



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

**GENÓMICA POBLACIONAL DEL TIBURÓN TORO (*Carcharhinus leucas*)
EN EL GOLFO Y CARIBE DE MÉXICO.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

Biología marina

PRESENTA:

NADIA SANDOVAL LAURRABAQUIO ALVARADO

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Píndaro Díaz Jaimes

INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM.

COMITÉ TUTOR:

Dr. José Leonardo Castillo Géniz

INSTITUTO NACIONAL DE PESCA Y ACUACULTURA

Dr. Juan Carlos Pérez Jiménez

EL COLEGIO DE LA FRONTERA SUR

Dra. María del Pilar Blanco Parra

INVESTIGADORA POR MEXICO, CONACYT-UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE QUINTANA
ROO

Dra. Nancy C. Saavedra Sotelo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., SEPTIEMBRE, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**GENÓMICA POBLACIONAL DEL TIBURÓN TORO (*Carcharhinus leucas*)
EN EL GOLFO Y CARIBE DE MÉXICO.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

BIOLOGÍA MARINA

PRESENTA:

NADIA SANDOVAL LAURRABAQUIO ALVARADO

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Píndaro Díaz Jaimes

INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

COMITÉ TUTOR:

Dr. José Leonardo Castillo Géniz

INSTITUTO NACIONAL DE PESCA Y ACUACULTURA

Dr. Juan Carlos Pérez Jiménez

EL COLEGIO DE LA FRONTERA SUR

Dra. María del Pilar Blanco Parra

**INVESTIGADORA POR MEXICO, CONACHYT-UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
QUINTANA ROO**

Dra. Nancy C. Saavedra Sotelo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

MÉXICO, CD. MX., SEPTIEMBRE 2023.

Agradecimientos

Al **Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM**, por darme la oportunidad de continuar mi formación profesional en la máxima casa de estudios de México.

A los **apoyos económicos** que hicieron posible realizar este proyecto: beca CONACYT, SEP-CONACYT 253381 y PAPIIT-DGAPA-UNAM IN2081102.

Con estima y admiración, agradezco a mi tutor principal, **Dr. Píndaro Díaz Jaimes**, a quien le debo gran parte de mi formación académica. Gracias por todas sus enseñanzas y apoyo para convertirme en la bióloga que soy.

A mi comité tutorial, **Dr. José Leonardo Castillo Géniz** y **Dr. Juan Carlos Pérez Jiménez**. Gracias por tanto apoyo y comprensión para asesorar este proyecto, siempre estaré agradecida por haber contado con ustedes, los estimo y admiro en demasía.

A mi Jurado de Examen, **Dra. María del Pilar Blanco Parra**, mujer admirable, a quien agradezco haber expandido mis habilidades en el estudio de los tiburones e innumerables enseñanzas, a la **Dra. Nancy Saavedra**, agradezco por sus valiosas sugerencias y tiempo empleado para mejorar mi escrito.

A la **Dra. Cristina Domínguez Mendoza**, **Dra. Silvia Hinojosa Álvarez**, **Dra. Natalia Bayona Vásquez**, **Dra. Camila Mazzoni**, **Dra. Sibelle Torres**, **M. en C. Maximilian Driller**, **Dr. Joan Ferrer Obiol**, **Dr. Adán Fernando Mar Silva**, y **Dr. Julio Rozas** por su asesoría y ayuda en el análisis bioinformático.

Al **Dr. Douglas H. Adams** del Fish and Wildlife Institute, **Dr. Jaime Alvarado** de Texas A&M University y **Dr. Manuel Uribe Alcocer** por su importante colaboración en este proyecto.

A la **M. en C. Laura Margarita Márquez Valdelamar**, su ayuda técnica y amabilidad fueron de gran importancia para culminar el proyecto.

A la **Coordinación de Supercómputo**, DGTIC, UNAM por permitir la realización de análisis bioinformáticos en el sistema Miztli bajo el proyecto LANCAD-UNAM-DGTIC-341(2018). Especialmente a **Silvia Frausto** con quien pude trabajar directamente

Agradecimientos personales

A mi madre **Ana Carolina**, persona a quien más admiro por su entereza, integridad moral y sabiduría. Gracias por todos tus consejos, cuidados, apoyo y cariño, elementos clave que me permiten desarrollar como profesional y persona. Nada sería posible sin ti.

A mis hermanos **Mirelle** y **César**, a mis sobrinas, **Maya**, **Mar** y **Romina**. Gracias porque su existencia y compañía me da la felicidad necesaria para sacar adelante cualquier proyecto.

A mi padre, **Miguel Ángel**, tu gusto por el mar le dio dirección a mi carrera, permitiéndome conocer un mundo lleno de maravillas que tengo la oportunidad de estudiar como bióloga. Gracias también por tu apoyo, y por tu ejemplo de trabajo arduo.

Al resto de mis familiares, **abuelos+**, **abuelas+**, **tías** (casi madres), **tíos**, **primos y primas** (casi hermanos y hermanas), por su motivación, cariño, y apoyo invaluable.

A mis amigos y amigas, compañeros y compañeras de laboratorio y trabajo, por su compañía, cariño, apoyo y consejos recibidos.

¡Gracias, por tanto!

Nadia

Índice general

I. Introducción general	6
II. Antecedentes	8
A. El tiburón toro, <i>Carcharhinus leucas</i> (Müller y Henle, 1839).	
B. Áreas de crianza y filopatría.	
C. Marcadores genéticos y secuenciación de nueva generación (NGS) en estudios de tiburones.	
D. Estudios de movilidad y estructura genética del tiburón toro.	
III. Justificación, hipótesis, preguntas de investigación y objetivos	15
IV. Área de estudio y muestreo general	16
V. Capítulo 1: Genómica poblacional del tiburón toro en el Golfo y Caribe de México	19
VI. Capítulo 2: Filopatría del tiburón toro a áreas de crianza del Golfo y Caribe de México	29
VII. Capítulo 3: Filogeografía del tiburón toro en el Océano Atlántico Occidental evaluado mediante mitogenomas	39
VIII. Capítulo 4 Análisis cualitativo de datos pesqueros publicados sobre tiburón toro en el Golfo y Caribe de México: implicaciones para su manejo y conservación	49
IX. Discusión general	58
X. Conclusiones	64
XI. Literatura citada	65

I. Introducción general

El tiburón toro (*Carcharhinus leucas*) es una especie costera, cuya distribución global incluye los océanos Atlántico, Pacífico e Índico. En el Atlántico Occidental (AOcc) se distribuye desde Estados Unidos hasta Brasil (Compagno, 1984). Este litoral es importante para la especie debido a que se han reportado áreas de crianza (AC), potenciales y confirmadas (Bonfil, 1997; Froeschke et al., 2010; Curtis et al., 2011; Tavares y Sánchez, 2012; Gausmann, 2021; Blanco-Parra et al., 2022) hacia las cuales la especie suele presentar un comportamiento filopátrico, es decir, regresar en cada evento de alumbramiento (Karl et al., 2011; Tillett et al., 2012), lo que puede poner en riesgo a las poblaciones de *C. leucas* debido al impacto de las actividades antropocéntricas que se desarrollan en la zona costera, como la explotación pesquera de diversos países (Froeschke et al., 2010; Carlson et al., 2012; Tavares y Sánchez, 2012).

La pesca y destrucción ecosistémica en la región (Ward-Paige et al., 2010), entre otros factores como el bajo potencial reproductivo de la especie (Castillo-Géniz, 2001), suponen un riesgo para sus poblaciones (Martínez-Candelas et al. 2019), pudiendo tener como consecuencia disminuciones localizadas, ya reportadas en estuarios de Estados Unidos (O'Connell et al., 2007) y en el sureste del Golfo de México (Pérez-Jiménez et al., 2012).

En la costa del AOcc es considerada la existencia de una población panmíctica para *C. leucas*, sin embargo, estudios genéticos han señalado la existencia de diferentes linajes al norte y sur de este litoral (Karl et al., 2011), y ningún dato de marcaje ha mostrado que la especie recorra distancias largas, por ejemplo, entre Norteamérica, Centroamérica y Sudamérica (Carlson et al., 2010; Brunnschweiler et al., 2010; Kohler y Turner, 2018), lo que señala la posible existencia de diferentes poblaciones en el AOcc. No obstante, son necesarios estudios más detallados sobre su biología, pesquería y genética para determinarlo.

La evaluación de la estructura genética en poblaciones naturales nos proporciona información acerca de procesos evolutivos, e información indirecta de la dinámica poblacional y reproductiva de una especie (Hellberg et al., 2002; Vignaud et al., 2014). En tiburones aún es escasa la literatura en que se relacionan los datos genéticos con el manejo pesquero, aunque empieza a tomar importancia (Domingues et al., 2018). Por ejemplo, para el caso del tiburón cabeza de pala (*Sphyrna tiburo*) diversos estudios han señalado que la existencia de diferentes poblaciones a lo

largo de la distribución de esta especie debe relacionarse con su división en *stocks* pesqueros (Portnoy et al., 2015; Ashe et al., 2015; Escatel-Luna et al., 2015; González et al., 2019; Díaz-Jaimes et al., 2021).

Las denominadas técnicas de Secuenciación de Nueva Generación (NGS, por sus siglas en inglés), se han desarrollado para ampliar la posibilidad de generar un mayor número de marcadores genéticos a un costo reducido (Peterson et al., 2012). De esta forma, es posible resolver de una manera más eficiente y precisa la estructura de especies (Momigliano et al., 2017). Sin embargo, pueden lograrse mejores resultados utilizando diferentes marcadores moleculares, tanto NGS como tradicionales en un mismo análisis genético, por ejemplo, regiones mitocondriales, polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs por sus siglas en inglés) y microsatélites, dependiendo del objetivo del estudio.

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la estructura genética del tiburón toro en cuatro regiones del AOCC (Atlántico Noroccidental, Golfo de México Norte, Golfo de México Sur, y Caribe de México) mediante la utilización de marcadores NGS, SNPs y mitogenomas, y marcadores tradicionales, región control del ADN mitocondrial, mtDNA CR y microsatélites. Adicionalmente, se realizó una revisión bibliográfica sobre los datos pesqueros del tiburón toro publicados en la parte mexicana del área de estudio. Lo que en conjunto ayuda a dilucidar la estructuración genética de la especie en la zona de estudio, y cómo esta información podría utilizarse en la elaboración de mejores propuestas de conservación.

El documento se encuentra dividido en cuatro capítulos, en el primero, se presenta el patrón de genómica poblacional obtenido del análisis de SNPs entre algunas localidades dentro de nuestra área de estudio total. Los resultados señalan la existencia de una población genéticamente homogénea desde Estados Unidos hasta Isla Mujeres, lo que es congruente con la nula existencia de barreras al flujo genético para la especie en esta zona, datos de marcaje y estudios genéticos previos (Karl et al., 2011; Kohler y Turner, 2018).

El segundo capítulo está conformado con los resultados del patrón de genética poblacional entre individuos inmaduros procedentes de áreas de crianza de Florida (Este y Oeste), Texas y Louisiana; utilizando marcadores moleculares tradicionales (mtDNA CR y microsatélites). Los

resultados mostraron que la filopatría es un mecanismo importante para la delimitación de linajes matrilineales entre el Atlántico de Florida, y el Golfo de México Norte.

En el tercer capítulo se presenta el patrón poblacional del genoma mitocondrial completo de individuos inmaduros del Atlántico de Florida y Golfo de México Norte, Golfo de México Sur y Caribe de México, así como secuencias de la región control del ADNmt previamente publicadas de Brasil (Karl et al., 2011). El principal resultado es la posible existencia de tres linajes divergentes en el AOCC, correspondientes al Norte, Centro y Sur de América.

En el cuarto capítulo se presenta una revisión de datos pesqueros del Golfo de México Sur y Caribe de México, lo que permitió sintetizar y organizar la información en diferentes temáticas: Ubicación y abundancia relativa, temporalidad, datos reproductivos y composición de edades. El análisis de los datos resalta la importancia pesquera de la especie, así como los sitios y temporadas en que se lleva a cabo esta práctica.

II. Antecedentes

A. El tiburón toro *Carcharhinus leucas* (Müller y Henle, 1839).

El tiburón toro o chato es una especie del género *Carcharhinus* que se distingue por presentar un morro corto ancho y redondeado; ojos circulares y pequeños. Es de color gris en la parte dorsal y blanco en la ventral. No presenta pliegue interdorsal (Compagno, 1984; Castro, 2011).

Su distribución global incluye los océanos Atlántico, Pacífico e Índico. En la región del AOCC se distribuye desde Massachusetts al sur de Brasil, incluyendo el Golfo de México, mar Caribe y Bahamas (Compagno, 1984). Además, su distribución se extiende a cuerpos de agua dulceacuícolas como ríos y zonas estuarinas (Compagno, 1984; Castro, 2011; Gausmann, 2021).

El tiburón toro es una especie vivípara placentaria, cuyo periodo de gestación se ha estimado alrededor de un año (Castillo-Géniz, 2001; Castro et al., 2011; Pirog et al., 2019_b), suele dar a luz entre 7 y 12 crías (Castro 2011), sin embargo, se han reportado hembras desarrollando de uno hasta 22 embriones (Castillo-Géniz, 2001). Tiene un ciclo reproductivo bienal y su talla de madurez sexual es calculada para los machos entre 180 y 220 cm de longitud total y 230 cm en hembras (Castillo-Géniz, 2001; Castro, 2011), aunque hay estudios que muestran que las

poblaciones del Caribe pueden tener una talla de primera madurez sexual menor (170-175 cm; Castro, 2011; Pirog et al., 2019_b). Algunas características reproductivas como el número de crías, fecha de alumbramiento y edad de primera madurez sexual pueden variar en el tiburón toro entre diversas localidades (Pirog et al., 2019_b).

B. Áreas de crianza y filopatría

Una característica relevante en el ciclo biológico de algunos tiburones es el uso de áreas de crianza (AC), éstas se han definido como sitios que brindan refugio contra depredadores y alimento a organismos neonatos y juveniles de tiburones costeros. Dependiendo la especie, éstos pueden usar las AC por un determinado periodo de tiempo que va desde algunos meses hasta años (Castro, 1993). La filopatría es un concepto estrechamente relacionado con el uso de áreas de crianza, ya que las hembras de muchas especies suelen regresar tras cada evento reproductivo a zonas específicas para el alumbramiento de sus crías (Hueter et al., 2005; Chapman et al., 2015). De acuerdo con la utilización de las AC, la filopatría se puede dividir en natal si las hembras regresan al sitio exacto donde nacieron para tener a sus crías (Chapman et al., 2015) como se ha demostrado para en el tiburón limón *Negaprion brevirostris* (Feldheim et al., 2014) y en filopatría regional cuando las hembras regresan a la región de nacimiento, aunque no sea el sitio exacto donde nacieron (Chapman et al., 2015). En el caso de los tiburones, la filopatría tanto regional como natal debe ser considerada para su conservación, ya que la permanencia de estas especies depende en gran medida del estado de conservación de estos sitios.

Los datos genéticos son útiles para determinar filopatría, debido a la diferenciación genética que puede existir entre A.C. (Hueter et al., 2005). Principalmente las regiones del ADNmt suelen ser de utilidad, ya que al ser un marcador de herencia puramente materna permite rastrear la geografía de manera lineal en uno de los sexos; mientras que los marcadores biparentales, como el ADN nuclear (ADNn), permiten rastrear el patrón genético de ambos sexos (Hueter et al., 2005; Dudgeon et al., 2012; Chapman et al., 2015). Otras aproximaciones con datos genéticos para la evaluación de filopatría son el análisis de parentesco y la reconstrucción de genotipos parentales, los cuales se evalúan en muestras de diferentes generaciones (Dudgeon et al., 2012; Feldheim et al., 2014).

Particularmente para el tiburón toro, las AC son sitios de importancia para la supervivencia de crías y juveniles (Heupel et al., 2007), quienes suelen permanecer en las AC entre sus primeros 4 y 9 años de vida (Thorburn y Rowland, 2008; Curtis et al., 2011).

Numerosas AC han sido propuestas para el tiburón toro en el AOcc, entre las que resaltan Indian River Lagoon, Texas, Louisiana y Charlotte Harbor (Hueter et al., 1994; O'Connell et al., 2007; Froeschke et al., 2010; Curtis et al., 2011; Froeschke et al., 2012; Roskar et al., 2020). En el caso de México, algunos reportes han señalado la existencia de estas zonas tanto en las costas de Golfo de México como en el Caribe con base en reportes de la captura de neonatos y juveniles de la especie en estuarios y ríos, así como de algunas observaciones de campo donde se ha visto a hembras entrar a estos sitios para tener a sus crías (Marín, 1992).

