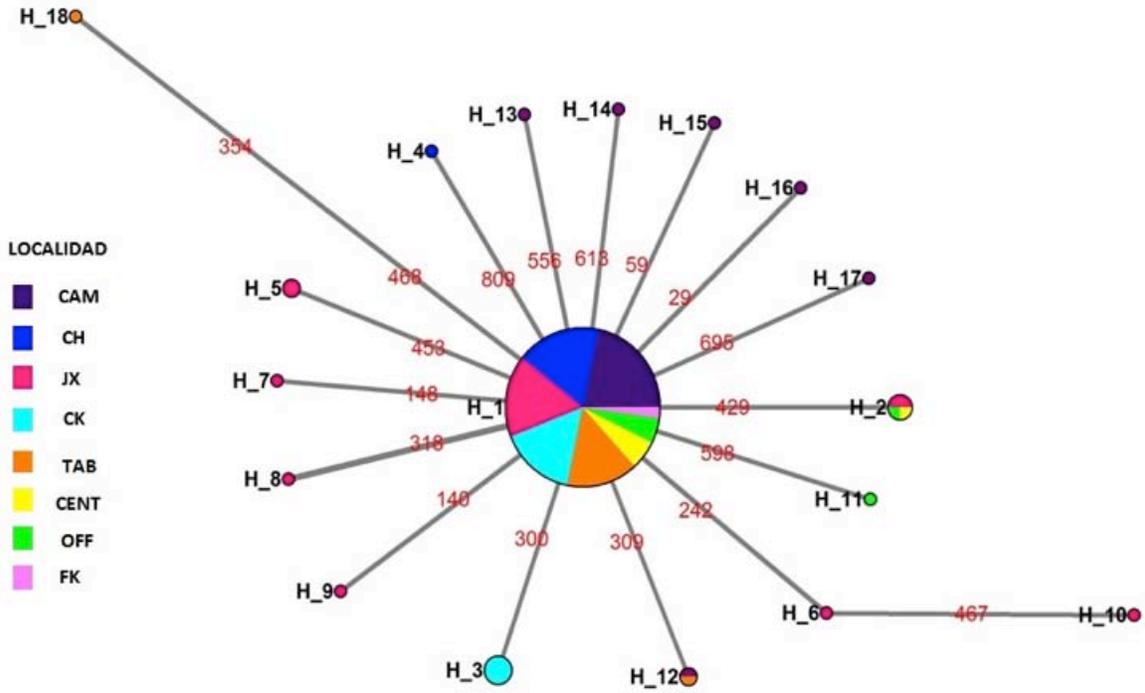


Figura 24. Red de los 18 haplotipos de *S. tiburo* para la región ND4. En el cual los haplotipos ancestrales se encuentran el círculo central y los haplotipos derivados son las ramas que salen de él, el tamaño de los círculos es proporcional al número de haplotipos con que cuenta cada localidad y éstas se distinguen por medio de colores específicos para cada una de ellas. Los números señalan el sitio de la secuencia en que ocurrió la mutación.

## VII. DISCUSIÓN

### 7.1. Zonas de variación y estructura genética

En cuanto a los índices de diversidad haplotípica y nucleotídica totales del ND4 los valores fueron de  $Hd=0.190$  y  $\pi=0.00026$  (Anexo 3A), los cuales también son bajos en comparación a otros tiburones como *Mustelus antarcticus*, *M. lenticulatus* incluso *Sphyrna lewini*, para la misma región mitocondrial (Tabla 9A), por mencionar algunos. Valores sumamente distintos a los que se encontraron en la región control pues las diversidades totales van de  $Hd=0.932$  y  $\pi=0.0032$  (Anexo 3B), y en relación con otros tiburones como *Sphyrna lewini*, *Carcharodon carcharias* y *Rhinconodon typus*, las diversidades tanto haplotípica como nucleotídica no se desvían en gran medida (Tabla 9B), a diferencia de lo que ocurrió con el marcador ND4.

Las diferencias en los parámetros de diversidad se deben a que la evolución de las secuencias opera a distintos niveles en el genoma, en los linajes y en el tiempo; influido por el tamaño de los organismos, el tiempo generacional y la tasa metabólica (Martin, 1999). Aunado a que los tiburones pueden presentar complejos sistemas de apareamiento genético con un elevado grado de variabilidad interespecífica, lo cual puede implicar que algunas especies sean en mayor grado susceptibles a la pérdida de variación genética por presiones pesqueras (Chapman *et al.*, 2004).

Otros factores que afectan los parámetros de diversidad son la tasa de mutación de los marcadores, el ambiente en el que viven los organismos y las presiones selectivas a los que están sujetos. Específicamente los Sphyrnidae son un grupo de tiburones muy reciente pues surgieron hace aproximadamente 20 millones de años (Lim *et al.*, 2010), lo cual hace que la variación en comparación con otros tiburones más antiguos sea más baja.

Tabla 9. Valores de diversidad genética en diferentes especies de tiburones, para dos marcadores mitocondriales: A) ND4 y B) región control, en negritas se resalta los parámetros de *S. tiburo*.

**A)**

Especie	Nombre común	Zona Geográfica	<i>n</i>	<i>H</i>	<i>Hd</i>	$\pi$	Autor
<b><i>Sphyrna tiburo</i></b>	<b>Tiburón cabeza de pala</b>	<b>Golfo de México y Florida</b>	<b>260</b>	<b>18</b>	<b>0.190</b>	<b>0.0003</b>	<b>Este estudio.</b>
<i>Mustelus antarcticus</i>	Musola suave	Indo-Pacífico y Australasia	141	14	0.456	0.0008	Boomer <i>et al.</i> , (2012).
<i>Mustelus lenticulatus</i>	Musola tigre	Indo-Pacífico y Australasia	135	10	0.531	0.0009	Boomer <i>et al.</i> , (2012).
<i>Stegostoma fasciatum</i>	Tiburón cebrá	Indo-Pacífico Occidental	75	8	0.720	0.1400	Dudgeon <i>et al.</i> , (2009).
<i>Rhizoprionodon acutus</i>	Tiburón lechoso	Indo-Pacífico y Australasia	207	-	0.823	0.0034	Ovenden <i>et al.</i> , (2011).
<i>Sphyrna lewini</i>	Tiburón martillo común	Indo-Pacífico y Australasia	234	-	0.339	0.0018	Ovenden <i>et al.</i> , (2011).

Donde el número de individuos es *n*, el número de haplotipos *H*, diversidad haplotípica *Hd* y diversidad nucleotídica  $\pi$ .

**B)**

Especie	Nombre común	Zona Geográfica	<i>n</i>	<i>H</i>	<i>Hd</i>	$\pi$	Autor
<b><i>Sphyrna tiburo</i></b>	<b>Tiburón cabeza de pala</b>	<b>Golfo de México y Florida</b>	<b>251</b>	<b>98</b>	<b>0.932</b>	<b>0.0032</b>	<b>Escatel-Luna <i>et al.</i>, (2015).</b>
<i>Sphyrna lewini</i>	Tiburón martillo común	Global	271	24	0.800	0.0130	Duncan <i>et al.</i> , (2006).
<i>Carcharodon carcharias</i>	Tiburón blanco	Pacífico	59	20	0.790	0.0010	Jorgensen <i>et al.</i> , (2009).
<i>Carcharhinus limbatus</i>	Tiburón de puntas negras	Global	364	37	0.840	0.0040	Keeney y Heist (2006).
<i>Rhinconodon typus</i>	Tiburón ballena	Global	70	44	0.900-1	0.0070	Castro <i>et al.</i> , (2007).

Donde el número de individuos es *n*, el número de haplotipos *H*, diversidad haplotípica *Hd* y diversidad nucleotídica  $\pi$ .

Por otro lado al concatenar las regiones ND4 y región mitocondrial del tiburón cabeza de pala con doscientas cincuenta y dos muestras en total (Tabla 2), el número de haplotipos para todas las localidades fue de noventa y cuatro con un total de setenta y tres sitios segregantes, por lo cual estos valores se asemejan de manera considerable a la región control Ver Anexo 3B (Escatel-Luna *et al.*, 2015).

Los parámetros de diversidad tuvieron valores totales de  $Hd=0.899$  y  $\pi=0.00137$ , lo cual resulta coherente al ser marcadores moleculares con distintas tasas de mutación y al incrementarse la longitud de las secuencias. De éstos, Tabasco fue la localidad que presentó los valores más altos con  $Hd=0.979$  y  $\pi=0.00193$ , en tanto que los más bajos fueron para Charlotte Harbor, con  $Hd=0.715$  y  $\pi=0.00058$  y Florida Central  $Hd=0.628$  y  $\pi=0.00060$ . Finalmente, los valores de Florida Keys a pesar de tener un menor tamaño de muestra ( $n=5$ ) fueron de  $Hd=0.900$  y  $\pi=0.00114$ .

Posteriormente el análisis de enrarecimiento de muestras, que evalúa el número de haplotipos que se esperarían considerando el menor tamaño poblacional (el cual corresponde a Florida Keys  $n=5$ ) sólo tomando en cuenta el marcador ND4, confirma que efectivamente es ésta población la que presenta la menor diversidad, lo cual concuerda con los datos de diversidad haplotípica y nucleotídica. Por otro lado, Jacksonville tiene el mayor número de haplotipos teóricos, lo que no ocurrió al analizar las secuencias concatenadas, pues Jacksonville se encuentra catalogado en los valores más bajos, mientras que Tabasco y Campeche obtuvieron el mayor número de haplotipos, que también coincide con los parámetros de diversidad estimados para los marcadores concatenados. Especialmente fue en este análisis donde la localidad de Florida Keys se encuentra entre las tres primeras localidades con el mayor número de haplotipos teóricos, caso contrario a lo que ocurrió con el marcador ND4.

Por otro lado, las estimaciones de diferenciación genética pareadas  $\Phi_{ST}$  con el marcador ND4 (Anexo 5A), permitieron determinar que las poblaciones más divergentes fueron Cedar Key y Jacksonville, que se encuentran al Norte de Florida en el Golfo de México y en el Atlántico respectivamente.

En relación a esto la masa continental de la península de Florida representa claramente una barrera geográfica importante al flujo génico entre poblaciones del Golfo de México y Atlántico, patrón que también se observa al analizar la región control (Escatel-Luna *et al.*, 2015; Anexo 5B) y los marcadores concatenados (ND4 y región control; Tabla 3), pues se percibe una estructura genética en las poblaciones de *S. tiburo* en las zonas anteriormente

mencionadas. En este sentido un estudio de marcaje a lo largo de la península de Florida concluye que no hay ninguna evidencia de desplazamiento de tiburones cabeza de pala del Golfo de México hacia el Atlántico ni viceversa (Tyminski *et al.*, 2013).

Adicionalmente se presentó estructura genética de las poblaciones mexicanas y las de Florida tanto del marcador ND4, región control y éstos concatenados, pues la distancia geográfica que separa a las poblaciones mexicanas de las de Florida y la relativa movilidad limitada de la especie (Kohler *et al.*, 2013; Tyminski *et al.*, 2013), parecen desempeñar un papel preponderante en la divergencia genética observada. Por lo tanto, se deduce la diferencia genética de tres grandes zonas: 1) Florida Golfo de México “oeste” 2) Florida Atlántico “este” y por último 3) sureste mexicano.

Asimismo, al incluir el trazo de barreras mediante datos genéticos y geográficos con el programa Barrier, se reiteran nuevamente las divisiones de las poblaciones en los tres grandes grupos (Florida oeste, este y México). Particularmente una de las tres barreras trazadas por Barrier y la segunda de mayor importancia divide a las poblaciones de Florida oeste y este, en donde como se dijo con anterioridad, no se han percibido migraciones de organismos del Atlántico al Golfo de México de Florida ni a la inversa. Un factor que se ha propuesto impide el flujo génico de *S. tiburo* en estas regiones es la corriente de Florida y el estrechamiento de la plataforma continental, al sureste de Florida, donde también se ha planteado afecta a *Carcharhinus acronotus* (Kohler *et al.*, 2013; Tyminski *et al.*, 2013; Portnoy *et al.*, 2014; Portnoy *et al.*, 2015).

De forma similar la tercera barrera en importancia determinada en Barrier divide a las poblaciones de Florida (E.U) y México, pues al ser *S. tiburo* un tiburón de vagilidad limitada y tomando en cuenta la distancia que tendría que recorrer el tiburón para establecer flujo génico, resulta lógico que se pudiera encontrar diferenciación genética en este grupo.

No obstante, las poblaciones que componen cada una de las tres grandes regiones son genéticamente homogéneas entre sí, debido a la variación de las condiciones ambientales en los estuarios donde habita *S. tiburo*, en los cuales la disponibilidad estacional de recursos lleva a los individuos a desplazarse a sistemas adyacentes como posible estrategia de supervivencia, (Heupel y Simpfendorfer, 2002) promoviendo la conectividad entre poblaciones y evitando que éstas se diferencien. Dichas migraciones ocurren generalmente entre localidades cercanas o estuarios adyacentes, con lo cual no se puede dar un gran flujo migratorio entre las tres grandes regiones antes mencionadas (Escatel-Luna *et al.*, 2015).

Particularmente para las localidades de Cedar Key y Charlotte Harbor con las

secuencias concatenadas, el índice de diferenciación genético  $\Phi_{ST}$  obtuvo valores significativos  $\Phi_{ST}= 0.025$ ,  $P= 0.032$ , en este sentido en la zona del Golfo de México de la península de Florida se tiene indicios de una diferenciación genética en otra escala geográfica. Éste resultado se explica porque al incrementar el número de sitios polimórficos la señal de divergencia también lo hace, esto podría ser porque la tasa de mutación de la región control es más elevada, en comparación con el marcador ND4.

Más aún el programa Barrier considera que la barrera de mayor importancia es la división de CK del resto de las localidades. Por ello es preciso resaltar que las poblaciones de Florida se encuentran en una transición de masas de agua templada (norte de Florida) y tropical (sur de Florida) como se observa en la Figura 5 y 6.

Lo anterior coincide con otros estudios a lo largo del Golfo de México de Florida, donde han encontrado evidencia de variaciones clinales que afectan la talla, edad de la madurez sexual, tasa de crecimiento, peso y tamaño de los embriones, para ambos sexos, los cuales han mostrado que a mayor latitud geográfica aumentan los valores de las características mencionadas (Mayr, 1942; Parsons 1993a; Parsons 1993b; Lombardi-Carlson *et al.*, 2003). Al contrario lo que se observa en las poblaciones del Atlántico norte es una mayor movilidad que las homólogas del Golfo de México en Florida (Driggers *et al.*, 2014), en suma, las localidades del Golfo de México tienen una estructura más puntual.

En este caso también se ha considerado que estas diferencias pueden deberse a respuestas adaptativas de los tiburones frente a diferentes factores ambientales y posiblemente verse controladas por factores genéticos o fisiológicos (Escatel-Luna *et al.*, 2015). En este sentido es preciso resaltar que *S. tiburo* tiene una alta residencia (donde los individuos habitan por un período de tiempo muy largo e ininterrumpido en un área y período específico) en los estuarios cercanos a Pine Island Sound en la zona de Charlotte Harbor, lo cual se ha corroborado mediante estudios de marcaje (Morrissey y Gruber, 1993; Heupel *et al.*, 2006).

Esto podría representar una señal de estructura genética dada por filopatría al sitio de crianza y por ende derivar en posibles diferencias genéticas en el DNA mitocondrial entre Cedar Key y Charlotte Harbor; pues estas dos zonas se consideran pueden ser áreas de crianza (D. Adams, com. pers., 2016). Por ello aunque en sentido convencional de la fragmentación del hábitat las áreas de crianza no se catalogan como barreras al flujo génico, influyen de manera decisiva al establecer límites en el hábitat donde las hembras regresan a dichas áreas (Keeney *et al.*, 2005)

En este sentido en especies de tiburones como *Carcharhinus limbatus* y *Carcharhinus leucas*, se reportó estructura genética o flujo génico restringido entre áreas de crianza con marcadores mitocondriales dado por la fidelidad al sitio; sin dejar a un lado que estas zonas son de suma importancia, pues aportan protección a los neonatos y juveniles aumentando su supervivencia (Keeney *et al.*, 2005; Karl *et al.*, 2011).

Por otra parte, los tres grupos probados con el análisis AMOVA y el marcador ND4 indican que la varianza no se incrementó al agrupar las localidades, por el contrario, sigue distribuyéndose al interior de éstas. Lo cual es coherente con lo que se observó tanto en la filogenia como en la red de haplotipos, pues ambos análisis revelan que son de origen reciente, ya que se presentan pocos pasos mutacionales. Más aún la presencia de algunos haplotipos ampliamente compartidos entre varias poblaciones sugiere una divergencia muy reciente o una expansión reciente como se verá más adelante.

De esta manera, en general el análisis AMOVA nos indicó que el marcador ND4 no posee la resolución necesaria para detectar valores significativos de  $\Phi_{CT}$ , entre los grupos propuestos debido a su baja tasa mutacional, por consiguiente se contrapone a lo obtenido con las  $\Phi_{ST}$  pareadas en las que se encontró una estructura en Florida oeste (Cedar Key, Charlotte Harbor, Florida Keys, Offshore Golfo de México), Florida este (Jacksonville, Florida Central) y México (Campeche, Tabasco) y como se discutirá, también los análisis SAMOVA y Barrier coinciden con estas divisiones.

En contraparte con el marcador de la región control en el estudio de Escatel-Luna *et al.*, 2015 encontraron diferencias significativas de la varianza entre grupos  $\Phi_{CT}= 0.129$ ; considerando una significancia de 0.001, los cuales fueron Florida Golfo de México (Cedar Key, Charlotte Harbor, Offshore Golfo de México), costa Atlántica de Florida (Jacksonville, Florida Central), zona de transición (Florida Keys) y sureste del Golfo de México (Campeche, Tabasco). Con estos resultados se soporta la hipótesis que el marcador ND4 no confiere la resolución necesaria para darnos una agrupación significativa en AMOVA.

Por otro lado al comparar el análisis AMOVA realizado con los marcadores concatenados (ND4 + región control) dos de los tres agrupamientos probados para el índice  $\Phi_{CT}$  fueron significativos, el primero consistió en la estructura genética de las localidades de Florida *versus* las mexicanas; el siguiente en la división de Florida oeste, este y México. Esta última estructura coincide también con los índices  $\Phi_{ST}$  pareados en los marcadores ND4, región control y ambos concatenados, que como se discutió anteriormente se encontró estructura genética entre las tres grandes regiones.

Para aportar más robustez a dicha hipótesis, el análisis SAMOVA mostró que al considerar tres, cuatro y cinco grupos, las localidades de Cedar Key y Jacksonville siempre se presentaban como grupos independientes. Concretamente se obtuvo el resultado que a mayor número de grupos se percibe una mayor significancia tanto en los parámetros  $\Phi_{CT}$  (entre grupos) y  $\Phi_{ST}$  (dentro de las poblaciones). Distinguiendo indicios a favor de una estructura genética a nivel más puntual.

Por todo lo anterior es posible que se encuentre una estructura más compleja basada en diferencias sutiles que el análisis AMOVA no rescata; considerando que sólo se analizaron un par de regiones del genoma mitocondrial, sin descartar que las diferencias podrían estar dejando huella en otras partes del genoma de *S. tiburo*. Aunque se obtiene evidencia gracias a los índices  $\Phi_{ST}$  pareados, donde solo con las secuencias concatenadas las localidades de Cedar Key-Charlotte Harbor obtuvieron valores de  $\Phi_{ST}=0.025$  y  $P=0.032$ , siendo estadísticamente significativos, respaldando la barrera generada por el programa Barrier.

De tal manera se propone que las barreras pudieran establecerse mediante ecorregiones marinas propuestas por Wilkinson *et al.*, (2009) (Figura 24) con base en datos tanto biológicos, climáticos, de marcaje, así como con datos genéticos estudiados en la región control (Escatel-Luna *et al.*, 2015), donde se tuvo significancia en las tres grandes áreas del estudio (Florida oeste, Florida este y México), soportados también con los marcadores ND4 y región control concatenados.