Entre las zonas que potencialmente funcionan con AC para el tiburón toro en el Golfo de México, se encuentran la Laguna de Tamiahua (Montiel, 1988 en Hoyos-Padilla, 2001) y Alvarado (Marín, 1992) en Veracruz, así como la Laguna de Términos (Uribe, 1993 en Hoyos-Padilla, 2001) en Campeche, mientras que para la zona del Caribe resaltan la Laguna de Yalahau (Bonfil, 1997; Hoyos-Padilla, 2001) y Chetumal (Applegate, 1984 en Hoyos-Padilla, 2001; Bonfil, 1997; Blanco-Parra et al., 2022). Hay reportes de la captura de hembras preñadas en el Golfo y Caribe (Castillo-Géniz, 2001; Pérez-Jiménez et al., 2015), sin embargo, en la mayoría de estos sitios no se ha determinado si aún funcionan como áreas de crianza, o si pueden ser considerados como tal de acuerdo con los criterios propuestos por Heupel et al., (2007), esto ha sido sólo evaluado y confirmado recientemente para la Bahía de Chetumal (Blanco-Parra et al., 2022), lo que es importante de considerar al ser estas zonas sitios costeros con una alta posibilidad de degradación ambiental y donde la especie tiende a ser capturada.

C. Marcadores genéticos y secuenciación de nueva generación (NGS) en estudios de tiburones.

El ADN de los animales se organiza dentro de las células en dos organelos: mitocondrias y núcleo. Ambos genomas difieren en gran medida en tamaño y estructura, además de estar constituidos por regiones genéticas con características diversas, como lo son la variedad de regiones, el tamaño y tasa mutacional.

El ADNmt de las células animales puede ser descrito de forma general como una molécula circular de 14 a 22 kb conformada por genes que codifican la síntesis de 13 polipéptidos, 25 ARNs de transferencia (este número varía entre especies), 2 ARN ribosomales y una región no codificante denominada Región Control (Kolesnikov y Gerasimov, 2012). El genoma nuclear por otra parte está organizado en cromosomas, su tamaño y complejidad varía de forma considerable entre especies (Elliott y Gregory, 2015); por ejemplo, en los humanos es de aproximadamente 3.3 Gb, mientras que el del ajolote (*Ambystoma mexicanum*) es diez veces mayor (Keinath et al., 2015). Debido al tamaño de los genomas, tanto el mitocondrial como el nuclear, su secuenciación completa ha sido limitada a algunas especies.

Hasta el momento se han secuenciado pocos genomas nucleares completos en condriictios, tal es el caso del tiburón blanco, *Carcharodon carcharias* (Marra et al., 2019), el tiburón ballena, *Rhincodon typus* (Read et al., 2017), el tiburón bamboo estriado (*Chiloscyllium punctatum*, Hara et al., 2018), el tiburón gato nublado (*Scyliorhinus torazame*, Hara et al., 2018) y la quimera denominada pez elefante, *Callorhinchus mili* (Venkatesh et al., 2014). Por su parte, han sido numerosos los casos de genomas mitocondriales (mitogenomas) que han sido, y siguen siendo publicados (Alam et al., 2014; Díaz-Jaimes et al., 2016; Galván-Tirado et al., 2016; Fitzpatrick et al., 2017; Gorman et al., 2019).

Una alternativa al uso completo de genomas, la constituye el uso de marcadores genéticos, o regiones del genoma de las cuales se ha caracterizado su abundancia y tasa mutacional, entre otras características; pueden clasificarse como mitocondriales y nucleares dependiendo de su origen, difiriendo en gran medida en cuanto a la información que proveen, pero también en sus aplicaciones prácticas y resolución de preguntas evolutivas, biológicas y ecológicas. Por ejemplo, los marcadores mitocondriales son ampliamente usados en estudios filogeográficos y filogenéticos, dadas sus características como la herencia puramente materna, no recombinación y presencia de genes ortólogos (Saccone et al., 1999), mientras que los microsátélites en el ADNn fueron considerados por mucho tiempo el marcador ideal para estudios de ecología molecular, debido principalmente a su alto polimorfismo (Selkoe y Toonen 2006). Estos han sido ampliamente utilizados en estudios de paternidad múltiple, parentesco, filopatria y estructura genética en elasmobranquios (Dudgeon et al., 2012)

La utilización de marcadores genéticos ha contribuido en el conocimiento de la historia evolutiva, biología y ecología de tiburones. Entre algunas de sus aplicaciones se encuentran el reconocimiento de especies dentro de la pesca legal e ilegal (Holmes et al., 2009; Sembiring et al., 2015), identificación de estrategias reproductivas (Portnoy y Heist, 2012; Portnoy et al., 2007 y 2015), y la determinación de su estructura genético-poblacional (Pirog et al., 2019 a y b).

Actualmente, las técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS), también conocida como secuenciación masiva, hacen uso de protocolos destinados a secuenciar masivamente y a gran escala, cualquier ácido nucleico (ADN y ARN) (Behjati y Tarpey, 2013). Estas metodologías permiten incrementar el número de pares de bases (pb) analizadas en diferentes especies, lo que brinda información valiosa acerca de diferentes aspectos biológicos y evolutivos de las especies.

Dentro de las tecnologías NGS, se encuentra la secuenciación asociada a sitios de restricción (RADseq, por sus siglas en inglés), que se basa en el uso de enzimas de restricción para fragmentar el ADN (Peterson et al., 2012). Este tipo de procedimiento fue diseñado para poder encontrar dentro del genoma, de cientos a miles de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, por sus siglas en inglés), lo que supone una mejor representatividad del genoma para estudios evolutivos y ecológicos (Andrews y Luikart, 2014). Los SNPs son relativamente abundantes en el genoma (de 1 a 2 cada 1000 pb) y pueden detectar variación neutral y adaptativa, y se han convertido en el principal marcador genético usado en estudios de ecología molecular.

En tiburones se ha reportado un incremento importante en el uso de SNPs para estudios poblacionales. Por ejemplo, mediante 1,873 SNPs se investigó la hibridación de dos especies de tiburones en el Pacífico oriental (*C. galapaguensis* y *C. obscurus*; Pazmiño et al., 2019). En la pintarroja (*Scyliorhinus canicula*) se ha reportado, mediante el uso de 2,674 SNPs, una estructura genética en el Atlántico noreste que no había sido posible discernir mediante marcadores tradicionales (Manuzzi et al., 2019). De manera similar, fueron utilizados 3,766 y 8,866 marcadores para evaluar la estructura genética en *C. brachyurus* y *C. obscurus* respectivamente, resultando en ambos casos una alta conectividad entre las regiones estudiadas (Junge et al., 2019). El aumentar la cobertura del genoma a través del incremento en el número de marcadores ha permitido también detectar regiones bajo selección (Momigliano et al., 2017; Junge et al., 2019).

D. Estudios de movilidad y estructura genética en el tiburón toro en el Golfo de México y Caribe.

El tiburón toro (*C. leucas*) ha formado parte del programa de marcaje realizado por la National Marine Fisheries Service (NMFS) de 1962 al 2013. Durante este periodo, se han capturado 2,129 individuos en el Golfo de México y Caribe, y se han recapturado 36 organismos (tasa de recaptura=1.7%). La distancia máxima reportada fue de 628 M (millas náuticas), para un espécimen cuyo movimiento migratorio se presentó desde Texas hasta Veracruz, otros seis tiburones se movieron desde Estados Unidos a aguas mexicanas en el Golfo de México, mientras que movimientos hacia el Caribe, se presentaron solamente entre Florida, Cuba y Bahamas (Kohler y Turner, 2018), figura 1. En cuanto al marcaje satelital, existen estudios que han señalado alta fidelidad y residencia de la especie hacia zonas costeras, pero ningún movimiento realizado hacia el Sur de Estados Unidos (Carlson et al., 2010; Brunnschweiler et al., 2010).

La poca movilidad registrada para la especie tanto latitudinal y longitudinal, como dentro de sus áreas de crianza, es congruente con la divergencia genética reportada entre localidades. Lo anterior ha sido respaldado por la fuerte divergencia entre secuencias de ADNmt de individuos de tiburón toro procedentes de Florida y Brasil (Karl et al., 2011), áreas de crianza en Australia (Tillett et al., 2012) y entre cuencas oceánicas (Pirog et al., 2019_b).

En la costa del AOCC se ha determinado la existencia de dos linajes mitocondriales, correspondientes al Norte y Sur de América (Karl et al., 2011), sin embargo, la diferenciación fue nula al analizar microsatélites nucleares. Los límites de estas poblaciones potenciales, y la distribución de la variabilidad genética en zonas intermedias, donde se ha reportado la presencia de la especie, y posible existencia de áreas de crianza no ha sido estudiada.

El origen y distribución de la variabilidad genética en las poblaciones es multifactorial, se debe considerar cómo las diferentes fuerzas evolutivas (mutaciones, selección, deriva genética, etc.) influyen en esto, al mismo tiempo de tomar en cuenta la biología y ecología de la especie, así como los diversos procesos geológicos y geográficos que intervienen en el origen de variabilidad, y en los movimientos migratorios que moldean esta distribución de la variabilidad. Es altamente recomendable estudiar la estructura genético-poblacional utilizando diversos marcadores

moleculares, diversas localidades de muestreo, y otras consideraciones, dependiendo de la especie estudiada.

En el caso del tiburón toro, es importante recalcar que tanto su alta residencia a zonas costeras como la filopatría de las hembras a áreas de crianza, influye en su estructuración genética a diferentes escalas geográficas (Karl et al., 2011; Tillett et al., 2012; Pirog et al., 2019_b). Lo que nos permite suponer que la variación genética en la zona de estudio estará relacionada principalmente con estos factores, por lo que una mayor estructuración se espera entre áreas lejanas (por ejemplo entre las diferentes provincias), tanto en genes nucleares como mitocondriales, debido al poco intercambio genético tanto de machos como de hembras, mientras que un menor grado de divergencia, por la filopatría de las hembras, se espera entre algunas áreas de crianza, principalmente con marcadores mitocondriales, debido a su herencia puramente materna, de la misma forma que se ha reportado en otros tiburones (Hueter et al, 2005; Keeney et al., 2005). Esta información aportará elementos para ser considerados en los planes de manejo y conservación de la especie.

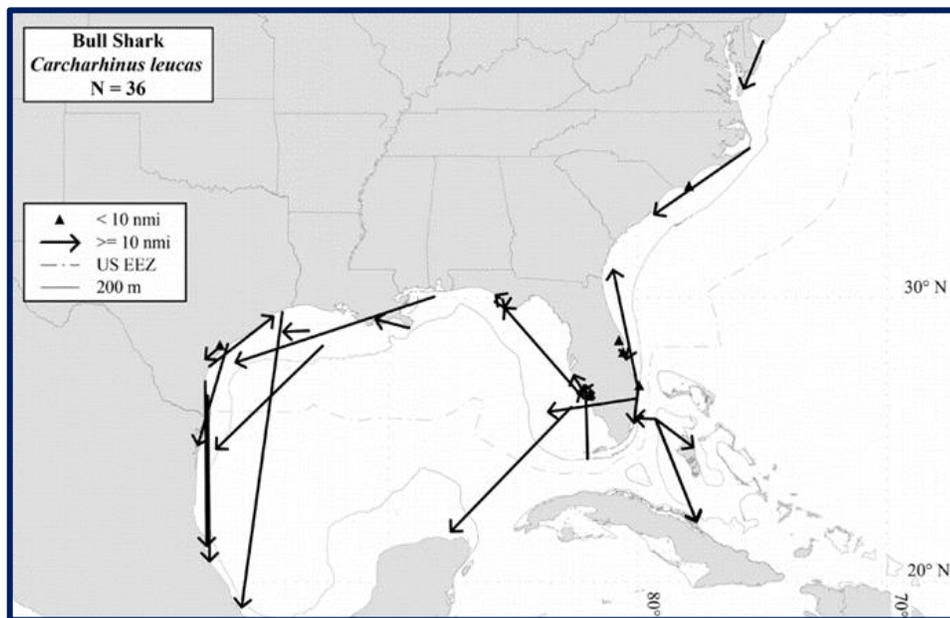


Figura 1. Mapa señalando la trayectoria de 36 individuos de tiburón toro en el Golfo de México y Caribe, mediante el análisis de captura (base de la flecha) y recaptura (punta de la flecha) realizado de 1962 al 2013 (Kohler y Turner, 2018).

III. Justificación

Los resultados de estructuración genética y filopatría del tiburón toro obtenidos en esta investigación, así como la revisión bibliográfica sobre pesquería en el Golfo de México y Caribe ayudará en el planteamiento de propuestas de manejo para la especie, ya que aportarán información científica útil para conocer mejor la biología, ecología y estructuración genética de la especie en el Golfo de México y Caribe.

Hipótesis

Los individuos de tiburón toro presentan algún grado de divergencia genética entre localidades del Golfo de México y Caribe, dada la filopatría de las hembras hacia AC y residencia de la especie en zonas costeras.

Preguntas de investigación

¿Existe divergencia genética para el tiburón toro en el Caribe y Golfo de México?

¿Qué factores explican el patrón de estructura genética encontrado?

¿Cómo pueden contribuir los resultados obtenidos en la mejora de las políticas de conservación de la especie?

Objetivo general

Evaluar la estructura genético-poblacional del tiburón toro en cuatro regiones del Atlántico Occidental (Atlántico Noroccidental, Golfo de México Norte, Golfo de México Sur, y Caribe de México) con base en información del ADN mitocondrial y nuclear, analizar los posibles factores que explican el patrón de estructura genética encontrado, así como relacionar los resultados obtenidos con el manejo pesquero de la especie en la zona mexicana de estudio para elaborar propuestas de conservación.

Objetivos particulares

- Estimar la diversidad genética en cada una de las localidades de estudio, mediante la utilización de marcadores genéticos tradicionales (mtDNA CR y microsatélites) y NGS (SNPs y mitogenomas).
- Determinar el nivel de divergencia genética entre localidades para cada tipo de marcador.
- Analizar los factores que explican el grado de la divergencia genética entre localidades.
- Recopilar, sintetizar y analizar la información de datos pesqueros en el Golfo de México Sur y Caribe de México para que junto con la información genética obtenida se elaboren propuestas de conservación.

IV. Área de estudio y muestreo general

El área de estudio del presente proyecto se ubica en la zona tropical y subtropical del Atlántico Occidental. Es resaltable que la principal región biogeográfica presente en esta área es la del Gran Caribe, la cual de acuerdo con Robertson y Cramer (2014) se divide en tres provincias: 1) Una provincia subtropical al norte que abarca todo el Golfo de México, Florida y el Sureste de Estados Unidos, 2) Una provincia tropical, central que comprende Centroamérica, Bermudas y las Indias Occidentales, y 3) una tercera provincia al sur, comprendiendo la parte norte de Brasil. Estas provincias presentan, entre otras, variaciones en la temperatura del agua y diferente composición de hábitats (arrecifes de coral, manglares, tipo de fondo).

También se ha propuesto la división del Atlántico Norte en ecorregiones (Wilkinson et al., 2009), nuestro muestreo abarca cuatro de ellas: Sur de Florida (ATL), Golfo de México Norte (GMN), Golfo de México Sur (GMS) y el Mar Caribe (CAR), además de la localidad de Chetumal (Che) que de acuerdo con los autores ya no se considera parte del Atlántico Norte, pero que se encuentra ubicada en el Caribe Nororiental, en el sureste de México.

Las localidades mencionadas, así como las posibles AC que son parte de nuestro muestreo son indicadas en la figura 2. En total se recolectaron 320 muestras de tejido de individuos adultos y juveniles, sin embargo, el número de organismos analizados varía dependiendo del marcador genético utilizado (mitogenoma, SNPs, microsatélites, etc.) lo que puede consultarse en el apartado correspondiente a la utilización de cada marcador. Algunas de las áreas estudiadas se encuentran

conformadas por diversas localidades, años de muestreo y temporadas, por lo que una lista detallada de las características de los individuos muestreados se puede observar en la tabla 1.