Así, las ecorregiones dividen perfectamente las localidades que podrían estructurarse como se muestra en la Figura 24. Por un lado, las localidades de Florida oeste (Jacksonville, Florida central) influenciadas por CG y AC y su respectiva barrera (señalada en el mapa con rojo) se separan de las demás poblaciones. Las de Florida oeste en la parte norte (Cedar Key) con la ecorregión GMN y Florida oeste en la parte sur (Charlotte Harbor, Florida Keys) con el ASFYB; ésta barrera se encuentra con una línea negra y separa a las localidades de Florida norte y sur en la parte de Florida oeste. Por último, las localidades de México (Campeche, Tabasco) ubicadas en el GMS están separadas de las de Florida (barrera marcada con una línea de color gris).

Un claro ejemplo de la estructura por condiciones físico-químicas (que a su vez está relacionada directamente con la determinación de zonas biogeográficas) es la distribución de la comunidad de macroinvertebrados bentónicos (como lo son el Phylum Annelida, Mollusca y Arthropoda donde se encuentra el género *Callinectes*, principal alimento de *S. tiburo*) en diferentes sitios estuarinos a lo largo de la costa Atlántica de Estados Unidos, donde la

distribución a gran escala geográfica se relaciona con la temperatura y las distribuciones más locales las determinan factores como el hábitat, tipo de sedimento, salinidad y profundidad (Engle y Summers, 1999).

Otro ejemplo de estructura por características oceanográficas o corrientes marinas, se presenta en *Sphyrna lewini* y *Carcharhinus limbatus*, pues la corriente fría de Benguela limita el flujo génico (mediado por las hembras), entre poblaciones del Atlántico e Indo-Pacífico (Duncan *et al.*, 2006; Keeney y Heist, 2006; Chapman *et al.*, 2009). Además en el tiburón *Carcharhinus brachyurus*, se encontró el uso de áreas de crianza exclusivamente en zonas templadas (Benavides *et al.*, 2011).



Figura 24. Mapa de las ecorregiones marinas asociadas al área de estudio. También se indican cada una de las localidades y las barreras propuestas en rojo: divide Florida oeste de este. Negro divide a las poblaciones del norte de Florida oeste (CK) de la del sur (CH). Gris: estructura a las poblaciones mexicanas de las de Florida.

## 7.2. Procesos demográficos y posibles causas ambientales e históricas

Los análisis de demografía histórica con el marcador ND4 indican una tendencia hacia la expansión espacial y demográfica. De manera particular los resultados obtenidos de las distribuciones de diferencias pareadas mostraron procesos de expansión y por lo tanto presentaron histogramas unimodales, para cada una de las localidades y éstas en conjunto, que también fueron corroborados por las desviaciones en la suma de cuadrados (*SSD*). Las pruebas neutralidad *F<sub>s</sub>* de *F<sub>u</sub>* y *D* de Tajima, que en la mayoría de las poblaciones exhibieron

valores negativos y estadísticamente significativos, aportaron una prueba más de la tendencia de las poblaciones hacia la expansión demográfica/espacial.

En concreto los modelos demográfico y espacial al momento de la expansión adquieren lapsos de tiempo que no son semejantes. Es decir, los parámetros de demografía histórica bajo el modelo de expansión demográfica tienen lugar hace aproximadamente 151,364- 79,630 años, donde la población de Cedar Key posee los tiempos más recientes y asumiendo el modelo de expansión espacial los tiempos van de 11,904-4,140 años. Lo anterior nos indica que si bien, ambos modelos nuevamente aportan indicios de expansiones históricas, es el espacial el que registra el último evento de expansión.

Continuando con el modelo de expansión demográfica, para cada una de las localidades los tiempos de expansión corresponden al Pleistoceno, donde su inicio data de hace 2.75 millones de años hasta hace unos 11,000 años, donde se presentaban ciclos que se caracterizaban por glaciaciones y períodos interglaciares (International Commission on Stratigraphy, 2014; CSI y NASA, 2015). Los tiempos de expansión que se estimaron en éste estudio para *S. tiburo* coinciden casi en su totalidad con el último período interglaciar Illinois-Wisconsin que empezó hace aproximadamente 140,000-130,000 años y terminó alrededor de 80,000 años (Baker *et al.*, 1989, Roy *et al.*, 2004).

Los períodos glaciales se caracterizaron por el enfriamiento climático (12 °C por debajo de la temperatura actual), el descenso en los niveles del mar (150 metros aproximadamente del nivel actual), donde como consecuencia directa las poblaciones que se encontraban en las aguas templadas de la península de Florida se dispersaron hacia el sur a aguas tropicales y se incrementó el contacto de las poblaciones Atlántico-Golfo, ocasionando también reducciones en los tamaños poblacionales de diferentes especies en Florida por la pérdida del hábitat, donde las zonas de distribución de las especies marinas fueron más restringidas (Avisé, 2000).

Por otro lado, en los períodos interglaciares los niveles del mar eran mayores y se presentaban temperaturas más cálidas con alrededor de 3°C por encima de la temperatura actual. Florida se encontraba rodeada de extensos estuarios y marismas, lo que probablemente propició que las poblaciones se separaran y por ende disminuyeran su contacto (Avisé, 2000; Ravelo *et al.*, 2004).

Un ejemplo de lo anterior son las poblaciones de *Callinectes sapidus*, principal alimento de *S. tiburo* en Florida, con rangos de distribución poblacional semejantes a los de este estudio, pues éstos cangrejos presentaron patrones de expansión en los períodos

interglaciares y de reducción en los glaciales. También se sugiere que las disminuciones en los valores de variación genética son inversamente proporcionales a la distancia geográfica que hay al refugio pleistocénico (McMillen-Jackson y Bert, 2004).

Respecto a los tamaños efectivos poblacionales del tiburón cabeza de pala, asumiendo el modelo de expansión demográfica, las poblaciones de Cedar Key y Florida Central obtuvieron valores de tamaño efectivo poblacional ( $N_0$ ) diferentes de cero (Tabla 7). Lo cual muestra que experimentaron cuellos de botella menos severos ejercidos por los períodos glaciares y obtuvieron los mayores valores de segundos tamaños efectivos ( $N_1$ ), logrando restablecerse en zonas de distribución previas o colonizando nuevas áreas estuarinas. Las demás poblaciones pudieron verse influidas en mayor parte por los cambios del nivel del mar, que se relacionan con la pérdida o reducción de estuarios, hábitat esencial para *S. tiburo*; como consecuencia directa, las fuentes de alimento probablemente escasearon y hubo una reducción drástica de las poblaciones (Escatel-Luna *et al.*, 2015).

La localidad que experimentó una mayor expansión fue Jacksonville, la cual pasó de tener un  $N_0 = 0$  a el mayor valor de  $N_1$ , siendo también una de las localidades que cuenta con un gran número de haplotipos únicos (como se muestra en la Figura 23 y 24), pudiendo dar como resultado que en los períodos interglaciares obtuviera las condiciones más propicias para una expansión tan exitosa. La población con los valores más bajos de  $N_1$  fue Charlotte Harbor, dándonos indicios de que éstos individuos tuvieron las condiciones ambientales menos aptas comparadas con las demás localidades. Lo anterior se aplica de manera contundente a los tamaños efectivos poblacionales de las hembras iniciales  $\theta_0$  y posteriores a la expansión  $\theta_1$ .

Asimismo, la red de haplotipos apoya los resultados que se mencionaron con anterioridad, pues presenta una distribución en forma de estrella, confirmando una expansión simultánea en todas las poblaciones (excepto Florida Keys) que se caracteriza por pocos pasos mutacionales, siendo una expansión diversificante. Esta expansión pudo haber ocurrido al igual que la expansión demográfica, en el marco de los períodos interglaciares donde los estuarios aumentaron de manera considerable. Adicionalmente la red de haplotipos muestra que la población de Jacksonville es una de las localidades que cuenta con un gran número de haplotipos únicos (como se muestra en la Figura 24), lo cual puede ser el reflejo del grado de independencia de ésta localidad y podría estar directamente relacionado con la abundancia de poblaciones de *Callinectes* y sus migraciones estacionales similares a las de *S. tiburo* (McMillen-Jackson y Bert, 2004).

En este sentido tanto en el dendograma como en el árbol de inferencia bayesiana, los haplotipos se encuentran dispersos en un arreglo que muestra flujo génico entre las poblaciones. En éste análisis se destaca una rama con dos haplotipos de Jacksonville (6 y 10), que al presentarse más pasos mutacionales se considera que esta es una población divergente. Asimismo no se aprecian conjuntos de haplotipos relacionados con las tres grandes regiones: Península de Florida oeste y este, ni el Golfo de México, aunque si se encontró en la región control reportada por Escatel-Luna *et al.*, (2015), donde se sugiere un escenario de expansión y los mismos patrones de períodos glaciales e interglaciares antes mencionados para la región ND4, con un contacto más reciente de las poblaciones del Golfo y Atlántico de Florida y éstas dos *versus* las mexicanas con un tiempo más antiguo, que corresponderían al período interglaciar Illinois-Wisconsin.

La localidad que posee el mayor número de haplotipos únicos es Jacksonville y asimismo es la población que obtuvo uno de los mayores niveles de expansión demográfica/espacial. El hecho de que no todos los haplotipos presentes en Jacksonville se encuentran agrupados, nos indica que aún existe comunicación con las poblaciones restantes o que en el pasado en los períodos interglaciares del Pleistoceno se tuvo gran flujo genético.

En suma, tanto la inferencia bayesiana, el dendograma y la red de haplotipos de *S. tiburo* perciben la ausencia de patrones filogeográficos, lo cual muestra la tasa evolutiva tan baja tanto de la especie, como del marcador mitocondrial usado en este estudio, que no permitió observar las diferencias encontradas con los índices  $\Phi_{ST}$ .

## VIII. CONCLUSIONES

El marcador mtDNA-ND4 en poblaciones de *Sphyrna tiburo* presentes en costas de Florida este y oeste, como en el Sureste del Golfo de México, tuvo valores bajos en los parámetros de diversidad genética comparado con otras especies de tiburones, aunque contrastado con la región control, marcador también mitocondrial, el ND4 posee una tasa de evolución más lenta.

Al concatenar los marcadores ND4 y región control los valores de diversidad se incrementaron, lo cual podría deberse a la adición de sitios informativos, las características ecológicas e históricas que imperan en la zona de estudio y que influye en la distribución de los genotipos (Avice, 2000).

Por otro lado, los datos reflejan patrones filogeográficos definidos, pues se encontraron diferencias genéticas importantes en las tres grandes regiones analizadas Atlántico y Golfo de México de Florida y las poblaciones mexicanas tanto para el marcador ND4 como los genes concatenados (ND4 y región control).

También se percibieron diferencias genéticas entre las poblaciones más norteñas de ambos lados de la península de Florida respecto a las poblaciones mexicanas, las cuales se lograron detectar gracias al marcador ND4, que da soporte a éstas diferencias más antiguas o ancestrales. Esto refleja un patrón de divergencia debido a una capacidad de dispersión limitada, pero podría tener también un componente ambiental relacionado con aspectos adaptativos.

En este sentido a pesar de que la localidad de Cedar Key, se acercaba a la estructura genética, no fue sino hasta incluir en el análisis genético el marcador ND4 y la región control, cuando se obtuvieron valores significativos que apoyan la separación de ésta población respecto a las poblaciones restantes, donde probablemente sean diferencias dadas por filopatría al sitio de crianza. Por ello es importante incluir más marcadores moleculares, deseablemente con distintas tasas de mutación para mejorar la resolución de los estudios genéticos y entender con mayor claridad los patrones presentes en la especie.

Históricamente las poblaciones han sufrido cuellos de botella, seguidos de expansiones poblacionales, esto a causa de las glaciaciones del Pleistoceno, dejando una señal en la diversidad de las poblaciones. La localidad de Jacksonville, fue la que posiblemente presentó las condiciones ecológicas óptimas para poseer el mayor tamaño efectivo posterior a la expansión, también es una de las poblaciones que cuenta con el mayor número de haplotipos únicos apoyados por la filogenia y red de haplotipos.

Así pues, los estudios genéticos en elasmobranquios tienen una valiosa aportación en temas de manejo y conservación pesquero como las unidades de manejo, que otorgan estimaciones de tipo cuantitativo del estado de la población y el riesgo, lo que conlleva superar el rendimiento máximo sostenible y la identificación de especies a nivel genético. Del mismo modo con los datos genéticos se pueden hacer inferencias filogeográficas usando diferentes marcadores tanto mitocondriales como nucleares para entender los procesos que promueven los patrones de distribución regionales y globales en los elasmobranquios, además de la estructura y evaluación del tamaño de las poblaciones, para cuantificar etapas vulnerables de los estadios de vida de las especies y los riesgos de extinción (Dudgeon *et al.*, 2012; Cortés *et al.*, 2015).

También es importante considerar que las poblaciones de *S. tiburo* son vulnerables debido a problemas antropogénicos como la pesca excesiva que puede disminuir su diversidad genética, por eso es importante tener en cuenta la fragilidad en escalas de tiempo ecológico y evolutivo para el manejo de las poblaciones (Chapman *et al.*, 2004). Del mismo modo Pérez-Jiménez (2014) considera que *S. tiburo* debería de entrar en la categoría de especie en peligro o en peligro crítico de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza o IUCN por sus siglas en inglés, debido a su potencial extirpación en aguas del Pacífico mexicano. Igualmente, nuestro equipo de laboratorio al platicar directamente con los pescadores específicamente en el caribe mexicano, han notado la ausencia de individuos del tiburón cabeza de pala en esta zona.

## IX. PERSPECTIVAS

-Obtener un muestreo estadísticamente significativo (n=30) para las localidades de Florida Keys (n=5), Offshore: Golfo de México (n=14) y Florida Central (n=15). En este sentido se recomienda aumentar el muestreo en poblaciones de todo el Golfo de México, en estados como Veracruz, Tamaulipas, Yucatán, Texas, Louisiana, Mississippi, Alabama, para conocer los patrones filogeográficos que se generan.

-Ya que sólo se tienen dos poblaciones del Atlántico las cuales son Florida Central y Jacksonville, se recomienda muestrear otros estados como Georgia, Carolina del norte y del sur para tener un panorama más amplio, en ese aspecto hacer inferencias filogeográficas de las poblaciones del Atlántico, así mismo individuos que provengan de países como Cuba y Las Bahamas.

-Secuenciar el genoma de algunas muestras de *S. tiburo* provenientes del Atlántico y el Pacífico para en términos genómicos determinar si son la misma especie, subespecie o una especie distinta. Ya teniendo las muestras del Pacífico calcular la tasa de mutación específica de la región ND4.

-Amplificar otras regiones del genoma de *S. tiburo*, por ejemplo genes nucleares para determinar si es una especie que presenta filopatría.

## LITERATURA CITADA

- Andrews, J. T., A. E. Jennings, M. Kerwin, M. Kirby, W. Manley, G. H. Miller, G. Bond y B. MacLean. 1995. A Heinrich-like event, H-0 (DC-0): Source (s) for detrital carbonate in the North Atlantic during the Younger Dryas Chronozone. *Paleoceanography*, **10** (5): 943-952.
- Aquadro, C. F. y B. D. Greenberg. 1983. Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics*, **103**: 287-312.
- Arevalo, E., S. K. Davis y J. W. Sites. 1994. Mitochondrial-DNA sequence divergence and phylogenetic relationships among 8 chromosome races of the *Sceloporus grammicus* complex (Phrynosomatidae) in central Mexico. *Systematic Biology*, **43**: 387-418.
- Avise, J. C. 1992. And the Biogeographic Molecular Structure Population History of a Regional with Fauna: A Case History Lessons for Conservation Biology. *Oikos*, **63**: 62-76.
- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press, Massachusetts. 464 pp.
- Avise, J. C., J. Arnold, R. M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J. E. Neigel, C. A. Reeb y N.C. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Reviews in Ecology and Systematics*, **18**: 489-522.
- Bacon, C. D., D. Silvestro, C. Jaramillo, B. T. Smith, P. Chakrabarty y A. Antonelli. 2015. Biological evidence supports an early and complex emergence of the Isthmus of Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **112** (19): 6110-6115.
- Baker, R. G., A. E. Sullivan, G. R. Hallberg y D. G. Horton. 1989. Vegetational changes in western Illinois during the onset of late Wisconsinan glaciation. *Ecology*, **70** (5): 1363-1376.
- Bard, E., F. Rostek, J. L. Turon y S. Gendreau. 2000. Hydrological impact of Heinrich events in the subtropical northeast Atlantic. *Science*, **289**: 1321-1324.
- Benavides, M. T., K. A. Feldheim, C. A. Duffy, S. Wintner, J. M. Braccini, J. Boomer, C. Huvneers, P. Rogers, J. C. Mangel, J. Alfaro-Shigueto, D. P. Cartamil y D. Chapman. 2011. Phylogeography of the copper shark (*Carcharhinus brachyurus*) in the southern hemisphere: implications for the conservation of a coastal apex predator. *Marine and Freshwater Research*, **62** (7): 861-869.

- Bethea, D. M., M. J. Ajemian, J. K. Carlson, E. R. Hoffmayer, J. L. Imhoff, R. D. Grubbs, C. T. Peterson y G. H. Burgess. 2015. Distribution and community structure of coastal sharks in the northeastern Gulf of Mexico. *Environmental Biology of Fishes*, **98**: 1233-1254.
- Bethea, D. M., L. Hale, J. K. Carlson, E. Cortés, C. A. Manire y J. Gelsleichter. 2007. Geographic and Ontogenetic Variation in the Diet and Daily Ration of the Bonnethead Shark, *Sphyrna tiburo*, from the Eastern Gulf of Mexico. *Marine Biology*: **152**: 1009–1020.
- Bond, G., H. Heinrich, W. Broecker, L. Labeyrie, J. McManus, J. Andrews, S. Huon, R. Jantschik, S. Clasen, C. Simet, K. Tedesco, M. Klas, G. Bonani y S. Ivy. 1992. Evidence for massive discharges of icebergs into the North Atlantic Ocean during the last glacial period. *Nature*, **360**: 245-249.
- Bond, G., W. Broecker, S. Johnsen, J. McManus, L. Labeyrie, J. Jouzel y G. Bonani. 1993. Correlations between climate records from North Atlantic sediments and Greenland ice. *Nature*, **365**: 143-147.
- Bonfil, R. 1994. *Overview of World elasmobranch fisheries*. FAO Fisheries Technical Paper 341. Roma, FAO.
- Boomer, J. J., R. G. Harcourt, M. P. Francis y A. J. Stow. 2012. Genetic divergence, speciation and biogeography of *Mustelus* (sharks) in the central Indo-Pacific and Australasia. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **64**: 697-703.
- Brassel, K. E. y D. Reif. 1979. A procedure to generate Thiessen polygons. *Geographical Analysis*, **325**: 31-36.
- Broecker, W. S. y S. Hemming. 2001. Climate swings come into focus. *Science*, **294**: 2308-2309.
- Carlson, J. K. y G. R. Parsons. 1997. Age and growth of the bonnethead shark, *Sphyrna tiburo*, from northwest Florida, with comments on clinal variation. *Environmental Biology of Fishes*, **50**: 331-341.
- Carroll, R. L. 1988. *Vertebrate Paleontology and Evolution*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. 698 pp.
- Carroll, R. L. 1997. Patterns and Processes of Vertebrate Evolution. Pp. 266-295, en: Carroll. R. L. (eds). *Physical constraints*. Cambridge University Press, Cambridge.