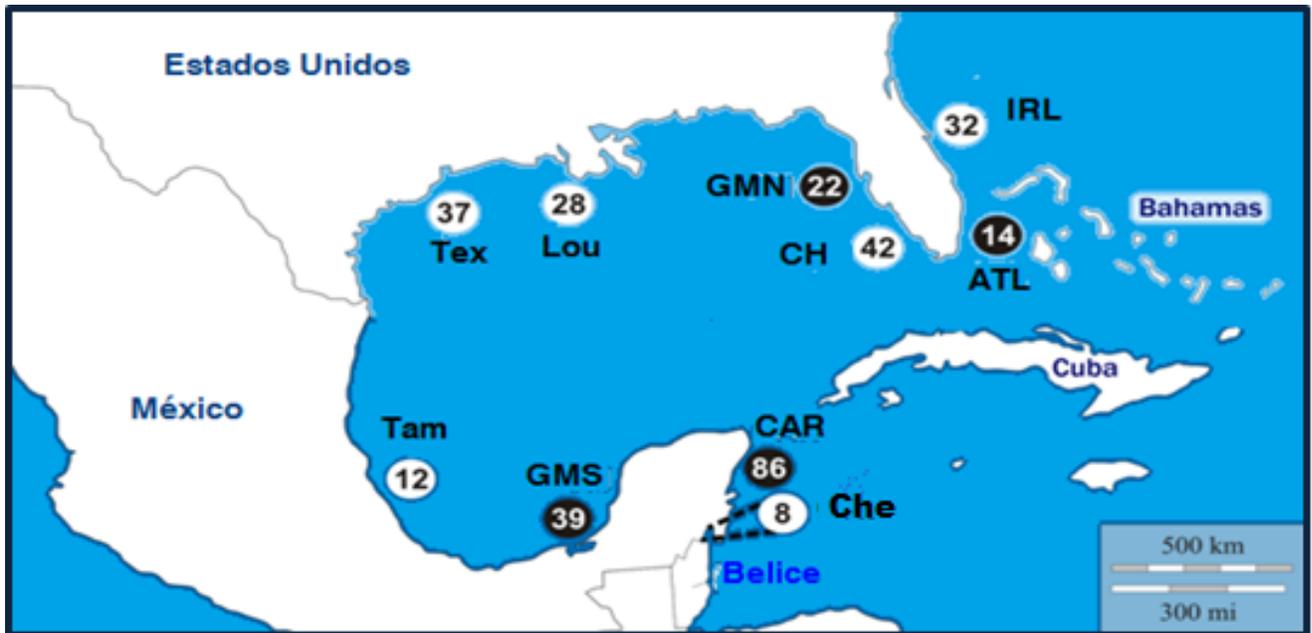


Figura 2. Mapa de localidades muestreadas de *C. leucas*. Se coloca en círculos con fondo blanco el número de muestras de individuos inmaduros (≤ 190 cm de LT) y en círculos con fondo negro el número de muestras de adultos (> 190 cm de LT), procedentes de diversas localidades del AOCC: Texas (Tex), Louisiana (Lou), Charlotte Harbor (CH), Golfo de México Norte (GMN), Indian River Lagoon (IRL), Atlántico de Florida (ATL), Tamiahua (Tam), Golfo de México Sur (GMS), Caribe de México (CAR) y la Bahía de Chetumal (Che).

Tabla 1. Lista de sitios de colecta. Se indica el tamaño de muestra (n), localidad de muestreo, región de acuerdo con Wilkinson et al., 2009: Golfo de México Norte (GMN), Atlántico de Florida (ATL), Caribe (WCAR), (CAR), el grupo asignado con el que las muestras serán reconocidas en el presente texto, la longitud total (LT) en cm de los organismos capturados, la temporada y años de su recolecta.

Localidad	n	Región	Grupo asignado	Longitud total en cm	Temporada	Años de muestreo
Inmaduros (≤ 190 cm)						
Texas	37	GMN	Tex	<190		2011, 2013- 2016
Louisiana	28	GMN	Lou	<190		2011 y 2016
Charlotte Harbor	42	GMN	CH	<190		2003, 2010, 2011
Indian River Lagoon	32	ATL	IRL	<140		1994, 1996, 1997, 1999, 2002, 2004, 2005, 2007, 2008, 2009, 2012 y 2013.
Chetumal	8	WCAR	Che	<100	Verano	2013, 2017, 2018
Tamiahua	11	GMS	Tam	<190	Verano	2015
Adultos (>190 cm de LT)						
Isla Mujeres	31	CAR	CAR	>200 cm	Invierno	2011, 2012, 2017
Campeche	39	GMS	GMS	> 200 cm	Invierno	2011

V. Capítulo 1

Genómica poblacional del tiburón toro en el Golfo y Caribe de México Introducción

La estructura genética dentro de las poblaciones naturales nos proporciona información útil acerca de procesos evolutivos, y también información indirecta sobre la dinámica poblacional y reproductiva de una especie (Hellberg et al., 2002). En este tipo de evaluación debe considerarse, entre otros factores, el número y tipo de marcadores moleculares, así como las características y limitaciones inherentes al marcador empleado (por ejemplo, la homoplasia en los microsatélites). No obstante, el costo asociado a la amplificación de un número adecuado de marcadores e individuos, la dificultad en el análisis bioinformático al no contar con genomas de referencia, entre otros factores, minimiza las posibilidades de elección, principalmente al estudiar especies *no modelo*, es decir aquellas en las que no existe abundante información genética previa, incluyendo un genoma de referencia.

Dentro de las técnicas basadas en NGS, la técnica de RADseq permite la generación de cientos a miles de marcadores genéticos mediante el uso de enzimas de restricción para fragmentar el ADN (Andrews et al., 2016). Es una de las principales metodologías utilizadas para la ubicación y genotipificación de SNPs, marcador preferencial en estudios ecológicos y evolutivos en este tipo especies, gracias a su amplia distribución en el genoma, y costos accesibles (Morin et al., 2004; Peterson et al., 2012; Andrews et al., 2016). Además, pueden detectar variación neutral y adaptativa.

Diversos estudios han empezado a utilizar este tipo de marcadores (SNPs) en tiburones (Pazmiño et al., 2019; Manuzzi et al., 2019). En *C. leucas* existe un estudio, que muestra la posible divergencia genética entre individuos de zonas insulares y oceánicas del océano Pacífico (Glaus et al., 2020). La mayoría de los estudios genéticos para esta especie han utilizado marcadores convencionales (ADNmt y microsatélites; Karl et al., 2011; Junge et al., 2019), lo que pudiera sesgar los resultados por factores como baja representatividad del genoma al analizar pocos marcadores, así como por las características del marcador empleado (herencia puramente materna, poca variabilidad genética en el caso de los marcadores mitocondriales, y homoplasia en el caso de los microsatélites nucleares).

Este apartado corresponde al desarrollo de parte del objetivo principal del proyecto y en éste se aborda la evaluación de homogeneidad genética entre individuos adultos de localidades del Golfo de México (Norte y Sur), Atlántico de Florida y Caribe Norte, y de individuos inmaduros procedentes de dos AC: Charlotte Harbor (CH) e Indian River Lagoon (IRL), mediante la utilización de SNPs.

Este es el primer estudio con marcadores SNPs empleados en la especie para el AOCC, y dicha evaluación se complementa con los datos obtenidos mediante microsátélites en un trabajo previo (Sandoval-Laurrabaquio, 2015). Lo que es congruente con los datos de marcaje que señalan movilidad de la especie entre algunas de las zonas estudiadas (Golfo de México Norte y Sur, particularmente Texas y Veracruz) y a las pocas barreras que en la zona pudieran limitar el flujo genético entre poblaciones de esta especie de tiburón.

Método

Para el análisis de RADseq fueron procesadas 120 muestras de seis localidades, cuatro de adultos: Golfo de México Sur (GMS) correspondiente a muestras del estado de Campeche, Caribe (CAR) correspondiente a muestras de Isla Mujeres en el estado de Quintana Roo, Golfo de México Norte (GMN), correspondientes a la parte oeste de Florida y Atlántico de Florida (ATL), así como de dos individuos inmaduros procedentes de dos AC: Charlotte Harbor (CH) e Indian River Lagoon (IRL), figura 1.1.



Figura 1.1 Mapa de localidades muestreadas. el número de muestra de tiburón toro por localidad que fueron amplificadas para el análisis de SNPs. Círculos con fondo blanco indican el número de muestras de individuos inmaduros (≤ 190 cm de LT) y en círculos con fondo negro el número de muestras de adultos (> 190 cm de LT), procedentes de diversas localidades: Charlotte Harbor (CH), Golfo de México Norte (GMN), Indian River Lagoon (IRL), Atlántico de Florida (ATL), Golfo de México Sur (GMS), y el Caribe de México (CAR).

La extracción de ADN fue realizada mediante la técnica de fenol-Cloroformo (Sambrook et al., 1989). Para determinar la calidad de las muestras se realizó una visualización en geles de agarosa al 1.5 %.

La elaboración de librerías genómicas constó de tres pasos: 1) Digestión de las muestras, es decir fragmentación del ADN mediante enzimas de restricción (XbaI, EcoR1 y Nhe1-HF); 2) Ligación, agregar adaptadores y *barcodes* para identificar a cada individuo y 3) PCR; además de tres limpiezas con perlas magnéticas. Fue utilizada una técnica conocida como 3RAD, debido a que en la misma se utilizan tres enzimas de corte para la fragmentación de ADN durante la digestión, siendo una modificación al protocolo de Paterson et al., 2012, siguiendo lo propuesto por Bayona-Vásquez et al., 2019. Las enzimas utilizadas fueron elegidas con base en pruebas de diferentes combinaciones de enzimas.

El producto obtenido del PCR fue visualizado en geles de agarosa al 1.5 %, purificado y normalizado a una concentración de 20 ng/ul para su posterior secuenciación utilizando la plataforma Illumina en un secuenciador *NexSeq500 300 cycle it*. Las secuencias obtenidas en esta plataforma fueron fragmentos pareados (*paired-end reads*) de 140 pb.

Análisis de datos

La calidad de las secuencias fue determinada y visualizada con fastqc v.0.11.5 (Andrews et al., 2010), posteriormente fueron analizadas mediante el programa de cómputo *Stacks* (Catchen et al., 2013). Este programa, en primer lugar, permite limpiar y filtrar las secuencias obtenidas, para después crear un catálogo de *loci*, los que servirán para formar los *genotipos* de cada individuo, y poder así buscar variantes genéticas para análisis filogeográficos, mapeo del genoma y genético-poblacionales.

Debido a que *C. leucas* es una especie “no-modelo”, haciendo alusión a que, a la fecha, no se cuenta con un genoma de referencia para el ensamble de sus secuencias, se siguió el procedimiento sugerido por Rochette y Catchen (2017) para secuencias tipo RADseq en su ensamble *de novo* con el programa bioinformático *Stacks* (Catchen et al., 2013).

El primer paso fue descartar aquellas secuencias con menos del 90 % de probabilidad de ser correctas basándose en su *Phred score*. Todo esto mediante *process_radtags*, posteriormente fue utilizado *denovo_map.pl* con el cual se procedió a ensamblar los *loci* sin un genoma de referencia.

La construcción de *loci* en *Stacks* depende en primera instancia de tres parámetros bioinformáticos: número de lecturas de una misma secuencia para formar un alelo putativo (m), el número de *mismatches* permitido entre los alelos putativos para formar *loci* putativos (M), el número de *mismatches* permitido entre *loci* putativos para formar el catálogo (n). Fueron realizados corrimientos con diferentes combinaciones de estos parámetros, después de lo cual fue verificado el número de *loci*, y SNPs obtenidos para seleccionar los adecuados en un análisis final.

Para el ensamblaje *de novo*, de acuerdo con el protocolo propuesto por Rochette y Catchen en 2017, se probaron diversos parámetros y se tomó en cuenta el número de *loci* polimórficos presentes en el 80 por ciento de los individuos.

Además, fueron probados diversos valores para dos parámetros en el análisis de *populations.pl*: porcentaje de individuos que debe presentar un *locus determinado* para ser considerado en los análisis estadísticos (parámetro *r*) y el número mínimo de poblaciones en que debe estar presente un *locus* para ser considerado (parámetro *p*). Fue utilizado un mapa de poblaciones, para indicar la localidad a la que pertenecían los individuos analizados: Caribe (CAR, muestras de adultos de Isla Mujeres), Golfo de México Norte (GMN, muestras de adultos del Golfo de México cercanos a la costa de Florida), Atlántico de Florida (ATL), Golfo de México Sur (GMS, muestras de adultos de Campeche), Indian River Lagoon (IRL, individuos inmaduros) y Charlotte Harbor (CH, individuos inmaduros). Una vez obtenidos los SNPs, fue estimada la diversidad genética (número de *loci*, número de *loci* polimórficos, diversidad nucleotídica, H_e y H_o) y realizadas comparaciones poblaciones, estimando el F_{ST} entre localidades mediante Arlequin v 3.5.2.2 (Excoffier, 2005), y un Análisis de Componentes Principales utilizando el paquete Adegnet (Jombart, 2018).

Resultados

En el análisis de calidad se identificaron individuos con errores de secuenciación, por lo tanto, fueron eliminados de los análisis subsecuentes, quedando al final 94 muestras en total por analizar. La cobertura de las secuencias resultó de entre 7 y 23x.

Después de la estandarización de parámetros en *Stacks* (figura 1.2), fue seleccionado el valor de 3 para cada uno de ellos (*m*, *n*, $N=3$), con los que se generaron 35,122 *locus* homocigotos, 3,160 heterocigotos y 351 señalados como artificios. Después de descartar los *loci* monomórficos, fueron aplicados los parámetros poblacionales *r* (**0.8**) haciendo referencia a que los *loci* debían encontrarse en el 80 por ciento de los individuos de cada localidad, y *p* (**1-6**), que los *loci* se presenten en de una a seis de las localidades de estudio, para determinar los marcadores utilizados en la comparación entre poblaciones.

Se obtuvieron 552 *loci*, de los cuales, 73 tuvieron al menos un sitio polimórfico (SNPs) que cumplía con las características de ser compartidos por el 80 por ciento o más de los individuos, así como estar presentes en al menos cuatro de las seis localidades estudiadas. Sin embargo, de éstos, sólo 44 presentaron menos del 5% de datos faltantes, por lo que los análisis de diversidad genética y comparaciones poblacionales (F_{ST}) fueron realizados con éstos.

Los loci polimórficos variaron entre 3 y 114 para las localidades del Caribe (Isla Mujeres) e Indian River Lagoon, respectivamente. Mientras que la diversidad nucleotídica resultó de entre 0.045 y 0.17 para la misma muestra del Caribe y Charlotte Harbor (CH). Las heterocigosidades observadas y esperadas resultaron menores para la localidad del Caribe ($H_o= 0.092$ y $H_e= 0.089$ respectivamente), mientras que los valores más altos se observaron para CH ($H_o= 0.269$, $H_e=0.246$) (Tabla 1.1).

Ninguna comparación resultó estadísticamente significativa en la comparación entre localidades ($F_{ST}= -0.006- 0.011$; $p> 0.05$), (tabla 1.2). La falta de estructuración genética entre las localidades estudiadas pudo observarse también en el análisis de componentes principales (figura 1.3), donde tanto individuos maduros como inmaduros se observan agrupados.

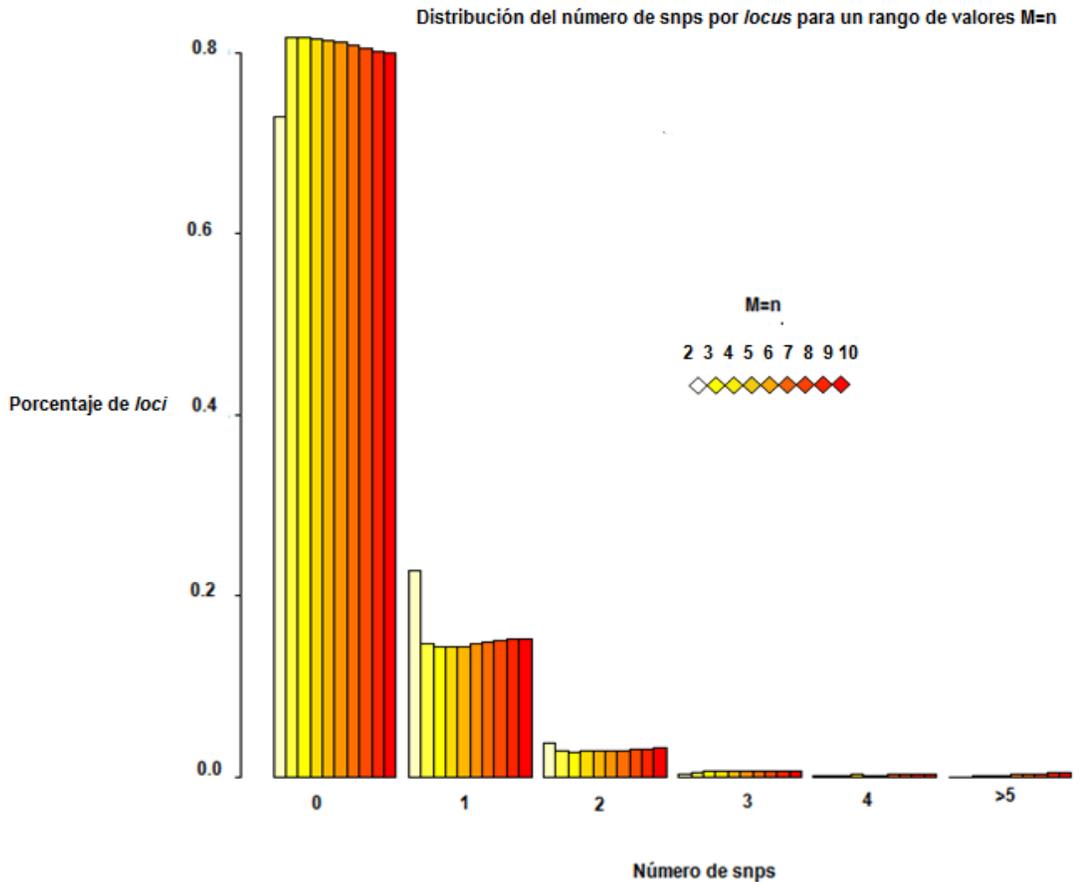


Figura 1.2 Estandarización de datos para localización de SNPs. Se muestra en el eje vertical el porcentaje de loci obtenidos con un determinado número de SNPs (eje horizontal) en los diferentes ensamblajes realizados con el programa computacional Stacks (M=n de 2 a 10), manteniendo el valor por defecto de N (3).