- Caso, M., I. Pisanty y E. Ezcurra. 2004. *Diagnóstico ambiental del Golfo de México*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Instituto de Ecología A. C. y Harte Research Institute for Gulf of Mexico Studies, Ciudad de México. 493 pp.
- Castro, A. L. F., B. S. Stewart, S. G. Wilson, R. E. Hueter, M. G. Meekan, P. J. Motta, B. W. Bowen y S. A. Karl. 2007. Population genetic structure of Earth's largest fish, the whale shark (*Rhincodon typus*). *Molecular Ecology*, **16** (24): 5183-5192.
- Castro, J. I. 1993. The shark nursery of Bulls Bay, South Carolina, with a review of the shark nurseries of the southeastern coast of the United States. *Environmental Biology of Fishes*, **38**: 37-48.
- Castro, J. I. 2011. *The sharks of North America*. Oxford University Press, E. U. 640 pp.
- Chabot, C. L., M. Espinoza, I. Mascarenas-Osorio y A. Rocha-Olivares. 2015. The effect of biogeographic and phylogeographic barriers on gene flow in the brown smoothhound shark, *Mustelus henlei*, in the northeastern Pacific. *Ecology and Evolution*, **5** (8): 1585-1600.
- Chapman, D. D., P. A. Prodöhl, J. Gelsleichter, C. A. Manire y M. S. Shivji. 2004. Predominance of Genetic Monogamy by Females in a Hammerhead Shark, *Sphyrna tiburo*: Implications for Shark Conservation. *Molecular Ecology*, **13**: 1965-1974.
- Chapman, D. D., D. Pinhal y M. S. Shivji. 2009. Tracking the fin trade genetic stock identification in western Atlantic scalloped hammerhead sharks *Sphyrna lewini*. *Endangered Species Research*, **9**: 221-228.
- Chapman, D. D., M. S. Shivji, E. Louis, J. Sommer, H. Fletchery y A. Paulo. 2007. Virgin birth in a hammerhead shark Virgin birth in a hammerhead shark. *Biology Letters*, **3**: 425-427.
- Clark, E. 1963. Massive aggregations of large rays and sharks in and near Sarasota, Florida. *Zoologica*, **48** (2): 61-64.
- Climate Science Investigations (CSI) y National Aeronautics and Space Administration (NASA). 2015. Climates of the Past. <<http://www.ces.fau.edu/nasa/module-3/temperature-trend-changes/past-climates.php>> Consultado el 5 de agosto de 2015.
- Compagno, L. J. V. 1984. *FAO Species catalogue. Vol. 4. Sharks of the world: an annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. Part 2. Carcharhiniformes*. FAO Fish Synop. 538-539,

550-551 pp.

Compagno, L., M. Dando y S. Fowler. 2006. *Guía de campo de los tiburones del mundo*. Ediciones Omega, Barcelona. 498 pp.

CONAPESCA-INP, Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. 2004. *Plan de Acción Nacional para el Manejo y Conservación de Tiburones, Rayas y Especies Afines en México*. Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca e Instituto Nacional de la Pesca, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Mazatlán, México. 80 pp.

Cortés, E. y G. R. Parsons. 1996. Comparative demography of two populations of the bonnethead shark (*Sphyrna tiburo*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **53**: 709-718.

Cortés, E y J. A. Neer. 2009. Atlantic shark fisheries. Pp. 137-147, en: National Marine Fisheries Service (NMFS) (eds.). Our living oceans. Report on the status of U.S. living marine resources. U.S. Dep. Commer., NOAA Tech. Memo. NMFS-F/SPO-80.

Cortés, E. 2005. *Sphyrna tiburo*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Consultado 18 Junio 2015.

Cortés, E., C. A. Manire y R. E. Hueter. 1996. Diet, feeding habits, and diel feeding chronology of the bonnethead shark, *Sphyrna tiburo*, in southwest Florida. *Bulletin of Marine Science*, **58** (2): 353-367.

Cortés, E., E. N. Brooks y K. W. Shertzer. 2015. Risk assessment of cartilaginous fish populations. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*, **72** (3): 1057-1068.

Darriba, D, G. L. Taboada, R. Doallo y D. Posada. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, **9** (8): 772.

Briggs, D. E. G. y P. R. Crowther. 2007. *Palaeobiology II*. Blackwell Publising, Hong Kong. 600 pp.

DOF, Diario Oficial de la Federación. 2014. Acuerdo por el que se modifica el aviso por el que se da a conocer el establecimiento de épocas y zonas de veda para la pesca de diferentes especies de la fauna acuática en aguas de jurisdicción federal de los estados unidos mexicanos, publicado el 16 de marzo de 1994 para modificar el periodo y zonas de veda de tiburones en el Golfo de México y Mar Caribe, Norma Oficial Mexicana NOM-029-PESC-2006, Pesca responsable de

tiburones y rayas, especificaciones para su aprovechamiento <[http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5344735&fecha=15/05/2014](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5344735&fecha=15/05/2014)>. Consultado el 16 de julio de 2015.

DOF, Diario Oficial de la Federación. 2015. Proyecto de Modificación de la Norma Oficial Mexicana NOM-029-PESC-2006, Pesca responsable de tiburones y rayas. Especificaciones para su aprovechamiento. <[http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5381585&fecha=11/02/2015](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5381585&fecha=11/02/2015)>. Consultado el 15 de julio de 2015.

Driggers, W. B., B. S. Frazier, D. H. Adams, G. F. Ulrich, C. M. Jones, E. R. Hoffmayer y M. D. Campbell. 2014. Site fidelity of migratory bonnethead sharks *Sphyrna tiburo* (L. 1758) to specific estuaries in South Carolina, USA. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **459**: 61–69.

Drummond, A. J. y A. Rambaut. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC evolutionary biology*, **7**: 214.

Drummond, A. J., A. Rambaut, B. Shapiro y O. G. Pybus. 2005. Bayesian Coalescent Inference of Past Population Dynamics from Molecular Sequences. *Molecular Biology and Evolution*, **22** (5): 1185-1192.

Dudgeon, C. L., D. Broderick y R. Ovenden. 2009. IUCN classification zones concord with, but underestimate, the population genetic structure of the zebra shark *Stegostoma fasciatum* in the Indo-West Pacific. *Molecular Ecology*, **18**: 248-261.

Dudgeon, C. L., D. C. Blower, D. Broderick, J. L. Giles, B. J. Holmes, T. Kashiwagi, N. C. Krück, J. A. T. Morgan, B. J. Tillett y J. R. Ovenden. 2012. A review of the application of molecular genetics for fisheries management and conservation of sharks and rays. *Journal of Fish Biology*, **80**: 1780-1843.

Duncan, K. M. y K. N. Holland. 2006. Habitat use, growth rates and dispersal patterns of juvenile scalloped hammerhead sharks *Sphyrna lewini* in a nursery habitat. *Marine Ecology Progress Series*, **312**: 211-221.

- Duncan, K. M., A. P. Martin, B. W. Bowen y H. G. De Couet. 2006. Global phylogeography of the scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*). *Molecular Ecology*, **15**: 2239-2251.
- Dupanloup, I., S. Scheneider y L. Excoffier. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, **11**: 2571-2581.
- Ebert, D. A. y M. F. W. Stehmann. 2013. *Sharks, batoids, and chimaeras of the North Atlantic*. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes. No. 7. Roma, FAO. 523 pp.
- Ebert, D. A., S. Fowler y L. Compagno. 2013. *Sharks of the World: A Fully Illustrated Guide*. <<http://www.wildnaturepress.com/wp-content/uploads/2013/11/Sharksof-the-World-species-list.pdf>>. Consultado el 24 de septiembre de 2014.
- Eguiarte, L., V. Souza y X. Aguirre. 2007. *Ecología molecular*. SEMARNAT, CONABIO, Instituto de Biología UNAM, México. 592 pp.
- Engle, V. D. y J. K. Summers. 1999. Latitudinal gradients in benthic community composition in Western Atlantic estuaries. *Journal of Biogeography*, **26**: 1007-1023.
- Escatel-Luna, E., D. H. Adams, M. Uribe-Alcocer, V. Islas-Villanueva y P. Díaz-Jaimes. 2015. Population Genetic Structure of the Bonnethead Shark, *Sphyrna tiburo*, from the Western North Atlantic Ocean Based on mtDNA Sequences. *Journal of Heredity*, **106** (4): 355-365.
- Excoffier, L., G. Laval y S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**: 47-50.
- Excoffier, L., P. E. Smouse y J. M. Quattro. 1992. Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics*, **131**: 479-491.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2010. Estado de la cuestión en la gestión de los recursos zoogenéticos. Sección C: Marcadores moleculares: una herramienta para explorar la diversidad genética. Pp. 393-416, en: Barbara Rischkowsky y Dafydd Pilling (eds.). *La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura*. FAO, Roma.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2012. Resumen del examen de la

aplicación del Plan de acción internacional (PAI) para la conservación y ordenación de los tiburones. <<http://www.fao.org/docrep/meeting/027/md761s01.pdf>>. Consultado 30 de julio de 2015.

Farris, D. W., C. Jaramillo, G. Bayona, S. A. Restrepo-Moreno, C. Montes, A. Cardona, A. Mora, R. J. Speakman, M. D. Glascock y V. Valencia. 2011. Fracturing of the Panamanian Isthmus during initial collision with South America. *Geology*, **39** (11): 1007-1010.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**: 783-791.

Fischer, J., K. Erikstein, B. D'Offay, S. Guggisberg y M. Barone. 2012. *Review of the Implementation of the International Plan of Action for the Conservation and Management of Sharks*. FAO Fisheries and Aquaculture Circular No. 1076. Roma, FAO. 120 pp.

Frankham, R., J. D. Ballou y D. A. Briscoe. 2010. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge. 618 pp.

Fu, Y. X. 1997. Statistical test of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, **147**: 915-925.

Fu, Y. X. y W. H. Li. 1993. Statistical test of neutrality mutations. *Genetics*, **133**: 693-709.

García Álvarez, M. A. M. 2014. Uso de recursos tróficos por *Rhizoprionodon terraenovae* y *Sphyrna tiburo*, en el sureste del Golfo de México. Tesis profesional de maestría. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Veracruzana, México. 100 pp.

Greenberg, B. D., J. E. Newbold y A. Sugino. 1983. Intraspecific nucleotide sequence variability surrounding the origin of replication in human mitochondrial DNA. *Gene*, **21**: 33-49.

Hall, T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**: 95-98.

Hamilton, M. B. 2009. *Population Genetics*. John Wiley y Sons Ltd., Oxford. 424 pp.

Heinrich, H. 1988. Origin and consequences of cyclic ice rafting in the northeast Atlantic Ocean during the past 130,000 years. *Quaternary research*, **29** (2): 142-152.