Tabla 1.1 Estimaciones de diversidad genética en las seis localidades analizadas del tiburón toro: Golfo de México Norte (GMN), Atlántico de Florida (ATL), Golfo de México Sur (GMS), CAR (Caribe de México), Indian River Lagoon (IRL) y Charlotte Harbor (CH).

	GMN (16)	ATL (16)	GMS (12)	CAR (18)	IRL (21)	CH (10)
No. de loci	552	552	552	552	552	552
Diversidad nucleotídica	0.112	0.125 +/- 0.064	0.113 +/- 0.06	0.045 +/- 0.056	0.110 +/- 0.055	0.117 +/- 0.06
Ho promedio (desviación estándar)	0.217 (0.223)	0.196 (0.209)	0.268 (0.291)	0.092 (0.064)	0.199 (0.213)	0.263 (0.237)
He promedio (desviación estándar)	0.214 (0.166)	0.198 (0.160)	0.223 (0.172)	0.089 (0.059)	0.191(0.159)	0.246 (0.156)

Tabla 1.2 Diferenciación genética entre localidades del tiburón toro mediante el análisis de 44 SNPs. Se muestra por arriba de la diagonal el valor de FST y el de significancia estadística (p) por debajo de la diagonal. Ningún valor resultó estadísticamente significativo ($P < 0.05$). Golfo de México Norte (GMN), Atlántico de Florida (ATL), Golfo de México Sur (GMS), CAR (Caribe de México), Indian River Lagoon (IRL) y Charlotte Harbor (CH).

	GMN	GMS	ATL	CAR	IRL	CH
GMN	*	-0.015	-0.011	-0.022	-0.022	-0.008
GMS		*	-0.003	-0.002	-0.001	-0.023
ATL	0.795	0.362	*	-0.008	0.003	0.0004
CAR	0.948	0.298	0.489	*	-0.008	0.015
IRL	0.993	0.651	0.591	0.608	*	0.002
CH	0.672	0.937	0.375	0.113	0.378	*

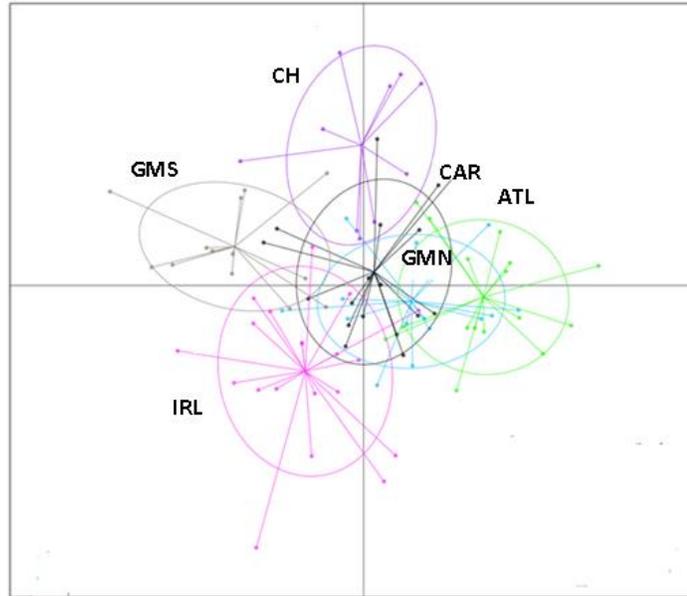


Figura 1.3 Análisis de Componentes Principales entre localidades de adultos del tiburón toro: Isla Mujeres (CAR), Golfo de México Sur (GMS), Golfo de México Norte (GMN) y Atlántico de Florida (ATL), así como de juveniles de dos AC: Indian River Lagoon (IRL) y Charlotte Harbor (CH).

Discusión

El patrón de estructura genética encontrada mediante SNPs, resultó en homogeneidad genética en el área analizada: Norte y Sur del Golfo de México, Atlántico de Florida y Caribe (hasta Isla Mujeres), lo que concuerda con datos anteriormente reportados con microsatélites en la misma zona (Sandoval-Laurrabaquio, 2015).

Las localidades analizadas mediante SNPs se encuentran dentro de una zona con pocas barreras al flujo que pudieran originar cambios importantes en la estructuración genética de la especie estudiada, es decir, que puedan limitar el flujo genético entre localidades. La homogeneidad genética resulta congruente con los datos de captura y recaptura publicados para el tiburón toro, que muestran su movilidad entre el Golfo de México Norte y Sur, Florida y Yucatán (Kohler y Turner, 2018).

El presente, es el primer trabajo donde se reportan SNPs para la especie en poblaciones del AOCC. Sin embargo, en comparación con otros estudios donde se han logrado obtener miles de SNPs (Manuzzi et al., 2019; Junge et al., 2019), en este estudio, fueron obtenidos menos de 100 después de los filtros poblacionales. Lo anterior pudo deberse al número limitado de *reads* iniciales. El

número de *reads* inicial en promedio por muestra en la literatura es mayor a 1,000,000 (Paris et al., 2017; Díaz-Arce y Rodríguez-Ezpeleta 2019), sin embargo, en nuestro caso fueron alrededor de 500,000. Lo anterior usualmente se soluciona logrando un mayor número de lecturas por secuencia, lo cual implica el secuenciar un menor número de muestras por *lane*, utilizar muestras con mejor calidad, u otra combinación de enzimas que resulten en fragmentos adecuados para un mejor análisis en la especie.

Más del 80 % de los loci formados (30,906) presentaron 0 SNPs, es decir, no presentaron variación genética independientemente de los valores asignados para *m*, *N* y *n* (Fig. 1.2). Esto es también visible con la cantidad de *Loci* homocigotos (35,122), lo que sugiere una baja variabilidad genética para la especie en la zona estudiada, y es diferente a las evaluaciones anteriores hechas mediante el análisis de microsatélites, donde se señalan altas heterocigosis observadas y esperadas superiores a 0.8 (Karl et al., 2011; Tillett et al., 2012), lo que cual puede deberse a la selección de marcadores altamente polimórficos), considerando además que los SNPs son generalmente bi-alélicos mientras que los microsatélites son multialélicos.

Las estimaciones de heterocigosis mediante SNPs en estudios genómicos resultan usualmente en valores bajos, por ejemplo, en el atún aleta amarilla ($H_o= 0.15-0.24$ y $H_e= 0.18-0.28$) Pecoraro et al., (2018); Para los tiburones *C. obscurus* y *C. galapaguensis* ($H_o= 0.11-0.18$) Pazmiño et al., (2019) y para el tiburón toro, *C. leucas*, ($H_o=0.13-0.2$; Glaus et al., 2020). Estos valores son similares a los obtenidos en este estudio ($H_o= 0.045-0.249$), con excepción del valor más bajo encontrado para la región del Caribe, la cual además sólo tuvo 3 *loci* polimórficos; esto puede deberse a la baja diversidad genética en esta localidad, o a una baja obtención de los mismos debido a datos faltantes, ya que fue la muestra con un mayor porcentaje de éstos.

La selección de parámetros en el análisis bioinformático puede influir en el número de marcadores recuperados, sin embargo, en este caso se obtuvo números similares con todas las diferentes combinaciones de parámetros (figura 1.2), lo que es independiente al nivel de estructuración encontrada. Tiende a asociarse un mayor recobro en el número de marcadores con un mejor análisis bioinformático, y se considera que un mayor número de marcadores van a resultar en una mayor diferenciación genética, sin embargo, los resultados que se obtuvieron en este análisis son congruentes con la movilidad de la especie y estudios previos.

La obtención de un bajo número de SNPs, influyó en no poder identificar la presencia de *loci outliers*, es decir, de aquéllos cuya frecuencia se encuentra fuera de la esperada bajo un escenario neutral, y que usualmente se asocia con regiones genéticas ligadas a adaptación, los cuales se han reportado por ser útiles en el descubrimiento de estructura genética a una escala fina (Freamo et al., 2011; Portnoy et al., 2015; Nayfa et al., 2016; Momigliano et al., 2017; Woodings et al., 2018), por lo que un estudio incluyendo este tipo de marcadores sería útil para completar nuestros resultados.

El que el tiburón toro conforme una población panmítica en el norte del AOCC es importante y debe ser tomado en cuenta en las políticas pesqueras de la especie, considerando que se encuentra dentro de los principales tiburones capturados tanto en Estados Unidos como en México, países que deberían coordinarse para implementar mejores estrategias de conservación, considerando que en ambas entidades se han reportado disminuciones poblacionales importantes (O'Connell et al., 2007; Pérez-Jiménez et al., 2012; ver capítulo 4).

VI. Capítulo 2

Filopatría del tiburón toro a áreas de crianza del Golfo y Caribe de México

Introducción

La filopatría es un comportamiento que en distintas especies de animales se caracteriza por la permanencia o regreso a un determinado sitio por razones específicas como la alimentación o reproducción (Mayr, 1963). En diversas especies de tiburones esta conducta ha sido asociada al alumbramiento en AC determinadas, y se ha propuesto como una de las principales causas de divergencia genética entre localidades (Karl et al, 2011; Tillett et al., 2012).

El estudio del comportamiento filopátrico en tiburones tiene importancia ecológica y evolutiva. En términos ecológicos, las áreas a las cuales las hembras son filopátricas suelen ser sitios con características ambientales definidas (temperatura, salinidad, tipo de alimento, etc.), por lo que ubicarlas y conocerlas proporciona información útil para determinar sitios prioritarios de conservación relacionados a las características reproductivas de la especie (Karl et al, 2011; Tillett et al., 2012). En términos evolutivos, el comportamiento filopátrico de las hembras hacia las AC originan la segregación genética de linajes maternos (Karl et al., 2011; Tillett et al., 2012), lo que está relacionado con su historia evolutiva y por lo tanto con la distribución de su diversidad genética, ambos son también factores importantes a considerar en la conservación de la especie.

En el caso del tiburón toro, los estudios genético-poblacionales han determinado la existencia de filopatría tanto en Australia como en la costa del AOcc (Karl et al, 2011; Tillett et al., 2012). Sin embargo, en el AOcc existen pocos registros de filopatría a AC para la especie, aunque ésta suele tener una alta fidelidad y residencia hacia sitios costeros (Carlson et al., 2010; Bruunschweiler et al., 2010), lo que en conjunto con la división de linajes entre el norte y sur del AOcc (Karl et al, 2011) y la existencia de AC en diferentes localidades señalan la posibilidad de que este comportamiento exista a una escala geográfica menor.

Este capítulo está conformado por un artículo titulado: **Genetic evidence for regional philopatry of the Bull Shark (*Carcharhinus leucas*) to nursery areas in estuaries of the Gulf of Mexico and western North Atlantic Ocean** y tuvo como objetivo evaluar el patrón de filopatría entre AC

del tiburón toro en el Golfo de México y Atlántico de Florida. Para lo cual, se realizaron análisis moleculares en individuos inmaduros capturados dentro de estuarios y adultos procedentes de ambas zonas, fue utilizada la región control del ADNmt y *loci* microsatelitales, marcadores que han sido ampliamente utilizados para inferir este tipo de comportamiento y evidenciar una posible migración sesgada por sexos (Dudgeon et al., 2012; Tillett et al., 2012).



Contents lists available at ScienceDirect

Fisheries Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fishres

Genetic evidence for regional philopatry of the Bull Shark (*Carcharhinus leucas*), to nursery areas in estuaries of the Gulf of Mexico and western North Atlantic ocean



Nadia Sandoval Laurrabaquio-A^a, Valentina Islas-Villanueva^b, Douglas H. Adams^c, Manuel Uribe-Alcocer^d, Jaime R. Alvarado-Bremer^e, Píndaro Díaz-Jaimes^{d,*}

^a Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, Mexico

^b Universidad del Mar, Instituto de Genética, Oaxaca, Mexico

^c Florida Fish & Wildlife Conservation Commission, Fish & Wildlife Research Institute, Melbourne, Florida, USA

^d Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, Mexico

^e Department of Marine Biology, Texas A&M University, at Galveston Campus, USA

ARTICLE INFO

Handled by J. Viñas

Keywords:

Bull Shark

Philopatry

Molecular markers

Nursery habitat

ABSTRACT

Nursery areas are critical for the reproductive cycle and biological requirements of Bull Sharks (*Carcharhinus leucas*) as they increase the survival of populations. Females tend to be philopatric to these areas as documented in estuaries from Australia, and inferred in the northern Gulf of Mexico and western North Atlantic Ocean, but not yet confirmed in these regions. In coastal waters of the southeastern United States, several sites have been proposed as nurseries for the Bull Shark, but little is known about how adult females utilize these areas during parturition. Philopatry for the Bull Shark was evaluated by comparing sequences of the mitochondrial DNA control-region (mtDNA-CR) and 8 microsatellite loci in juveniles and neonates from four previously reported nursery areas in United States (US) coastal waters; three in the northern Gulf of Mexico (Texas, Louisiana and Charlotte Harbor, Florida) and one in the western North Atlantic Ocean (Indian River Lagoon, Florida). A group of adult individuals from the Gulf of Mexico and Atlantic Ocean off the southeastern US were used to test genetic differences owed to limited gene flow between both regions. The analysis of genetic variation with the mtDNA-CR showed no differences among nurseries within the Gulf but significant differences when comparing the nursery areas of the two regions (Gulf vs Atlantic). In contrast, genetic homogeneity was observed among nursery areas within and between regions with the nuclear microsatellites suggesting male biased dispersal among regions. In addition, adult individuals from each of these two broad regions (Gulf of Mexico and Atlantic Ocean) showed no significant differentiation with any of the markers characterized in this study. These patterns of genetic differences support evidence for philopatry, further relaying the importance of protection and effective management of critical nursery habitats for future conservation of the species.

1. Introduction

The Bull Shark is a cosmopolitan coastal species with late sexual maturation and a long pregnancy (~10–11 months; Compagno, 1984) that uses estuarine and freshwater nursery areas to enhance its survival (Curtis et al., 2011; Heupel and Simpfendorfer, 2011). Offspring typically inhabit these areas for extended periods of time (Thorburn and Rowland, 2008; Curtis et al., 2011) away from most predators, and with suitable prey availability. Regional philopatry for females has been documented in nurseries from Australia (Tillett et al., 2012), and used

(although not strictly confirmed) to explain genetic differences between samples from the northern Gulf of Mexico and Atlantic (Karl et al., 2011). This evidence highlights the importance of properly characterizing the nursery areas for Bull Sharks throughout its worldwide range.

In coastal waters of the southeastern United States, multiple sites have been proposed as nursery areas for the Bull Shark based on studies that aimed to unravel the dynamics of neonates and juveniles within the estuaries they inhabit. These nurseries include estuaries along the coasts of Florida, Louisiana and Texas (Simpfendorfer et al., 2005; Curtis et al., 2011; Blackburn et al., 2007; Froeschke et al., 2010a,b),

* Corresponding author at: Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo, Postal 70-305, México DF, 04510, Mexico.

E-mail address: pindaro@cmarl.unam.mx (P. Díaz-Jaimes).

<https://doi.org/10.1016/j.fishres.2018.09.013>

Received 26 April 2018; Received in revised form 16 August 2018; Accepted 12 September 2018

Available online 24 September 2018

0165-7836/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

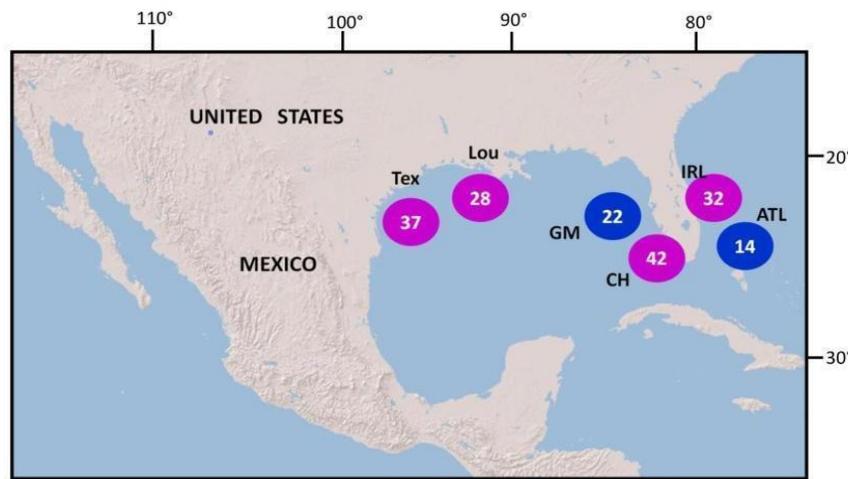


Fig. 1. Sample locations and number of Bull Shark individuals sampled from the Gulf of Mexico and Atlantic Ocean. Adults are in blue circles and juvenile individuals are in pink. Nurseries are Lou (Louisiana), Tex (Texas), CH (Charlotte Harbor, Florida) and IRL (Indian River Lagoon, Florida). Adult individuals were collected from the Atlantic (ATL) and Gulf of Mexico (GM) coasts of Florida (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

but little is known about how adult females utilize these areas while giving birth, since the number of tagged adults in these areas is very low (Carlson et al., 2010; Brunnschweiler et al., 2010) and there is only one genetic study that characterized Bull Shark samples from different localities in the Gulf of Mexico and the Atlantic (Karl et al., 2011). To date, the genetic variability of juveniles among the different nursery areas found along the southeastern coast of the US is unknown, but differences in catches based on the analysis of fisheries data (Curtis et al. 2011) together with the potential philopatry of females towards birthing areas, suggest the possibility that genetic differences may exist.

Nursery areas are critical zones where gravid females of coastal shark species give birth and where their young spend their initial period of life which may last from a few weeks up to several years in length (Castro, 1993). Such sites are identified because of the remarkable abundance of neonate/juveniles, long residence times, and repeated use as compared to nearby non-nursery areas (Heupel et al., 2007). Additionally, females of several shark species (e.g. Lemon Shark *Negaprion brevirostris*; Blacktip Shark *Carcharhinus limbatus*; Scalloped Hammerhead *Sphyrna lewini*, and Sandbar Shark *Carcharhinus plumbeus*) tend to display philopatric behaviour to specific sites which are also used as birthing areas (Hueter, 1998; Hueter et al., 2005; Chapman et al., 2015). Regional philopatry in the present study is classified as the repeated utilization of a specific nursery region by adults for reproduction, but not necessarily to a specific birthing area within that region (see Chapman et al., 2015).

In general, philopatry would result in genetic differences between sites at a regional scale whereas for specific (or natal) philopatry these differences would be at small scales (Tillett et al., 2012; Feldheim et al., 2014) for the maternally inherited mitochondrial DNA haplotypes. However such differences may not be replicated by characterizing biparentally inherited nuclear DNA loci, as has been reported for many marine species (Rassmann et al., 1997; Lyrholm et al., 1999; Pardini et al., 2001; Engelhaupt et al., 2009), including an increasing number of shark species known to display philopatric behaviour in some regions (Hueter et al., 2005; Chapman et al., 2015), such as the Bull Shark *Carcharhinus leucas* (Karl et al., 2011; Tillett et al., 2012), the Blacktip Shark *Carcharhinus limbatus* (Keeney et al., 2005) and the Scalloped Hammerhead *Sphyrna lewini* (Chapman et al., 2009).

Sharks tend to be species with low reproductive potential due to late maturity and low fecundity and are more likely to suffer severe population reductions caused by overfishing, habitat degradation and other factors (Musick et al., 2000; Dulvy et al. 2014). Many shark species currently lack data regarding key biological parameters, fisheries landings, and population status that are required to design effective

conservation strategies. An estimated one-quarter of the world's chondrichthyan fishes (including sharks, rays, skates, and chimaeras) are classified as threatened (Dulvy et al., 2014). To safeguard the survival of shark species, it is necessary to develop directed conservation strategies that include measures to protect vulnerable early life-history stages. Accordingly, the proper identification, delineation, and management of nursery areas are crucial for the conservation of the species that use them (Heithaus, 2007).

Significant commercial and recreational fisheries for carcharhinid sharks, including Bull Sharks, have occurred in US Atlantic waters for many decades but increased in the mid-1980's. Bull Sharks typically represent a small percentage of total large coastal shark landings in the US Atlantic, however landings of this species can be variable (Morgan et al., 2009; NMFS, 2012). The International Union for Conservation of Nature (IUCN) has categorized the Bull Shark as "Near Threatened" worldwide. Fisheries-dependent data infer an estimated 12% increase in relative abundance of Bull Sharks in the western North Atlantic from 1994 to 2009 (Carlson et al., 2012) and increased juvenile abundance in estuarine waters of Texas (Froeschke et al., 2010a,b), although local population decreases have also been reported (O'Connell et al., 2007). The stock status of this species in US waters is not known (NMFS, 2006).

In order to evaluate the hypothesis of philopatric behaviour for female Bull Sharks in the northern Gulf of Mexico and US Atlantic waters, the genetic divergence among sites was compared using mtDNA-CR sequences and nuclear DNA microsatellite markers, in samples of immature individuals from four different nursery areas and also verified the genetic signal for adults in adjacent offshore waters. Our sampling design and methodological approach provides evidence of philopatry toward nurseries as the most probable explanation of the genetic differences we observed.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection and DNA extraction

Tissue samples (fin clips and muscle) from a total of 175 Bull Shark specimens were collected (Fig. 1), with 139 of these from neonates or small juveniles (immature sharks) obtained of four different nurseries within two main regions in US waters; three in the northern Gulf of Mexico at Sabine Lake, Texas (Tex: n = 37); Lake Pontchartrain, Louisiana (Lou: n = 28); and Charlotte Harbor, Florida (CH: n = 42) and one in the western North Atlantic Ocean within the Indian River Lagoon, Florida (IRL; n = 32). Individuals were considered neonates

(less than ~75 cm TL) or juveniles (less than ~190 cm TL) based on Curtis et al. (2011) who consider that Bull Sharks greater than ~190 cm TL typically have left nursery habitats and have moved to offshore adult habitats. This 190 cm TL threshold size corresponds approximately to 9+ years of age (Neer et al., 2005; Natanson et al., 2014).

The remaining 36 specimens were adults (> 190 cm TL) collected offshore along Florida coasts, the US Atlantic (ATL) coast and the Gulf of Mexico (GM) coast. Fourteen tissue samples were collected from the US Atlantic offshore of the Florida Atlantic coast, whereas tissues of 22 specimens were from the Gulf of Mexico region corresponding to the following locations: Florida Panhandle (n = 14), Offshore Tampa Bay/Charlotte Harbor (n = 1) and the Florida Keys (n = 7). All Florida samples (immature and adults) were collected from 1994 to 2010, while Texas and Louisiana samples were collected in 2013, 2014 and 2016. Tissue samples were preserved in 70% ethanol. DNA extraction was performed with the Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit from PROMEGA.

2.2. DNA isolation and PCR amplification

The mitochondrial DNA control region (mtDNA-CR) of Bull Shark samples was amplified using the universal primers Elasmocr1564 F (5'-TTG GCT CCC AAA GCC AAR ATT CTG-3') and Elasmocr16638R (5'-CCC TCG TTT TWG GGG TTT TTC GAG) reported in Stoner et al. (2003). Conditions for the 50 µl PCR reactions consisted of 0.2 mM dNTPs, 3 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM KCl, 0.1 pM of each primer, 0.025 U/µl of Taq (INVITROGEN) and 20–50 ng of DNA with a cycling profile of 5 min at 94 °C, 35 cycles of 1 min s at 94 °C, 1 min at 59 °C and 3 min at 65 °C, followed by a final extension of 7 min at 72 °C. PCR products were purified and quantified for automated sequencing in Macrogen, Inc. (Seoul, Korea).

Eight nuclear microsatellite loci were amplified using previously published primers; five of them isolated from Bull Shark (*Cl8*, *Cl13*, *Cl16*, *Cl17* and *Cl19*; Pirog et al., 2015), and three from other shark species (*Cl1007*, *Cl1107*, Keeney and Heist, 2003; *Cpl 166*, Portnoy et al. 2006), that were used in previous Bull Shark studies (Karl et al., 2011; Tillett et al. 2012). All loci were fluorescently tagged, however for the Bull Shark non-specific microsatellites a M13 tail sequence (5'GTA AAA CGA CGG CCA GT3') was linked to the 5' end and a third M13 primer labeled with one fluorophore (6-FAM, VIC, NED or PET; APPLIED BIOSYSTEMS[®]) was added to the primer mix reaction.

PCR reactions of 5 µl were prepared with a Type it-microsatellite kit from QIAGEN as follows: 2.5 µl of Type-it Master Mix, 1.5 µl of 0.4 µM primer mix (Forward, Reverse and M13, if was the case) and ~5–20 ng of DNA (~ 1 µl). The PCR profile was 5 min at 95 °C, followed by 28 cycles of 30 s at 95 °C, 90 s at 51 or 58 °C and 30 s at 72 °C, then 30 min at 60 °C. The PCR products for microsatellite loci were sized with the standard GENESCANTM 500LIZ[™]. Capillary electrophoresis was performed with an automatic 24 capillary array sequencer 3500 xl (LIFE TECHNOLOGIES TM[®]). We used GENEMAPPER v. 3.7 (APPLIED BIOSYSTEMS) software to genotype individuals.

2.3. Data analyses

For diversity and divergence analyses, we compared immature individuals (e.g. neonates and juveniles) from the four nursery areas: Tex, Lou, CH and IRL. This was done to properly test the phylogeographic association of these individuals to nursery areas. Adult samples were used as a control and grouped into two main regions, Gulf of Mexico (GM) and Atlantic (ATL), as indicated in the sampling section.

The mtDNA-CR sequences obtained in this study were edited in BIOEDIT 7.0.5.3 (Hall, 1999) and multiple sequence alignments were optimized by eye. For each population, estimates of nucleotide (π) and haplotypic (H_d) diversities, the number of haplotypes (h), the number of polymorphic sites (S) and the average number of differences (Θ_x)

were calculated using DNASP 5.2 (Librado and Rozas, 2009). A haplotype network of the mtDNA-CR sequences was reconstructed using the program POPART (Leigh and Bryant, 2015) to help visualize the relationship among haplotypes relative to their geographic provenance.

All the microsatellite loci were tested for the presence of null alleles, miss-genotyping and stuttering in Micro-checker (Van Oosterhout et al., 2004). Deviations from Hardy-Weinberg equilibrium (H-W) and its respective probability (No. of steps in Markov chain was 1,000,000 and No. of dememorization steps: 100,000), and linkage disequilibrium tests (No. of permutations: 1000 and No. of initial conditions for EM: 2) were assessed with ARLEQUIN v. 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010). This software was also used to estimate genetic diversity, measured as expected and observed heterozygosities (H_E and H_O respectively), and number of alleles (N_a). The significance level for multiple testing was adjusted using the false discovery rate (FDR) of Benjamini and Yekutieli, 2001, as proposed by Narum, 2006 for conservation genetics studies, in order to minimize the probability to get a significant value only by chance (a false-positive result). The same correction was implemented for the subsequent genetic differentiation analyses.

Pairwise comparisons for the population differentiation were done between nurseries and between adults, independently for all cases. Index F_{ST} and R_{ST} for microsatellites and F_{ST} for mtDNA-CR (based on haplotypic frequencies) were conducted with ARLEQUIN, assessing significance with 20,000 permutations. For R_{ST} analysis, fragment lengths were converted into the number of repeats.

The number of possible genetically differentiated populations (K) was assessed with STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard et al., 2000) using the correlated allelic frequencies, a burn-in period set to 10^4 iterations and the probability estimates were determined using 10^4 Markov chain Monte Carlo (MCMC) sampling frequency. Admixture and no admixture model were tested in combination with LOCIPRIOR and no LOCIPRIOR information.

Runs were conducted by setting K from 1 to 4 in the case of adults and 1 to 8 in the case of immature sharks from nursery areas (twice the number of localities surveyed) with 25 iterations for each K value. Results were loaded in HARVESTER (Earl and vonHoldt, 2012) in order to summarize and visualize the most probable number of populations.

In order to evaluate a bias in haplotype and allele frequencies due to the Allendorf-Phelps effect (Allendorf and Phelps, 1981) associated with potential excess of sibs within the immature samples of Bull Sharks, a parentage analysis within and between localities was performed using the ML-Relate software (Kalinowski et al., 2006), to determine, based on a maximum likelihood value, the percentage of the most probable relationship among individuals: related (R) unrelated (U), half-siblings (HS), full-siblings (FS), and parent-offspring (PO).

3. Results

3.1. Gene diversity

An 826 base pairs (bp) fragment from the mtDNA-CR was obtained for 139 immature individuals containing eight polymorphic sites featuring seven transitions and one transversion that resulted in 10 haplotypes for samples in nursery areas (Table 1). The mean haplotype and nucleotide diversity was low ($H_d = 0.62 \pm 0.013$; $\pi = 0.0011 \pm 0.0008$), with all nursery locations displaying similar values (range from 0.50 to 0.66). For regional locations composed entirely of adults (n = 36), samples from the Gulf of Mexico coast of Florida (GM) showed lower diversity values ($H_d = 0.37 \pm 0.100$; $\pi = 0.0005 \pm 0.0005$) than samples from the Atlantic coast of Florida (ATL) ($H_d = 0.75 \pm 0.100$; $\pi = 0.0015 \pm 0.0010$).

The haplotype network resulted in two common haplotypes (*Cl1* and *Cl2*) containing individuals from the four nursery locations surveyed (Fig. 2a), but with marked differences in haplotype frequencies for juvenile individuals between nurseries from the Gulf of Mexico and the Atlantic coast of Florida (Fig. 2b). The frequency of haplotype *Cl2*

Table 1

Summary statistics for the mtDNA-CR sequences. N = sample size, Hd = haplotype diversity, π = nucleotide diversity, h = number of haplotypes, S = number of segregating sites. Standard deviation values in parenthesis. Indian River Lagoon (IRL), Charlotte Harbor (CH), Louisiana (Lou), Texas (Tex), Gulf of Mexico (GM), Atlantic (ATL).

	N	Hd	π	h	S	α_k
Juveniles (Nursery Areas)						
IRL	32	0.66 (0.054)	0.001 (0.0008)	4	3	0.98
CH	42	0.6 (0.001)	0.001 (0.0008)	6	6	1.68
Lou	28	0.52 (0.012)	0.0011 (0.0009)	7	6	2.67
Tex	37	0.5 (0.008)	0.0008 (0.0007)	5	4	1.33
Total	139	0.62 (0.013)	0.0011 (0.0008)	10	8	2.3
Adults						
ATL	14	0.75 (0.1)	0.0015 (0.001)	6	5	1.23
GM	22	0.37 (0.1)	0.0005 (0.0005)	2	1	0.37
Total	36	0.53 (0.008)	0.0009 (0.0007)	6	5	1.8

in IRL was substantially higher (50%) compared to the rest of the samples containing immature sharks (Tex 16%; Lou 7.14% and CH 23.8%).

The analyses of Microchecker indicate that null alleles were present in four cases: *C116* in IRL, *C119* in ATL, *C113* in GM and *C1107* in Tex, resulting in deviations for Hardy-Weinberg equilibria after BY FDR correction (considering 10 k , number of test for locality; $\alpha \geq 0.017$) (Supplementary table S1). However, no microsatellite locus deviated in more than one instance.

Tests for linkage disequilibrium showed that only two out of the 180 tests were significant after BY correction ($P \leq 0.01$). However, none of these deviations were significant for the same pair of loci suggesting that none of the microsatellite loci characterized in this study were linked. The mean number of alleles per location t ranged from 7.3 for ATL to 11.63 for Lou, whereas the mean expected heterozygosity ranged from 0.63 to 0.78 for Tex and GM, respectively, while the mean expected heterozygosity was 0.81. Locus *C117* was monomorphic for the following localities: IRL, ATL and GM, and showed only two alleles for Tex, Lou and CH (Table S1).

3.2. Population genetic divergence

Pairwise sample comparisons of F_{ST} -estimates using mtDNA-CR sequences between the nursery areas containing neonate/juvenile individuals, resulted in significant genetic differences between the Atlantic coast IRL location and the rest of samples from the Gulf of Mexico (range of F_{ST} from 0.09 to 0.22; $P < 0.05$; Table 2). Contrastingly, there were no differences in the comparisons between nurseries within the Gulf of Mexico (i.e. Texas, Louisiana, and Charlotte Harbor), using mtDNA-CR sequence data (Table 2). In addition, no differences were observed between locations containing adults from both, the Atlantic and the Gulf of Mexico coasts of Florida ($F_{ST} = 0.070$, $P = 0.090$).

Pairwise comparisons of F_{ST} - R_{ST} estimates from microsatellite data between major nursery areas from the Atlantic and the Gulf of Mexico coasts of Florida, showed no significant genetic differences ($F_{ST} = -0.009$ to 0.007, $R_{ST} = 0.001$ –0.015; $P > 0.05$), except for the R_{ST} estimate between CH-Tex locations which remained significant after BY correction ($R_{ST} = 0.015$; $P = 0.0008$. Table 3).

Comparisons between the two locations containing adult individuals were not statistically significant either based on F_{ST} and R_{ST} estimators ($F_{ST} = 0.009$, $P = 0.130$; $R_{ST} = 0.130$, $P = 0.240$). Microsatellite F_{ST} -estimates were obtained with and without locus *C117*, as it was not polymorphic for some locations (as previously mentioned), in order to minimize any potential bias in the population genetic structure estimation due to its exclusion. There were no differences by

the inclusion or elimination of locus *C117* in the results (data not shown).

STRUCTURE analyses for nuclear DNA microsatellite data showed no signals for population structure in the respective comparisons of immature and adult samples (Supplementary material S2 and S3).