- Heupel, M. R. y C. A. Simpfendorfer. 2002. Estimation of survival and mortality of juvenile blacktip sharks, *Carcharhinus limbatus*, within a nursery area based on telemetry data. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **59**: 624-632.
- Heupel, M. R., C. A. Simpfendorfer, A. B. Collins y J. P. Tyminski. 2006. Residency and movement patterns of bonnethead sharks, *Sphyrna tiburo*, in large Florida estuary. *Environmental Biology of Fishes*, **76**: 47-67.
- Hirst, J., J. Carroll, I. M. Fearnley, R. J. Shannon y J. E. Walker. 2003. The nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1604** (3): 135-150.
- Hoorn, C. y S. Flantua. 2015. An early start for the Panama land bridge. *Science*, **348**: 186-187.
- Huelsenbeck, J. P. y F. Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, **17** (8): 754-755.
- Hueter, R. E. y C. A. Manire. 1994. Bycatch and catch-release mortality of small sharks in the Gulf coast nursery grounds of Tampa Bay and Charlotte Harbor. Mote Marine Technical Report No. 368 Final report to NOAA/NMFS, MARFIN Project NA17FF0378-01: 183 pp.
- Hueter, R. E., D. A. Mann, K. P. Maruska, J. A. Sisneros y L. S. Demski. 2004. Sensory Biology of Elasmobranchs. Pp. 341-349, en: J. C. Carrier, J. A. Musick y M. R. Heithaus (eds.). *Biology of Sharks and Their Relatives*. CRC Press, Londres.
- INAPESCA, Instituto Nacional de Pesca. 2014. Publica SAGARPA períodos y zonas de veda de pesca de tiburón en el Golfo de México y Mar Caribe. <<http://www.inapesca.gob.mx/portal/sala-de-prensa/boletines/373-publica-sagarpa-periodos-y-zonas-de-veda-de-pesca-de-tiburon-en-el-golfo-de-mexico-y-mar-caribe>>. Consultado el 30 julio de 2015.
- Inoue, J. G., M. Miya, K. Tsukamoto y M. Nishida, 2001. A mitogenomic perspective on the basal teleostean phylogeny: resolving higher-level relationships with longer DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **20**: 275-285.
- International Commission on Stratigraphy. 2014. Chart/Time Scale. <<http://www.stratigraphy.org/index.php/ics-chart-timescale>>. Consultado el 5 de agosto de 2015.

- Jobling, M., M. Hurles y C. Tyler-Smith. 2004. *Human evolutionary genetics, origins, peoples and disease*. Garland Publishing, Oxford. 523 pp.
- Jorgensen, S. J., C. A. Reeb, T. K. Chapple, S. Anderson, C. Perle, S. R. Van Sommeran, C. Fritz-Cope, A. C. Brown, A. P. Klimley y B. A. Block. 2009. Philopatry and migration of Pacific white sharks. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **227**: 679-688.
- Karl, S. A., A. L. F. Castro, J. A. Lopez, P. Charvet y G. H. Burgess. 2011. Phylogeography and conservation of the bull shark (*Carcharhinus leucas*) inferred from mitochondrial and microsatellite DNA. *Conservation Genetics*, **12** (2): 371-382.
- Kasamatsu, H., D. L. Robberson y J. Vinograd. 1971. A novel closed-circular mitochondrial DNA with properties of a replicating intermediate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **68** (9): 2252-2257.
- Keeney, D. B. y E. J. Heist. 2006. Worldwide phylogeography of the blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) inferred from mitochondrial DNA reveals isolation of western Atlantic populations coupled with recent Pacific dispersal. *Molecular Ecology*, **15**: 3669-3679.
- Keeney, D. B., M. R. Heupel, R. E. Hueter y E. J. Heist. 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.
- Keigwin, L. 1982. Isotopic paleoceanography of the Caribbean and East Pacific: role of Panama uplift in late Neogene time. *Science*, **217**: 350-353.
- Keigwin, L. D. 1978. Pliocene closing of the Isthmus of Panama, based on biostratigraphic evidence from nearby Pacific Ocean and Caribbean Sea cores. *Geology*, **6** (10): 630-634.
- Kimura, M. 1981. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. *Genetics*, **78**: 454-458.
- Kimura, M. 1983. *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge University Press, Cambridge. 367 pp.
- Klimley, A. P. 1987. The determinants of sexual segregation in the scalloped hammerhead shark, *Sphyrna lewini*. *Environmental Biology of Fishes*, **18** (1): 27-40.

- Kohler, N. E., E. Sawicki, P. A. Turner y C. McCandless. 2013. Mark/Recapture Data for the Bonnethead (*Sphyrna tiburo*), in the Western North Atlantic from the NEFSC Cooperative Shark Tagging Program. SEDAR, North Charleston, SC. 15 pp.
- Laird, P. W., A. Zijderveld, K. Linders, M. A. Rudnicki, R. Jaenisch y A. Berns. 1991. Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Research*, **19** (15): 4293.
- Lessios, H. A. 2008. The great American schism: divergence of marine organisms after the rise of the Central American Isthmus. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **39**: 63-91.
- Librado, P. y J. Rozas. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**: 1451-1452.
- Lim, D. D., P. Motta, K. Mara y A. P. Martin. 2010. Phylogeny of Hammerhead Sharks (Family Sphyrnidae) Inferred from Mitochondrial and Nuclear Genes. *Molecular phylogenetics and evolution*, **55** (2): 572-79.
- Lombardi-Carlson, L. A., E. Cortés, G. R. Parsons y C. A. Manire. 2003. Latitudinal variation in life-history traits of bonnethead sharks, *Sphyrna tiburo*, (Carcharhiniformes: Sphyrnidae) from the eastern Gulf of Mexico. *Marine and Freshwater Research*, **54**: 875-883.
- Lunt, D. H., L. E. Whipple y B. C. Hyman. 1998. Mitochondrial DNA variable number tandem repeats (VNTRs): utility and problems in molecular ecology. *Molecular Ecology*, **7**: 1441-1455.
- Maguire, J.-J., M. Sissenwine, J. Csirke, R. Grainger y S. Garcia. 2006. *The state of world highly migratory, straddling and other high seas fishery resources and associated species*. FAO Fisheries Technical Paper. No. 495. Roma, FAO. 84 pp.
- Manire, C. A., L. E. L. Rasmusen, D. L. Hess y R. E. Hueter. 1995. Serum Steroid Hormones and Reproductive Cycle of the Female Bonnethead Shark, *Sphyrna tiburo*. *General and Comparative Endocrinology*, **97**: 366-376.
- Manni, F., E. Guérard y E. Heyer. 2004. Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: how barriers can be detected by “Monmmonier’s algorithm”. *Human Biology*, **76** (2): 173-190.
- Martin, A. P. 1999. Substitution Rates of Organelle and Nuclear Genes in Sharks: Implicating Metabolic

Rate (Again). *Molecular Biology and Evolution*, **16** (7): 996-1002.

Martin, A. P., G. J. Naylor y S. R. Palumbi. 1992. Rates of mitochondrial DNA evolution in sharks are slow compared with mammals. *Nature*, **357**: 153.

Mayr, E. 1942. *Systematics and Origin of the Species from the Viewpoint of a Zoologist*. Columbia University Press, Nueva York. 372 pp.

Mayr, E. 1963. *Animal species and evolution*. Belknap press, Massachusetts. 797 pp.

McCallister, M. P. 2012. Abundance, Distribution, and Habitat Use of Sharks in Two Northeast Florida Estuaries. Tesis profesional de maestría. Department of Biology, University of North Florida, Florida. 90 pp.

McMillen-Jackson, A. L. y T. M. Bert. 2004. Mitochondrial DNA variation and population genetic structure of the blue crab *Callinectes sapidus* in the Eastern United States. *Marine Biology*, **145**: 769-777.

Mendoza-Vargas, O. U., L. Espinoza-Arrubarrena e I. Salgado-Ugarte. 2016. ¿Desde cuándo existen los tiburones?. *Nuestra Tierra*, **25**: 11-16.

Monmonier, M. 1973. Maximum-difference barriers: an alternative numerical regionalization method. *Geographical Analysis*, **3**: 245-261.

Morrissey, J. F. y S. H. Gruber. 1993. Home range of juvenile lemon sharks, *Negaprion brevirostris*. *Copeia*, **1993** (2): 425-434.

Muhs, D. R., K. R Simmons y B. Steinke. 2002. Timing and warmth of the Last Interglacial period: new U-series evidence from Hawaii and Bermuda and a new fossil compilations for North America. *Quaternary Science Reviews*, **21**: 1355-1383.

Nance, H. A, P. Klimley, F. Galván-Magaña, J. Martínez-Ortíz y P. B. Marko. 2011 Demographic Processes Underlying Subtle Patterns of Population Structure in the Scalloped Hammerhead Shark, *Sphyrna lewini*. *PLoS ONE*, **6** (7): e21459. doi:10.1371/journal.pone.0021459.

Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, Nueva York. 512 pp.

Nei, M. y W-H Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction

endonucleases. *Genetics*, **76** (10): 5269-5273.

Ovenden, J. R., J. A. T. Morgan, R. Street, A. Tobin, C. Simpfendorfer, W. Macbeth y D. Welch. 2011. Negligible evidence for regional genetic population structure for two shark species *Rhizoprionodon acutus* (Rüppell, 1837) and *Sphyrna lewini* (Griffith y Smith, 1834) with contrasting biology. *Marine Biology*, **158**: 1497-1509.

Palumbi, S. R. 1994. Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annual Review Ecology, Evolution, and Systematics*, **25**: 547-572.

Panel of Past Global Change of Life. 1995. *Effects of Past Global Change of Life*. National Academy Press, 36 pp.

Parsons, G. R. 1993a. Age determination and growth of the bonnethead shark *Sphyrna tiburo*: a comparison of two populations. *Marine Biology*, **117**: 23-31.

Parsons, G. R. 1993b. Geographic variation in reproduction between two populations of the bonnethead shark, *Sphyrna tiburo*. *Environmental Biology of Fishes*, **38**: 25-35.

Pérez-Jiménez, J. C. 2014. Historical records reveal potential extirpation of four hammerhead sharks (*Sphyrna* spp.) in Mexican Pacific waters. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **24** (2): 671-683.