Parentage analyses, conducted for immature and adult samples separately, indicated that the percentage of unrelated individuals within nurseries was $> 87.6\%$, with a similar value ($> 86.4\%$) obtained between nurseries. For the adult samples, the percentage of unrelated individuals was slightly higher for the IRL than for immature samples, at about 91.7%, with the GM containing the largest proportion of unrelated individuals, at 97.2%, of all the samples analyzed in this study. Overall, the percentage of related individuals (any kind of relationship) varied from the lowest value 2.8% for the GM adults to 13.63% between IRL–CH. The percentage of full sibs detected within nurseries varied from 0.84 to 1.54%, with similar values between nurseries (0.84–1.61), with no full sibs detected among GM adults, and in 2.7% of adults in the Atlantic sample from IRL. The percentage of half sibs was higher both within nurseries (8.61–10.83%) with similar values between nurseries (9.51–11.53%), but lower for the adult samples at 2.78% and 5.6%, respectively for the GM and ATL (Supplementary material S4).

4. Discussion

4.1. Gene diversity

Genetic variation estimated with mtDNA-CR was relatively low for haplotypic ($Hd = 0.59$) and nucleotide ($\pi = 0.001$) diversity, respectively. For microsatellites the levels of variation differed across loci; with higher values for the non-specific markers compared to those loci isolated for the Bull Shark, that include *C117*, that was nearly monomorphic, except for locations CH, Tex and Lou (Supplementary table S1). This result is not in agreement with what Pirog et al. (2015) reported at marker (*C117*) where five alleles were found for this locus. The present study is the first to use specific microsatellites for the Bull Shark in a population genetic study and where a larger number of microsatellite markers have been used to evaluate its population genetic structure.

4.2. Population structure and philopatry

Evidence for philopatry in various shark species has recently been accumulating (Chapman et al., 2015); with some studies determining that this behaviour can be directed to a very specific area (Feldheim et al., 2014) resulting in genetic population structure at different geographical levels, i.e. regional or site-specific (Chapman et al., 2015). When females are philopatric to a location for parturition, it is often typical to observe genetic differences in the maternally inherited mitochondrial DNA but absent or less likely in biparentally nuclear inherited genes (Hueter et al., 2005; Dudgeon et al., 2012).

This pattern of genetic differentiation associated with philopatry was found in the present study for mtDNA-CR data between the IRL nursery area (located in the Atlantic coast of Florida) and each one of the three nurseries located in the Gulf of Mexico, suggesting that females are site-selective with regard to parturition in these two broad regions (Gulf and/or Atlantic). This result is similar to that of Karl et al., 2011, who reported genetic differences in mtDNA-CR sequences between the north of the Gulf of Mexico (although only one locality was different) and the Atlantic coast in Florida, leading those authors to conclude the possible existence of philopatric behaviour of Bull Shark females within each region.

In the present study, assessing the genetic signatures through the use of mtDNA and nuclear DNA independently between immature and adult individuals from nurseries and surrounding areas, gave support to philopatry as the most probable explanation for the genetic differences

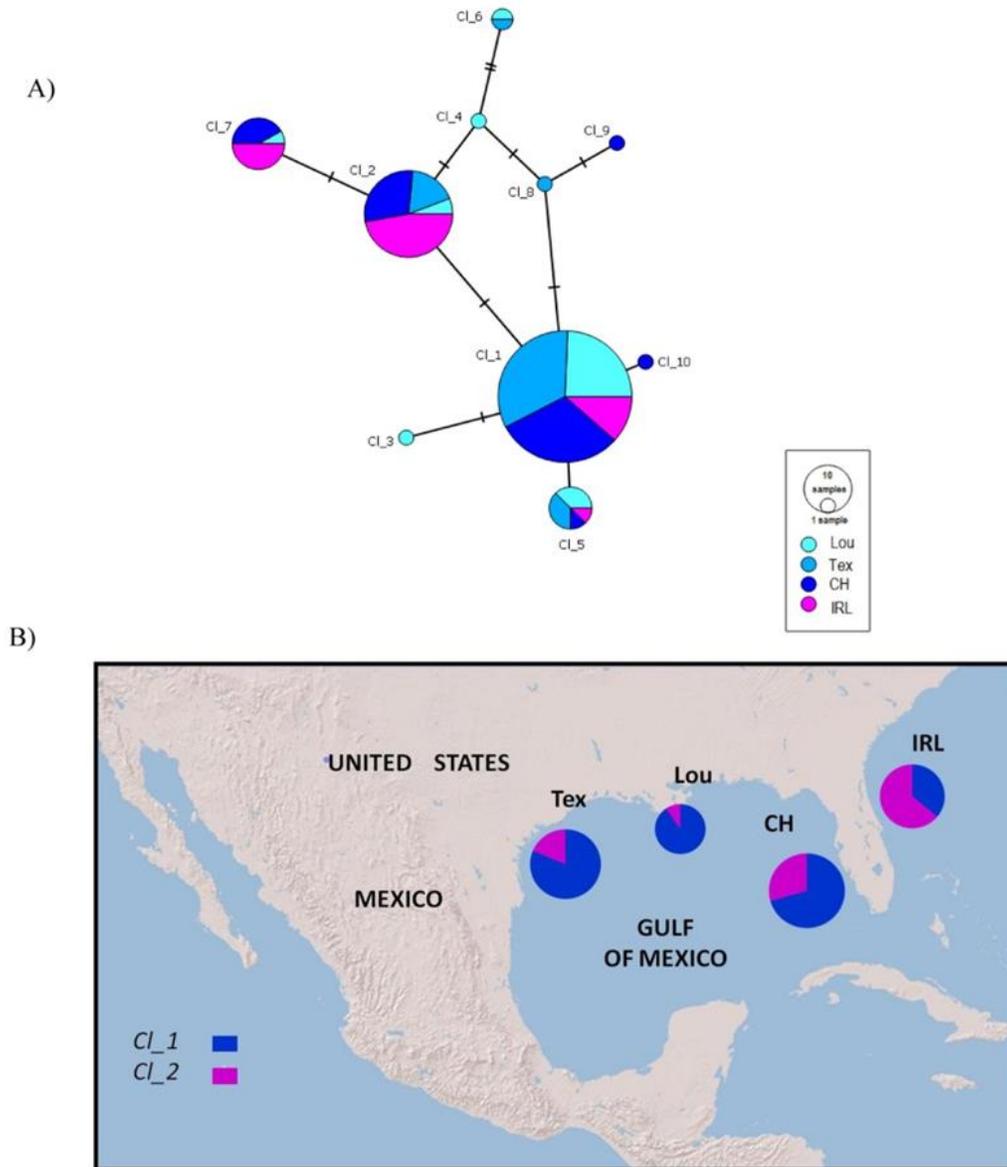


Fig. 2. A) Minimum spanning network showing the spatial distribution of haplotypes for the Bull Shark nursery areas (only immature individuals) in the Gulf of Mexico and the Atlantic coast of Florida. B) Frequency for the two most abundant haplotypes (CL1 and CL2) in each sampled nursery.

Table 2

Pairwise F_{ST} estimates between nursery grounds for mtDNA-CR sequences (below diagonal) and their P values (upper diagonal). Significant values are in bold, * $\alpha < 0.05^*$ and ** after BY correction ($\alpha < 0.02$). Indian River Lagoon (IRL), Charlotte Harbor (CH), Louisiana (Lou), Texas (Tex).

	Tex	Lou	CH	IRL
Tex (36)	–	0.77	0.19	0.0002
Lou (29)	–0.018	–	0.16	0.0001
CH (42)	0.013	0.02	–	0.012
IRL (32)	0.21**	0.22**	0.09**	–

Table 3

Pairwise sample F_{ST} estimates (upper diagonal) and R_{ST} (below diagonal) for microsatellite loci between nurseries. Significant values are in bold, * $\alpha < 0.05^*$ and ** after BY correction ($\alpha < 0.02$). Indian River Lagoon (IRL), Charlotte Harbor (CH), Louisiana (Lou), Texas (Tex).

	Lou	Tex	CH	IRL
Lou	–	0.003	0.001	0.003
Tex	–0.00394	–	0.015**	0.006
CH	–0.00939	–0.00092	–	0.004
IRL	0.01694	0.00017	–0.00035	–

observed. This may also reinforce the concept that Bull Shark juveniles typically remain in their nursery area for up to several years as proposed by Curtis et al. (2011) in Florida as well as by Thorburn and Rowland (2008) in Australia. Juvenile residence along with the fact that female sharks return to give birth in the same region repeatedly promotes the differential segregation of mitochondrial DNA (mtDNA) lineages that results in genetic differentiation between nursery areas, in this case, from the two major regions in the Gulf of Mexico and US Atlantic systems. This type of selective sampling (using only immature life-history stages) was directed towards an effective representation of genetic diversity of specific nursery areas. In studies of other shark species, such as Blacktip Sharks, this type of sampling strategy proved effective for the detection of genetic differences of neonates and juveniles between nurseries of the Gulf of Mexico and the Atlantic, suggesting the presence of philopatry in that species (Keeney et al., 2005), but also for the Bull Shark in Australia, where genetic differences with mtDNA, but not with microsatellites, were reported between samples of immature individuals from neighbouring nurseries adding evidence for the existence of philopatry (Tillett et al. 2012). The estimations of genetic differentiation obtained in our study are similar to the reported for the Bull Shark in Australia by Tillett et al. 2012 (Φ_{ST} from 0.062–0.22; Φ_{ST} from 0.09 to 0.22 this study) both displaying statistically significant differences.

Sampling focused on immature individuals also minimizes the chance of confounding effects of philopatric behaviour with other factors causing the genetic differences observed, such as those inherent to the evolutionary scale of the information provided by the genetic marker employed (Freeland, 2005; Dudgeon et al., 2012; Chapman et al., 2015). However, sampling immature individuals in nursery areas may overestimate differences through the F_{ST} due to the Allendorf-Phelps effect (Waples, 1998). This is because by sampling juveniles there can be an extent of kinship between individuals as they may come from the same or related parents contributing to the non-random sampling of populations (Allendorf and Phelps, 1981).

The parentage analysis showed low relationship between individuals with a percentage within and between nursery areas < 14% (Supplementary material S4). Our percentage of relatedness was similar to the Australian NAs (1.96–10.95%) for Bull Sharks (Tillett et al., 2012), but notably lower when compared to that for the Bluntnose Sixgill Shark *Hexanchus griseus* (~87%) or for the Broadnose Sevengill Shark *Notorynchus cepedianus* (~70%) reported in Larson et al. (2011 and 2015, respectively). Further, the percentage of full sibs, was low for comparisons within- and between nurseries (< 1.61%). Overall, parentage results along with the sampling regime that spanned multiple years, thus minimizing the probability to sample relatives, led to the conclusion that the Allendorf-Phelps effect was not a factor to account for the differentiation reported in this study.

There were no clear genetic differences between nurseries in the Gulf of Mexico (Tex, Lou and CH) with any of the genetic markers employed, which could be interpreted as additional evidence in favour of regional philopatry (Chapman et al., 2015) with individuals returning to their regional birthplace in any of the estuaries of the Gulf of Mexico. The differences between major regions (e.g. Atlantic vs. Gulf of Mexico), may also involve a spatial component related to some limitations in female dispersal. Evidence of limited dispersal capability for adult female Bull Shark was discussed by Karl et al. (2011) who reported genetic differences in mtDNA-CR sequences between individuals from the Gulf of Mexico and Atlantic coasts of Florida accompanied by genetic homogeneity for nuclear DNA. Even though these differences were attributed to philopatry, the differences between regions (e.g. Atlantic vs. Gulf of Mexico) can be also interpreted as limited dispersal as samples in Karl et al. (2011) were collected from commercial sources and consisted of offshore adult or large subadult individuals such that there is no possibility to distinguish between both processes. Avise (2000) has documented widely the phylogeographic pattern exhibited for several species where genetic differences between Atlantic and Gulf

populations has been reported. Although there were not observed differences between adult Bull Shark individuals from the Gulf of Mexico and the Atlantic based on mtDNA sequences, it should be noted that the F_{ST} resulted in a P -value close to the significance (0.09). This result should be taken with caution by considering the phylogeographic break between these regions and the differences reported by Karl et al. (2011) based on samples of Bull Shark adults and large sub adults. By assuming the philopatric behaviour for females, these differences could be explained by limited dispersal of adult females as they potentially would tend to remain in the same area considering the energetic cost of reproduction limiting the interchange between Gulf of Mexico and Atlantic populations. However, since Karl et al. (2011) used only one location for the Atlantic and it showed significant differences with one of the two locations in the Gulf, this pattern should be further investigated by including additional locations from the Atlantic.

Further, there is also a current lack of sufficient information about the species' migratory patterns in the Gulf of Mexico and US Atlantic waters. This highlights the usefulness of a sampling design based on juvenile individuals in defining philopatric behaviour for Bull Shark populations but also supports the possibility that gene flow is primarily mediated by adult males. However, large scale tagging studies would be needed to confirm if significant numbers of adults are moving between Gulf of Mexico and Atlantic regions in addition to our results, in order to assess the limited dispersal and residence patterns of adult females.

In the light of these results, there is evidence for the existence of at least two genetically discrete nursery regions, one in the Gulf of Mexico and a second in the Atlantic coast of the USA. This would have important implications for conservation, as these two regions could contain two genetically distinct management units, with the IRL as one vital area for the survival of the Atlantic Florida population as proposed by Curtis et al. (2011) based on abundance of juveniles and neonates compiled during 30 years of sampling. Therefore, the critical importance of the IRL and potentially expanded nursery habitats elsewhere on the US Atlantic (Bangley et al., 2018) become more relevant due to the evidence for philopatry observed in this study.

In the concept of regional philopatry as defined by Chapman et al. (2015), females do not return to a specific estuary or discrete nursery area for parturition, instead they go back to a wider area within the same general region (Chapman et al., 2015). Bull Sharks in the northern Gulf of Mexico likely return to estuaries within this broad region and those in Florida Atlantic waters likely return to the IRL or other estuaries within this region of the US Atlantic coast. However, it is important to consider also that the definition of differences at a small scale could be influenced by the remarkably low variation of the bull shark mtDNA-CR. As an example, using the whole mtDNA genome in the Largetooth Sawfish *Pristis pristis*, Feutry et al. (2015) were able to define differences attributed to philopatry, at a small scale between river basins, where differences at a larger scale (bays) was detected using a single mtDNA gene. Therefore, the use of a larger number of nucleotides including the whole mtDNA genome may add sufficient resolution to assess differences at a relatively small scale as reported here. Likewise, additional genetic studies will be needed to address this question by using genomic studies as the use of thousands of nuclear markers would increase the chances to recover the genetic signal of gene flow between localities (Feutry et al., 2017).

4.3. Management implications

The results of the present study, where regional differences were observed between nursery areas of the Gulf of Mexico and the Atlantic, highlights the importance of these regions for conservation of Bull Shark populations. It is imperative to consider that the genetic heterogeneity originated by the philopatric component has been related to the generation and maintenance of the adaptive variation (Stiebens et al., 2013; Portnoy et al., 2015), emphasizing the relevance of philopatry in an evolutionary context.

The Indian River Lagoon has been considered a critical nursery for Bull Sharks on the US Atlantic coast based on high abundances of neonates and juveniles, and the determination that this is the most common shark species using this estuarine system as a nursery area (Adams and Paperno, 2007; Curtis et al., 2011). Contrastingly, in nurseries from the Gulf of Mexico such as Charlotte Harbor, Bull Sharks are one of multiple coastal shark species reported and where Bull Sharks are not the most abundant species at neonate and juvenile stages (Hueter, 1994). There are not comprehensive conservation or management regulations for Bull sharks based on species-specific stock assessments, but some current strategies in US waters including landings quotas, catch retention limits, minimum size limits, and gear restrictions in some waters, have aided to reduce the fishing pressure on this species (Simpfendorfer and Burgess, 2009; FWC (Florida Fish and Wildlife Conservation Commission), 2018).

Due to the role of estuarine habitats in increasing the survival of neonate and young juvenile Bull Sharks and other shark species, the preservation and effective management of these areas is critical for species conservation. As a consequence, the degradation of these habitats may risk population viability as gravid females repeatedly rely on specific estuarine habitats for parturition. The significant influence of human activities in estuaries caused by water diversions, water quality degradation, coastal development, and pollution have unknown effects on bull shark populations and need additional research attention (Simpfendorfer and Burgess, 2009). Degradation of these important habitats may directly influence population metrics, including the potential risk of lineage extinction. As genetic studies of Bull Sharks have documented or inferred philopatry for females (Tillett et al., 2012; Karl et al., 2011, and the present study), the implementation of management strategies considering estuaries as key habitats is needed to protect nurseries for this species. Although Bull Sharks represent a small percentage of total large coastal shark landings in the US Atlantic, there are indications that the Bull Shark has suffered considerable depletion in the Gulf of Mexico, with estimated population reductions of > 90% within the Lake Pontchartrain nursery area in south-eastern Louisiana, (O'Connell et al., 2007). From a global perspective, this species has been categorized by the International Union for Conservation of Nature (IUCN) as "Near Threatened". The implementation of effective management strategies for the species, with direct attention to conservation of critical nursery areas, needs to be considered a priority in preserving the viability of Bull Shark populations.

5. Conclusion

Many shark species, including the Bull Shark, currently lack critical data regarding genetics and population status that are required to design appropriate fisheries conservation strategies. In this study we detected a pattern of female philopatry for the Bull shark to nursery areas within estuaries of the Gulf of Mexico and western North Atlantic Ocean. The genetic differences in mtDNA-CR sequences coupled with genetic homogeneity exhibited by microsatellite nuclear DNA between juvenile individuals from nurseries of these two major regions provides evidence for regional philopatry. Genetic homogeneity observed among nursery areas within and between regions with the nuclear DNA overall, but particularly for adults, suggests male biased dispersal among regions. These results highlight the importance of expanded protection and effective management of these essential nursery habitats for population stability and future conservation of this species.

Funding

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (CONACYT Project 253381); and Programa de Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT, UNAM, México (Project IN208112). Sample collection for this study was supported in part by funding from the Department of the Interior,

U.S. Fish and Wildlife Service, Federal Aid in Sport Fish Restoration (Project F-43); and by State of Florida Saltwater Recreational Fishing License monies. NSLA would like to thank the Programa de Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, UNAM and CONACYT for fellowship support.

Acknowledgments

Many thanks to scientists from FWC-FWRI's Fisheries-Independent Monitoring Program for collecting bull sharks for this study. We greatly appreciate bull shark fin clips provided by Jonathan Davis of Texas Parks and Wildlife Department, Matt Scripser of Florida Institute of Technology, Eric Reyier of Kennedy Space Center Ecological Program, and by Cape Canaveral Scientific. We are grateful also to Brett Falterman of the Louisiana Department of Wildlife and Fisheries, and Erica Atkins from the Department of Marine Biology at TAMUG for the additional samples from Louisiana and Texas.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi: <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2018.09.013>.

References

- Adams, D.H., Paperno, R., 2007. Preliminary assessment of a nearshore nursery ground for the scalloped hammerhead off the Atlantic Coast of Florida. *American Fisheries Society Symposium*, vol. 50 American Fisheries Society p. 165.
- Allendorf, F.W., Phelps, S.R., 1981. Use of allelic frequencies to describe population structure. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 38 (12), 1507–1514.
- Avise, J.C., 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts and London.
- Bangley, C.W., Paramore, L., Shiffman, D.S., Rulifson, R.A., 2018. Increased abundance and nursery habitat use of the bull shark (*Carcharhinus leucas*) in response to a changing environment in a warm-temperate estuary. *Sci. Rep.* 8 (6018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24510-z>.
- Benjamini, Y., Yekutieli, D., 2001. The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *Ann. Stat.* 29, 1165–1188. <https://doi.org/10.1214/aos/1013699998>.
- Blackburn, J.K., Neer, J.A., Thompson, B.A., 2007. Delineation of bull shark nursery areas in the inland and coastal waters of Louisiana. *Am. Fish. Soc. Symp.* 50, 331–343.
- Brunnenschweiler, J.M., Queiroz, N., Sims, D.W., 2010. Oceans apart? Short-term movements and behaviour of adult bull sharks *Carcharhinus leucas* in Atlantic and Pacific oceans determined from pop-off satellite archival tagging. *J. Fish. Biol.* 77, 1343–1358. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2010.02757.x>.
- Carlson, J.K., Ribera, M.M., Conrath, C.L., et al., 2010. Habitat use and movement patterns of bull sharks *Carcharhinus leucas* determined using pop-up satellite archival tags. *J. Fish. Biol.* 77, 661–675. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2010.02707.x>.
- Carlson, J.K., Hale, L.F., Morgan, A., Burgess, G., 2012. Relative abundance and size of coastal sharks derived from commercial shark longline catch and effort data. *J. Fish. Biol.* 80, 1749–1764.
- Castro, J.I., 1993. The sharks nursery of Bulls Bay, South Carolina, with a review of the shark nurseries of the south-western coast of the United States. *Environ. Biol. Fishes* 38, 37–48.
- Chapman, D.D., Pinhal, D., Shivji, M.S., 2009. Tracking the fin trade: genetic stock identification in western Atlantic scalloped hammerhead sharks *Sphyrna lewini*. *Endanger. Species Res.* 9 (3), 221–228.
- Chapman, D.D., Feldheim, K.A., Papastamatiou, Y.P., Hueter, R.E., 2015. There and Back again: a review of residency and return migrations in sharks, with implications for population structure and management. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 7, 547–570. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010814-015730>.
- 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*. Food and Agricultural Organization, United Nations FAO Fisheries Synopsis 125 (4, pt. 2):251–655.
- Curtis, T.H., Adams, D.H., Burgess, G.H., 2011. Seasonal distribution and habitat associations of bull sharks in the Indian River Lagoon, Florida: a 30-year synthesis. *Trans. Am. Fish. Soc.* 140, 1213–1226. <https://doi.org/10.1080/00028487.2011.618352>.
- Dudgeon, C.L., Blower, D.C., Broderick, D., et al., 2012. A review of the application of molecular genetics for fisheries management and conservation of sharks and rays. *J. Fish. Biol.* 80, 1789–1843. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2012.03265.x>.
- Dulvy, N.K., Fowler, S.L., Musick, J.A., Cavanagh, R.D., Kyne, P.M., Harrison, L.R., Carlson, J.K., Davidson, L.N., Fordham, S.V., Francis, M.P., Pollock, C.M., Simpfendorfer, C.A., Burgess, G.H., Carpenter, K.E., Compagno, L.J., Ebert, D.A., Gibson, C., Heupel, M.R., Livingstone, S.R., Sanciangco, J.C., Stevens, J.D., Valenti, S., White, W.T., 2014. Extinction risk and conservation of the world's sharks and rays. *Elife* 2014, 1–35. <https://doi.org/10.7554/eLife.00590.001>.
- Earl, D.A., vonHoldt, B.M., 2012. *STRUCTURE HARVESTER: a website and program for*

- visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* 4, 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>.
- Engelhaupt, D., Hoelzel, A.R., Nicholson, C., Frantzis, A., Mesnick, S., Gero, S., Whitehead, H., Rendell, L., Miller, P., De Stefanis, R., Cañadas, A., Airoldi, S., Mignucci-Giannoni, A.A., 2009. Female philopatry in coastal basins and male dispersion across the North Atlantic in a highly mobile marine species, the sperm whale (*Physeter macrocephalus*). *Mol. Ecol.* 18, 4193–4205. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04355.x>.
- Excoffier, L., Lischer, H.E.L., 2010. An integrated software package for population genetics data analysis. *Mol. Ecol. Resour.* 10, 564–567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>.
- Feldheim, K.A., Gruber, S.H., Dibattista, J.D., Babcock, E.A., Kessel, S.T., Hendry, A.P., Pritchard, E.K., Ashle, M.V., Chapman, D.D., 2014. Two decades of genetic profiling yields first evidence of natal philopatry and long-term fidelity to parturition sites in sharks. *Mol. Ecol.* 23, 110–117. <https://doi.org/10.1111/mec.12583>.
- Feutry, P., Kyne, P.M., Pillans, R.D., Chen, X., Marthick, J., Morgan, D.L., Grewe, P.M., 2015. Whole mitogenome sequencing refines population structure of the critically endangered sawfish *Pristis pristis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 533, 237–244. <https://doi.org/10.3354/meps11354>.
- Feutry, P., Berry, O., Kyne, P.M., Richard, D.P., Hillary, R.M., Grewe, P.M., Marthick, J.R., Johnson, G., Gunasekera, R.M., Bax, N.J., Bravington, M., 2017. Inferring contemporary and historical genetic connectivity from juveniles. *Mol. Ecol.* 26, 444–456. <https://doi.org/10.1111/mec.13929>.
- Freeland, J.R., 2005. *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons, UK 388p.
- Froeschke, J., Stunz, G.W., Wildhaber, M.L., 2010a. Environmental influences on the occurrence of coastal sharks in estuarine waters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 40727. <https://doi.org/10.3354/meps08546>. 9–29.2.
- Froeschke, J.T., Stunz, G.W., Sterba-Boatwright, B., Wildhaber, M.L., 2010b. An empirical test of the “shark nursery area concept” in Texas bays using a long-term fisheries-independent data set. *Aquat. Biol.* 11, 65–76. <https://doi.org/10.3354/ab00290>.
- FWC (Florida Fish and Wildlife Conservation Commission), 2018. Florida Saltwater Recreational Fishing Regulations. FWC, Tallahassee Available at: <http://myfwc.com/fishing/saltwater/recreational/> (August 2018).
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95–98.
- Heithaus, M.R., 2007. Nursery areas as essential shark habitats: a theoretical perspective. *Am. Fish. Soc.* 50, 3–13.
- Heupel, M.R., Simpfendorfer, C.A., 2011. Estuarine nursery areas provide a low-mortality environment for young bull sharks *Carcharhinus leucas*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 433, 237–244. <https://doi.org/10.3354/meps09191>.
- Heupel, M.R., Carlson, J.K., Simpfendorfer, C.A., 2007. Shark nursery areas: concepts, definition, characterization and assumptions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 337, 287–297. <https://doi.org/10.3354/meps337287>.
- Hueter, R.E., 1994. Bycatch and Catch-Release Mortality of Small Sharks and Associated Fishes in the Estuarine Nursery Grounds of Tampa Bay and Charlotte Harbor. Final Report. Mote Marine Laboratory, Sarasota, FL.
- Hueter, R.E., 1998. Philopatry, natal homing and localised stock depletion in sharks. *Shark News* 12, 1–2.
- Hueter, R.E., Heupel, M.R., Heist, E.J., Keeney, D.B., 2005. Evidence of philopatry in sharks and implications for the management of shark fisheries. *J. Northwest Atl. Fish. Sci.* 35, 239–247. <https://doi.org/10.2960/J.v35.m493>.
- Kalinowski, S.T., Wagner, A.P., Taper, M.L., 2006. ML-RELATE: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Mol. Ecol. Notes* 6, 576–579. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01256.x>.
- Karl, S.A., Castro, A.L., López, J.A., Charvet, P.L., Burgess, G.H., 2011. Phylogeography and conservation of the bull shark (*Carcharhinus leucas*) inferred from mitochondrial and microsatellite DNA. *Conserv. Genet.* 12, 371–382. <https://doi.org/10.1007/s10592-010-0145-1>.
- Keeney, D.B., Heist, E.J., 2003. Characterization of microsatellite loci isolated from the blacktip shark and their utility in requiem and hammerhead sharks. *Mol. Ecol. Notes* 3, 501–504. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00492.x>.
- Keeney, D.B., Heupel, M.R., Hueter, R.E., Heist, E.J., 2005. Microsatellite and mitochondrial DNA analyses of the genetic structure of blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) nurseries in the northwestern Atlantic, Gulf of Mexico, and Caribbean Sea. *Mol. Ecol.* 14, 1911–1923. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02549.x>.
- Larson, S., Christiansen, J., Griffing, D., Ashe, J., Lowry, A., Andrews, K., 2011. Relatedness and polyandry of sixgill sharks, *Hexanchus griseus*, in an urban estuary. *Conserv. Genet.* 12, 679–690. <https://doi.org/10.1007/s10592-010-0174-9>.
- Larson, S., Farrer, D., Lowry, D., Ebert, D.A., 2015. Preliminary observations of population genetics and relatedness of the broadnose sevengill shark, *Notorynchus cepedianus*, in two northeast Pacific estuaries. *PLoS One* 10, 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129278>.
- Leigh, J.W., Bryant, D., 2015. POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol. Evol.* 6, 1110–1116. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>.
- Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451–1452. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>.
- Lyrholm, T., Leimar, O., Johannesson, B., Gyllenstein, U., 1999. Sex-biased dispersal in sperm whales: contrasting mitochondrial and nuclear genetic structure of global populations. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 266, 347–354. <https://doi.org/10.1098/rspb.1999.0644>.
- Morgan, A., Cooper, P.W., Curtis, T., Burgess, G.H., 2009. Overview of the US east coast bottom longline shark fishery, 1994–2003. *Mar. Fish. Rev.* 71 (1), 23–38.
- Musick, J.A., Burgess, G., Cailliet, G., Camhi, M., Fordham, S., 2000. Management of sharks and their relatives (Elasmobranchii). *Fisheries* 25, 9–13. [https://doi.org/10.1577/1548-8446\(2000\)025<0009:MOSATR>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8446(2000)025<0009:MOSATR>2.0.CO;2).
- Narum, S.R., 2006. Beyond Bonferroni: less conservative analyses for conservation genetics. *Conserv. Genet.* 7, 783–787. <https://doi.org/10.1007/s10592-005-9056-y>.
- Natanson, L.J., Adams, D.H., Winton, M.V., Maurer, J.R., 2014. Age and growth of the bull shark in the Western North Atlantic Ocean. *Trans. Am. Fish. Soc.* 143, 732–743. <https://doi.org/10.1080/00028487.2014.892537>.
- Neer, J.A., Thompson, B.A., Carlson, J.K., 2005. Age and growth of *Carcharhinus leucas* in the northern Gulf of Mexico: incorporating variability in size at birth. *J. Fish. Biol.* 66, 1–14. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2005.00743.x>.
- NMFS (National Marine Fisheries Service), 2006. Final Consolidated Atlantic Highly Migratory Species Fishery Management Plan. NMFS, Silver Spring, Maryland.
- NMFS (National Marine Fisheries Service), 2012. Draft Amendment 5 to the Consolidated Atlantic Highly Migratory Species Fishery Management Plan. NMFS, Silver Spring, Maryland.
- O’Connell, M.T., Shepherd, T.D., O’Connell, A.M.U., Myers, R.A., 2007. Long-term declines in two apex predators, bull sharks (*Carcharhinus leucas*) and alligator gar (*Atractosteus spatula*), in Lake Pontchartrain, an oligohaline estuary in southeastern Louisiana. *Estuaries Coasts* 30, 567–574. <https://doi.org/10.1007/BF02841954>.
- Pardini, A.T., Jones, C.S., Noble, L.R., Kreiser, B., Malcolm, H., Bruce, B.D., Stevens, J.D., Cliff, G., Scholl, M.C., Francis, M., Duffy, C.A., Martin, A.P., 2001. Sex-biased dispersal of great white sharks. *Nature* 412, 139–140. <https://doi.org/10.1038/35084125>.
- Pirog, A., Blaison, A., Jaquemet, S., Soria, L., Magalon, H., 2015. Isolation and characterization of 20 microsatellite markers from *Carcharhinus leucas* (bull shark) and cross-amplification in *Galeocerdo cuvier* (tiger shark), *Carcharhinus obscurus* (dusky shark) and *Carcharhinus plumbeus* (sandbar shark). *Conserv. Genet. Resour.* 7, 121–124. <https://doi.org/10.1007/s12686-014-0308-3>.
- Portnoy, D.S., Medowell, J.R., Thompson, K., Musick, J.A., Graves, J.E., 2006. Isolation and characterization of five dinucleotide microsatellite loci in the sandbar shark, *Carcharhinus plumbeus*. *Mol. Ecol. Notes* 6, 431–433. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01261.x>.
- Portnoy, D.S., Puritz, J.B., Hollenbeck, C.M., Gelseichter, J., Chapman, D., Gold, J.R., 2015. Selection and sex-biased dispersal in a coastal shark: the influence of philopatry on adaptive variation. *Mol. Ecol.* 24, 5877–5885. <https://doi.org/10.1111/mec.13441>.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–959. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x>.
- Rassmann, K., Tautz, D., Trillmich, F., Gliddon, C., 1997. The microevolution of the Galápagos marine iguana *Amblyrhynchus cristatus* assessed by nuclear and mitochondrial genetic analyses. *Mol. Ecol.* 6, 437–452. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1997.00209.x>.
- Simpfendorfer, C., Burgess, G.H., 2009. *Carcharhinus leucas*. The IUCN Red List of Threatened Species 2009. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2009-2.RLTS.T39372A10187195.en>. eT39372A10187195 Downloaded on 15 August 2018.
- Simpfendorfer, C.A., Freitas, G.G., Wiley, T.R., Heupel, M.R., 2005. Distribution and habitat partitioning of immature bull sharks (*Carcharhinus leucas*) in a Southwest Florida estuary. *Estuaries* 28, 78–85. <https://doi.org/10.1007/BF02732755>.
- Stiebens, V.A., Merino, S.E., Roder, C., Chain, F.J., Lee, P.L., Eizaguirre, C., 2013. Living on the edge: how philopatry maintains adaptive potential. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 280. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.0305>. 20130305–20130305.
- Stoner, D.S., Grady, J.M., Priede, K.A., Quattro, J.M., 2003. Amplification primers for the mitochondrial control region and sixth intron of the nuclear-encoded lactate dehydrogenase A gene in elasmobranch fishes. *Cons. Gen.* 4, 805–808.
- Thorburn, D.C., Rowland, A.J., 2008. Juvenile bull sharks *Carcharhinus leucas* (Valenciennes, 1839) in northern Australian rivers. *Beagle Rec. Museums Art Gall North. Territ.* 24, 79–86.
- Tillett, B.J., Meehan, M.G., Field, I.C., Thorburn, D.C., Ovenden, J.R., 2012. Evidence for reproductive philopatry in the bull shark *Carcharhinus leucas*. *J. Fish. Biol.* 80, 2140–2158. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2012.03228.x>.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P., 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* 4, 535–538. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>.
- Waples, R.S., 1998. Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *J. Hered.* 89, 438–450. <https://doi.org/10.1093/jhered/89.5.438>.