Piñero, D., A. Barahona, L. Eguiarte, A. Rocha Olivares y R. Salas Lizana. 2008. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México. Pp. 415-435, en: J. Soberón, G. Halffter, J. Llorente-Bousquets (eds.). *Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad*. Comisión Nacional para el conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), México.

Polzin, T. y S. V. Daneschmand. 2003. Fluxus- engineering. <[www.fluxus-engineering.com](http://www.fluxus-engineering.com)>. Consultado el 15 de noviembre de 2014.

Portnoy, D. S., C. M. Hollenbeck, C. N. Belcher, W. B. Driggers III, B. S. Frazier, J. Gelsleichter, R. D. Grubbs y J. R. Gold. 2014. Contemporary population structure and post-glacial genetic demography in a migratory marine species, the blacknose shark *Carcharhinus acronotus*. *Molecular Ecology*, **23** (22): 5480-5495.

- Portnoy, D. S., J. B. Puritz, C. M. Hollenbeck, J. Gelsleichter, D. Chapman y J. R. Gold. 2015. Selection and sex-biased dispersal in a coastal shark: the influence of philopatry on adaptive variation. *Molecular Ecology*, **24** (23): 5877-5885.
- Ramírez, J. T. 2006. Corrientes Oceánicas. *Revista 360°*, **2**: 1-9.
- Ravelo, A. C., D. H. Andreasen, M. Lyle, A. O. Lyle y M. W. Wara. 2004. Regional climate shifts caused by gradual global cooling in the Pliocene epoch. *Nature*, **429**: 263-267.
- Ray, N., M. Currat y L. Excoffier. 2003. Intra-Deme Molecular Diversity in Spatially Expanding Populations. *Molecular Biology and Evolution*, **20** (1): 76-86.
- Rogers, A. R. y H. Harpending. 1992. Population Growth Makes Waves in the Distribution of Pairwise Genetic Differences. *Molecular Biology and Evolution*, **9** (3): 552-569.
- Ronquist, F. y J. P. Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, **19**: 1572-1574.
- Roy, M., P. U. Clark, R. W. Barendregt y J. R. Glasmann. 2004. Glacial stratigraphy and paleomagnetism of late Cenozoic deposits of the north-central United States. *Geological Society of America Bulletin*, **116** (1/7): 30-41.
- Saitou, N. y M. Nei. 1987. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4** (4): 406-425.
- Slatkin, M y R. R. Hudson. 1991. Pairwise Comparisons of Mitochondrial DNA Sequences in Stable and Exponentially Growing Populations. *Genetics*, **129**: 555- 562.
- Sosdian, S. e Y. Rosenthal. 2009. Deep-Sea Temperature and Ice Volume Changes Across the Pliocene-Pleistocene Climate Transitions. *Science*, **325**: 306-310.
- Speed, C. W., I. C. Field, M. G. Meekan y C. J. A. Bradshaw. 2010. Complexities of coastal shark movements and their implications for management. *Marine Ecology Progress Series*, **408**: 275-293.
- Springer, S. 1967. Social organization of shark populations. Pp. 149-174, en: eds P.W. Gilbert, R. F. Mathewson y D. P. Rall (eds.). *Sharks, Skates and Rays*. John Hopkins Press, Baltimore.

- Szpiech, Z. A., M. Jakobsson y N. A. Rosenberg. 2008. ADZE: a rarefaction approach for counting alleles private to combinations of populations. *Bioinformatics*, **24** (21): 2498-2504.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, **123**: 585-595.
- Tamura, K. 1992. Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions When There Are Strong Transition-Transversion and G+C-Content Biases. *Molecular Biology and Evolution*, **9** (4): 678-687.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipinski y S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, **30**: 2725-2729.
- Tarbut, E. J. y F. K. Lutgens. 2005. *Ciencias de la Tierra. Una introducción a la geología física*. Pearson Prentice Hall, Madrid. 686 pp.
- Tyminski, J. P., R. E. Hueter y J. Morris. 2013. Tag-recapture results of bonnethead (*Sphyrna tiburo*) and Atlantic sharpnose (*Rhizoprionodon terraenovae*) sharks in the Gulf of Mexico and Florida Coastal Waters. SEDAR34-WP-31. SEDAR, North Charleston, SC. 12 pp.
- Ubeda, A. J., C. A. Simpfendorfer y M. R. Heupel. 2009. Movements of bonnetheads, *Sphyrna tiburo*, as a response to salinity change in a Florida estuary. *Environmental Biology of Fishes*, **84**: 293-303.
- Voronoi, M. G. 1908. Nouvelles application des paramètres continus à la théorie des formes quadratiques, deuxième mémoire, recherche sur le parallélogrammes primitifs. *Journal für die reine und angewandte Mathematik*, **134**: 198-207.
- Watterson, G. A. 1975. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical population biology*, **7** (2): 256-276.
- White, W. T y E. Sommerville. 2004. Sensory Biology of Elasmobranchs. Pp. 182, en: J. C. Carrier, J. A. Musick y M. R. Heithaus (eds.). *Biology of Sharks and Their Relatives*. CRC Press, Londres.
- Wilga, C. D. y P. J. Motta. 2000. Durophagy in Sharks: Feeding Mechanics of the Hammerhead *Sphyrna tiburo*. *The Journal of experimental biology*, **203** (18): 2781-96.
- Wilkinson, T., E. Wiken, J. Bezaury Creel, T. Hourigan, T. Agardy, H. Herrmann, L. Janishevski, C. Madden, L. Morgan y M. Padilla. 2009. *Ecorregiones marinas de América del Norte*. Comisión

para la Cooperación Ambiental, Montreal. 200 pp.

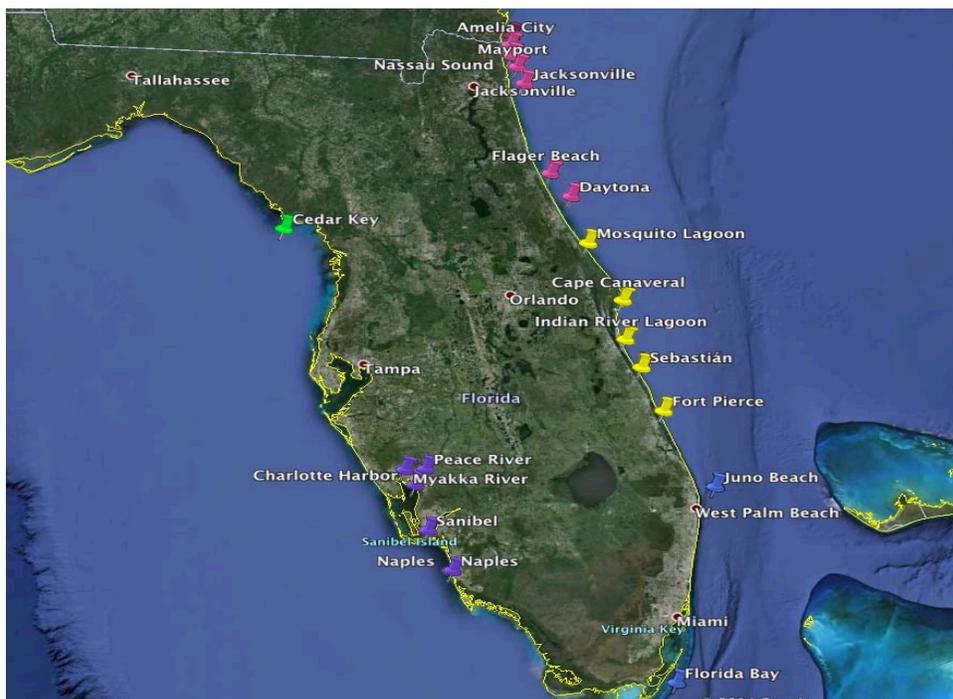
Woodburne, M. O. 2010. The Great American Biotic Interchange: dispersals, tectonics, climate, sea level and holding pens. *Journal of Mammalian Evolution*, **17** (4): 245-264.

Yang, Z y B. Rannala. 1997. Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: a Markov Chain Monte Carlo Method. *Molecular Biology and Evolution*, **14**: 717-724.

Zvelebil, M. y J. G. Baum. 2008. *Understanding bioinformatics*. Garland Science, Taylor y Francis Group. Nueva York. 772 pp.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Mapa detallado de las localidades de la zona de estudio. Con color verde Cedar Key (CK), morado Charlotte Harbor (CH), azul Florida Keys (FK), amarillo Florida Central (CENT), y en rosa Jacksonville (JX).



### **Anexo 2.** Protocolo de extracción de DNA

Se toma medio centímetro cúbico de tejido y se coloca en un tubo eppendorf con 116.15  $\mu\text{L}$  de EDTA a una concentración de 0.5 M y 484  $\mu\text{L}$  de solución de lisis, los tubos deben permanecer en hielo. Agregar posteriormente 18  $\mu\text{L}$  de proteinasa K a una concentración de 20 mg/mL. Incubar a 55°C por 3 horas, vortexeando cada 30 min. Se pueden poner 3  $\mu\text{L}$  de RNAasa, se invierte 5 veces y se mete al horno a 37 °C de 15-20 min.

Se adicionan 200  $\mu\text{L}$  de precipitador de proteínas y se agita en el vórtex por 20 seg., se deja en hielo por 5 min. Y se centrifuga por 4 min. El sobrenadante se pasa a un tubo eppendorf y se colocan de 600-650  $\mu\text{L}$  de isopropanol, quedando en el fondo restos celulares y proteínas los cuales deben desecharse al invertir el tubo eppendorf, quedando solo una nube blanca que es el DNA, centrifugar durante minuto y medio, decantar nuevamente, agregar 60  $\mu\text{L}$  de alcohol al 70% y se invierte varias veces para así lavar el botón de DNA. Centrifugar por

1 min., decantar. Colocar los tubos destapados en una centrífuga de vacío por 5 -10 min. Para que el alcohol se evapore sin que el botón de DNA se reseque.

**Anexo 3.** Tablas de diversidad genética de *S. tiburo*, con los marcadores A) ND4 y B) región control , en costas de Florida en el Golfo de México y el Atlántico, Golfo de México Sureste.

**A)**

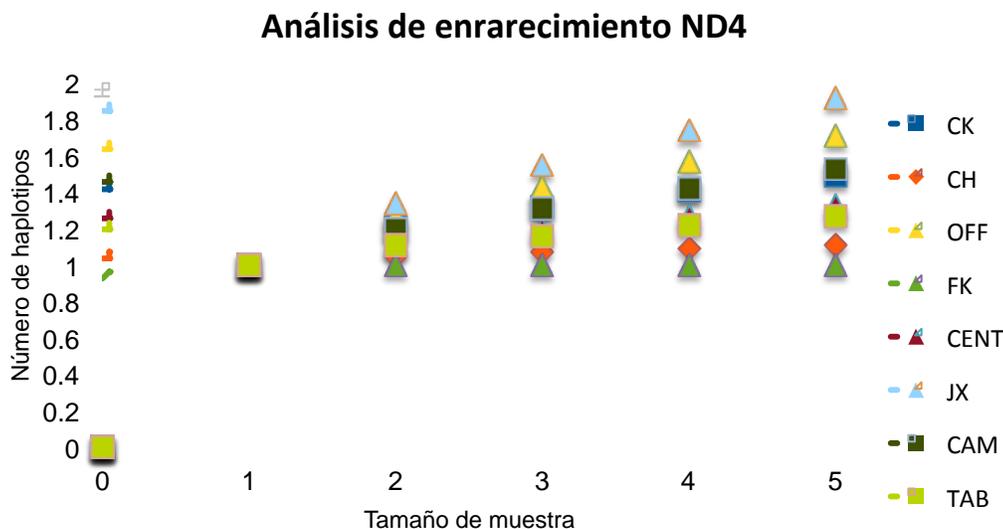
Localidad	n	Hd	$\pi$	H	S
Costas del Golfo de Florida					
CK	42	0.215	0.00026	2	1
CH	42	0.048	0.00006	2	1
OFF	14	0.275	0.00035	3	2
FK	5	0	0	1	0
Costas del Atlántico de Florida					
CENT	15	0.133	0.00016	2	1
JX	48	0.341	0.0005	8	7
Sureste del Golfo de México					
CAM	57	0.201	0.00026	7	6
TAB	37	0.107	0.0002	3	3
Total	260	0.190	0.00026	8	18

**B) Escatel-Luna et al., (2015)**

Localidad	n	Hd	$\pi$	H	S
Costas del Golfo de Florida					
CK	42	0.854	0.0024	17	19
CH	42	0.826	0.0016	13	11
OFF	14	1.000	0.0036	14	15
FK	5	1.000	0.0027	5	6
Costas del Atlántico de Florida					
CENT	25	0.877	0.0020	13	14
JX	48	0.846	0.0019	18	20
Sureste del Golfo de México					
CAM	38	0.963	0.0039	28	27
TAB	37	0.991	0.0043	31	28
Total	251	0.932	0.0032	98	63

Donde ( $n$ ) es el número de individuos, ( $Hd$ ) diversidad haplotípica, ( $\pi$ ) diversidad nucleotídica, ( $H$ ) número de haplotipos y ( $S$ ) número de sitios polimórficos o segregantes.

**Anexo 4.** Gráfica de enrarecimiento de muestras con el marcador ND4, considerando un tamaño máximo muestral de cinco individuos. En colores se indica cada una de las poblaciones.



**Anexo 5.** Estimaciones de diferenciación genética  $\Phi_{ST}$  pareadas de la región A) ND4 y B) región control de *S. tiburo*. En paréntesis se colocó el tamaño muestral de la población.

**A)**

Localidad	CK(42)	CH(42)	OFF(14)	FK(5)	CENT(15)	JX(48)	CAM(57)	TAB(37)
CK(42)	*	0.055	0.110	0.639	0.167	0.002	0.013	0.028
CH(42)	0.081	*	0.158	0.999	0.460	0.122	0.981	0.335
OFF(14)	0.054	0.052	*	0.999	0.733	0.799	0.499	0.406
FK(5)	-0.041	-0.110	-0.098	*	0.999	0.999	0.999	0.999
CENT(15)	0.048	0.026	-0.046	-0.099	*	0.999	0.820	0.640
JX(48)	<b>0.042</b>	0.009	-0.017	-0.101	-0.028	*	0.007	0.194
CAM(57)	<b>0.052</b>	-0.004	0.009	-0.110	-0.010	<b>0.010</b>	*	0.9000
TAB(37)	<b>0.057</b>	0.002	0.014	-0.109	-0.004	0.006	-0.006	*

Estos índices de diferenciación genética se obtuvieron calculando una matriz de distancias con el modelo de Tanura 3 parámetros mediante el programa MEGA 6.06, posteriormente corridas en Arlequin 3.1. Arriba de la diagonal se muestran los valores de significancia estadística  $P$  y por debajo de la diagonal los  $\Phi_{ST}$ . Para cada estimación de  $\Phi_{ST}$ , con negritas se resaltan los valores significativos con una  $P < 0.05$ . Entre paréntesis se señala el número de individuos presentes para cada población.

**B) Escatel-Luna et al., (2015)**

Localidad	CK(42)	CH(42)	OFF(14)	FK(5)	CENT(25)	JX(43)	CAM(38)	TAB(37)
CK(42)	*							
CH(42)	0.021	*						
OFF(14)	<b>0.059</b>	0.046	*					
FK(5)	0.057	0.043	-0.015	*				
CENT(25)	0.079*	0.093*	<b>0.077</b>	<b>0.200</b>	*			
JX(43)	0.059*	0.068*	<b>0.064</b>	<b>0.170</b>	-0.022	*		
CAM(38)	0.151**	0.129**	<b>0.037</b>	-0.048	0.209**	0.217**	*	
TAB(37)	0.140**	0.119**	0.026	-0.045	0.190**	0.201**	-0.009	*

Con negritas se señalan los valores estadísticamente significativos con una  $P < 0.05$ , con \*  $P=0.001$  y \*\*

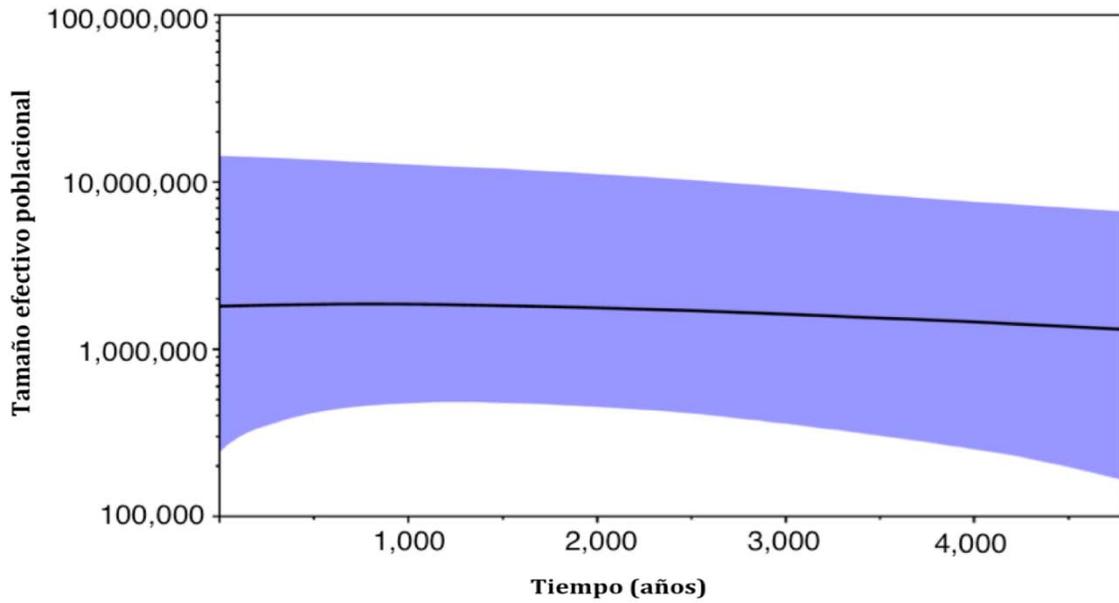
$P= 0.0001$ .

**Anexo 6.** Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) de *S. tiburo* con mtND4 probando criterios geográficos, históricos y biológicos y con asterisco se señalan los valores estadísticamente significativos, con una significancia de  $P < 0.05$ .

<b>Estructura probada</b>	<b>Fuente de variación</b>	<b>Componente de la varianza</b>	<b>Porcentaje de variación</b>	<b>Valor de <math>\Phi</math></b>	<b>Valor P</b>
<i>FLORIDA (E.U.) Y MÉXICO</i>	Entre grupos ( $\Phi_{CT}$ )	0.0002	0.15	0.001	0.428
	Entre poblaciones dentro de grupos ( $\Phi_{SC}$ )	0.0015	1.43	0.014	0.093
	Dentro de las poblaciones ( $\Phi_{ST}$ )	0.1058	98.42	0.016	0.040*
<i>FLORIDA OESTE, FLORIDA ESTE Y MÉXICO</i>	Entre grupos( $\Phi_{CT}$ )	0.0011	1.07	0.011	0.258
	Entre poblaciones dentro de grupos( $\Phi_{SC}$ )	0.0007	0.67	0.007	0.064
	Dentro de las poblaciones( $\Phi_{ST}$ )	0.1058	98.25	0.017	0.040*
<i>FLORIDA NORTE, FLORIDA SUR Y MÉXICO</i>	Entre grupos( $\Phi_{CT}$ )	0.0005	0.46	0.005	0.440
	Entre poblaciones dentro de grupos( $\Phi_{SC}$ )	0.0012	1.14	0.011	0.082
	Dentro de las poblaciones( $\Phi_{ST}$ )	0.1057	98.39	0.016	0.038*

**Anexo 7.** Perfiles Demográficos Bayesianos de la región ND4. La Figura 7A) se realizó considerando la tasa mutacional de 1.21% por millón de años en *S. lewini* de la región control (Nance *et al.*, 2011) y 7B) estimando la tasa mutacional de 2.3% por millón de años en Citocromo B de *S. tiburo* (Martin *et al.*, 1992). La línea negra representa la estimación promedio y el área en morado los intervalos de confianza del 95%.

**A)**



**B)**