VII. Capítulo 3

Evaluación de la filogeografía del tiburón toro en el Océano Atlántico Occidental mediante mitogenomas.

Las especies suelen estar divididas en un número determinado de poblaciones dentro de su distribución geográfica global. Esta división es explicada por la conjunción de factores bióticos y abióticos que incluyen, entre otros, su movilidad y dinámica reproductiva, así como características físicas, geológicas y químicas del ambiente. Las masas continentales, por ejemplo, funcionan como barreras potenciales al flujo genético, impidiendo el entrecruzamiento entre individuos de poblaciones distintas, llegando incluso a ser un mecanismo de especiación. Esto es ejemplificado con organismos marinos ubicados al este y oeste del Istmo de Panamá (Giachini-Toseto et al., 2022), donde resalta la existencia de un gran número de especies alopátricas (Aguilar et al., 2019), pero también divisiones poblacionales.

Otras características hidrológicas pueden limitar el flujo genético entre poblaciones, dependiendo de sus capacidades anatómicas, fisiológicas y reproductivas, tal es el caso de la conocida pluma en Brasil que prácticamente imposibilita el paso de algunas especies de anélidos, mientras que limita la conectividad entre algunas especies de tiburones, pero no en todas (Giachini-Toseto et al., 2022).

La filogeografía fue definida por Avise (2000) como la rama de la biología que estudia la distribución geográfica de los linajes genéticos, preferentemente en el nivel intra-específico. Es un concepto ampliamente relacionado con la estructuración genética de las poblaciones, debido principalmente a cambios climáticos o geológicos ocurridos durante la historia evolutiva de las especies (Kumar y Kumar, 2018). Estos fenómenos en conjunto con elementos biológicos y ecológicos de una especie hacen posible identificar los diferentes factores que han determinado la variabilidad genética en una escala temporal y espacial en poblaciones naturales, lo que fue analizado en este estudio, para el caso particular del tiburón toro a lo largo de su distribución en el AOcc.

La escala geográfica que concierne al objetivo del análisis realizado para este apartado es más amplia que en los anteriores (desde Estados Unidos hasta Brasil), por lo que se vuelve necesario el tomar en cuenta la existencia de niveles de divergencia mayores a los que resultan de procesos como la filopatría, y que resultaron de posibles barreras geográficas que interrumpen o

interrumpieron el flujo genético, y a los posibles procesos geológicos, climáticos y/o evolutivos que dieron lugar a las mutaciones encontradas.

En primer lugar, se analizó la distribución de la variabilidad genética entre individuos inmaduros procedentes de AC tanto en Norteamérica como en el Golfo y Caribe de México, utilizando secuencias del ADNmt completo (mitogenomas). Encontrándose una marcada divergencia entre la parte norte (desde Estados Unidos hasta Veracruz), y un área de crianza en el Caribe de México (Chetumal). El estudio de mitogenomas ha mostrado ser más eficiente para determinar la estructura poblacional en elasmobranchios que el utilizar pocas regiones (Feutry et al., 2014; Feutry et al., 2015; Rangel-Morales et al., 2022).

En segundo lugar, se compararon secuencias de la región control del ADNmt tomadas de los mitogenomas, con secuencias previas de individuos procedentes de Brasil. Encontrándose nuevamente una marcada diferenciación genética.

Los resultados permitieron proponer la existencia de tres linajes mitocondriales altamente divergentes para la especie de estudio en el AOcc. El patrón filogeográfico observado puede deberse a tres razones principales: 1) mutaciones originadas por procesos climáticos como los cambios en el nivel del mar provocados por eventos glaciares 2) una discontinuidad biogeográfica, que, si bien no imposibilita el movimiento de la especie lo limita., como lo es el patrón de corrientes marinas entre Norteamérica y Centroamérica, o la conocida barrera provocada por los afluentes del Amazonas, que limita la migración entre Centroamérica y Sudamérica, y 3) la dinámica reproductiva (principalmente filopatría) que ocasiona la poca movilidad de las hembras, y por lo tanto una composición de haplotipos distinta entre zonas.

Este capítulo está conformado por un artículo titulado: **Mitochondrial DNA genome evidence for the existence of a third divergent lineage in the western Atlantic Ocean for the bull shark (*Carcharhinus leucas*)**, cuya principal contribución fue reportar la existencia de tres linajes divergentes en el AOcc para la especie de estudio, lo que tendría implicaciones de manejo mediante la existencia de tres unidades de pesca, manejo o stocks, y por lo tanto de relevancia para la conservación de la especie.

Mitochondrial DNA genome evidence for the existence of a third divergent lineage in the western Atlantic Ocean for the bull shark (*Carcharhinus leucas*)

Nadia Sandoval Laurrabaquio-Alvarado¹ | Píndaro Díaz-Jaimes²  |
Silvia Hinojosa-Álvarez³ | María del Pilar Blanco-Parra^{4,5,6} | Douglas H. Adams⁷  |
Juan Carlos Pérez-Jiménez⁸ | J. Leonardo Castillo-Géniz⁹

¹Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, Mexico City, Mexico

²Unidad Académica de Ecología y Biodiversidad Acuática, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, Mexico City, Mexico

³Escuela de Ingeniería y Ciencias, Centro de Biotecnología FEMSA, Tecnológico de Monterrey, Monterrey, Mexico

⁴Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico City, Mexico

⁵División de Ciencias e Ingeniería, Universidad de Quintana Roo, Chetumal, Mexico

⁶Fundación internacional para la naturaleza y la sustentabilidad, Chetumal, Mexico

⁷Florida Fish & Wildlife Conservation Commission, Fish & Wildlife Research Institute, Melbourne, Florida

⁸El Colegio de la Frontera Sur, Lerma, Mexico

⁹Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura, Ensenada, Mexico

Correspondence

Píndaro Díaz-Jaimes, Unidad Académica de Ecología y Biodiversidad Acuática, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-305, México DF 04510, Mexico.
Email: pindaro@cmarl.unam.mx

Funding information

NSLA would like to thank the Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología and CONACYT for PhD fellowship support. This study was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) SEP-CONACYT grant 253381.

Abstract

We report for the first time a highly divergent lineage in the Caribbean Sea for the bull shark (*Carcharhinus leucas*) based on the analysis of 51 mitochondrial DNA genomes of individuals collected in the western North Atlantic. When comparing the mtDNA control region obtained from the mitogenomes to sequences reported previously for Brazil, the Caribbean lineage remained highly divergent. These results support the existence of a discrete population in Central America due to a phylogeographic break separating the Caribbean Sea from the western North Atlantic, Gulf of Mexico and South America.

KEYWORDS

bull sharks, genetic divergence, mitogenomes, phylogeography

Oceans cover a wide area of the earth's surface, with divergent oceanographic and ecological characteristics (e.g., temperature, salinity, endemism, species composition and abundance) creating smaller regions (Briggs & Bowen, 2012; Robertson & Cramer, 2014; Toonen *et al.*, 2016; Wilkinson *et al.*, 2009). The variety of physical conditions between regions is usually related to the distribution of genetic variants among populations or species and at different spatial scales (Bowen *et al.*, 2016). Some phylogeographic patterns due to genetic and taxonomic discontinuities have been reported for many

marine species (Briggs & Bowen, 2012), providing useful information for the delimitation of priority conservation areas or evolutionary significant units (ESUs) (Rocha *et al.*, 2007), which are units of conservation that result from independent evolutionary processes allowing the adaptive response to changes in the environment to be preserved. The genetic divergence for many shark species has been linked to gene flow barriers (Dudgeon *et al.*, 2012), but also to ecological (Dimens *et al.*, 2019) and/or reproductive traits (Chapman *et al.*, 2015). Mitochondrial DNA (mtDNA) is effective as a molecular

marker to define genetic divergence at the population or species level in sharks (Fields *et al.*, 2016; Greig *et al.*, 2001; Quattro *et al.*, 2006).

In the western Atlantic Ocean using the mtDNA-Control Region (mtDNA-CR) two divergent mtDNA lineages were reported between the Northern and Southern Hemisphere in several coastal shark species including the blacktip shark *Carcharhinus limbatus* Muller & Henle 1839 (Sodré *et al.*, 2012), the dusky shark *Carcharhinus obscurus* Lesueur 1818 (Benavides *et al.*, 2011), the night shark *Carcharhinus signatus* Poey 1868 (Domingues *et al.*, 2019), the bull shark, *Carcharhinus leucas* Müller & Henle 1839 (Karl *et al.*, 2011) and the tiger shark *Galeocerdo cuvier* Péron & Lesueur, 1822 (Carmo *et al.*, 2019). Similarly, for some species, genetic divergence has been found at a smaller scale among the waters of North and Central America. This has been the case for the blacktip shark (Gledhill *et al.*, 2015; Keeney *et al.*, 2005) and two hammerhead shark species, the bonnethead *Sphyrna tiburo* Linnaeus 1758 and the scalloped hammerhead *Sphyrna lewini* Griffith & Smith, 1834 (Chapman *et al.*, 2009; Fields *et al.*, 2016; Gonzalez *et al.*, 2019; Pinhal *et al.*, 2020), highlighting the existence of a phylogeographic break separating multiple shark populations in the western Atlantic Ocean.

The bull shark is an euryhaline species, with a cosmopolitan distribution in tropical and subtropical waters. It is also associated with coastal and estuarine habitats. Adult females use specific estuarine habitats for parturition. Neonate and juvenile individuals use these estuarine habitats as nurseries (Curtis *et al.*, 2011). Adults are found primarily in shallow ocean waters and tend to remain in the same broad areas over long periods, with limited migratory movements (Carlson *et al.*, 2010; Kohler & Turner, 2019), highlighting the importance of coastal habitats for this species. Records of movements of bull sharks

from the U.S. Atlantic coast to the Caribbean are scarce (Kohler & Turner, 2019). Of 2129 tagged bull shark individuals in the Gulf of Mexico and the Caribbean, only six sharks registered movements between the northern and southern Gulf of Mexico. Genetic analyses based on mtDNA sequences data detected two matrilineal lineages of bull sharks in North and South America (Karl *et al.*, 2011) that were attributed to philopatric behaviour. Philopatry was further confirmed by Sandoval Laurrabaquio-Alvarado *et al.* (2019) in the western North Atlantic Ocean using similar sampling locations (Texas, Louisiana and Florida). However, there is still insufficient information regarding the number and distribution of mitochondrial lineages related to the species' phylogeography in the entire western Atlantic Ocean.

To assess the number and distribution of lineages for bull shark in the western Atlantic Ocean, we analysed the complete mtDNA genome in 51 immature individuals evenly distributed from the northern and southern Gulf of Mexico, the Atlantic coast of Florida and the Caribbean Sea. Additionally, the mtDNA control region obtained from genome sequences was compared with previous mtDNA-CR sequences (810 pb) from Brazil used by Karl *et al.* (2011).

We analysed juvenile bull sharks (<190 cm total length) of six estuaries from the western Atlantic Ocean (Indian River Lagoon, Florida, IRL, $n = 12$), the northern Gulf of Mexico (Charlotte Harbor, Florida, CH, $n = 12$; Texas TEX, $n = 5$; Louisiana LOU, $n = 5$), the southern Gulf of Mexico (Tamiagua, Mexico TAM, $n = 11$) and the Caribbean Sea (Chetumal Bay, Mexico CAR, $n = 6$) (Figure 1). Tissue samples were collected from bull sharks across multiple years (1996–2018) during ongoing fisheries-independent monitoring surveys in U.S. waters and from local commercial fisheries in Mexico and preserved in nondenatured 95% ethanol.

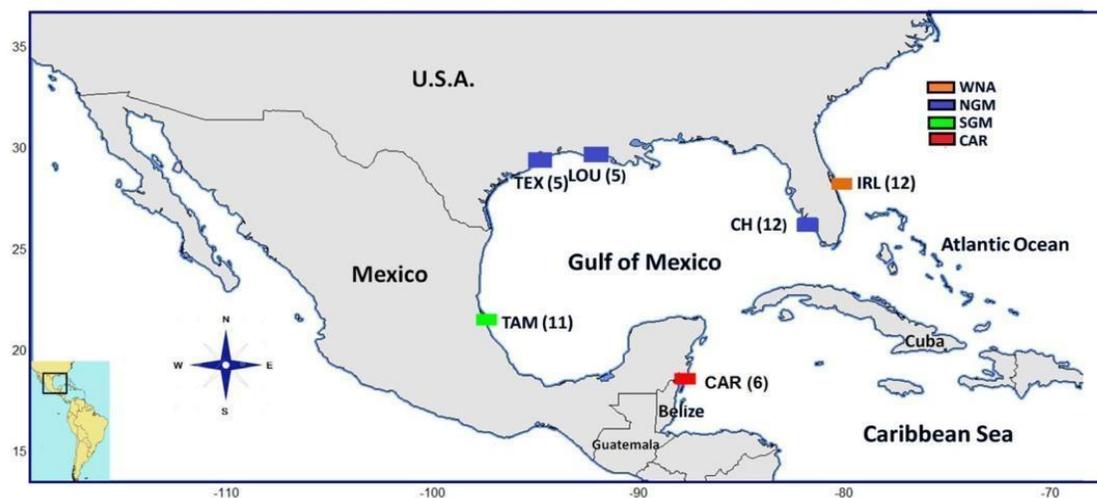


FIGURE 1 Sampling sites and regions (in different colours) from which the sequences of the mtDNA genome were obtained for bull shark *Carcharhinus leucas* individuals. Sampling sites: Texas (TEX), Louisiana (LOU), Charlotte Harbor (CH), Indian River Lagoon (IRL), Tamiagua (TAM), Caribbean (CAR), Western north Atlantic (WNA), Northern Gulf of Mexico (NGM), Southern Gulf of Mexico (SGM), Caribbean (CAR). Numbers in parenthesis are the sample size for each location. Colours for locations represent the studied regions: western North Atlantic (orange), northern Gulf of Mexico (blue), southern Gulf of Mexico (green) and Caribbean (red)

Genomic DNA was obtained using the phenol-chloroform protocol (Sambrook *et al.*, 1989) and fragmented by sonication using a bio-disruptor. Fragmented DNA was cleaned using magnetic beads and libraries prepared using the KAPA HiFi HotStart PCR Kit, according to the manufacturer's instructions and sequenced using the Illumina sequencer MiSeq v3 600. The mtDNA genomes were assembled with Geneious v 10.2.3 (Kearse *et al.*, 2012) using as reference the bull shark mitochondrial genome of an individual collected from the Pacific Ocean in Taiwan Strait off China (GenBank accession number NC_023522; Chen *et al.*, 2014). The quality of sequences was measured on the basis of the deep sequencing, which was considered to be adequate at a minimum of 5x per lecture. The determination of mutations was assessed by checking each substitution against the mtDNA genome of the bull shark from China. Genetic diversity parameters were calculated with DnaSP v.6 (Rozas *et al.*, 2017), and genetic differentiation (based on Φ_{ST} Tamura and Nei distance with 20,000 permutations) estimated using Arlequin v.3.5.2.2 (Excoffier *et al.*, 2005). A phylogenetic analysis was conducted with BEAST v.1.10.14 (Suchard *et al.*, 2018) using the mitogenomes obtained for this research and other shark mitogenomes of the order *Carcharhiniformes* Compagno 1977 obtained from GenBank (accession numbers KC470543.1, KJ720818.1, KP091436.1, NC_023522.1, NC_024055.1, NC_024862.1, NC_025520.1, NC_026696.1, NC_027081.1, MN943498.1). Divergence times were estimated using three independent runs with 10,000, 100,000 and 1,000,000 generations, respectively, selecting the HKY model and a relaxed clock rate. To produce one single tree, we used LogCombiner and TreeAnnotator with a burn-in of 1,000,000 and edited with FigTree v.1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). The Isolation by Distance model (Slatkin, 1993) was tested by evaluating the correlation between the logarithmic distance in kilometres, measured as the shortest coastal line separating localities, and the linearized Slatkin genetic distance based on pairwise Φ_{ST} estimates in ARLEQUIN.

A segment of the mtDNA control region (810 bp) was obtained from the 51 mitogenomes sequenced for comparisons to sequences

from Brazil ($n = 49$) used in Karl *et al.* (2011). Haplotype networks for the mtDNA genomes and the mtDNA-CR were obtained using PopART with the TCS algorithm (Clement *et al.*, 2002).

We obtained 51 mtDNA genomes (16,707–16,708 bp) of immature individuals that resulted in a total of 30 haplotypes with each locality displaying 3 to 10 haplotypes. A high haplotype diversity ($Hd = 0.730$ – 1.000) and low nucleotide diversity ($\pi = 0.00005$ – 0.00004) was estimated (Table 1). Pairwise-sample Φ_{ST} estimates resulted in high significant differences between CAR and the other locations ($\Phi_{ST} = 0.88$ – 0.96 ; $P = <0.00000$ – 0.0024 ; Table 2). The comparison between IRL against LOU was significant ($\Phi_{ST} = 0.14$; $P = 0.046$). When using the 810 bp fragment of the mtDNA-CR to assess divergence between western North Atlantic, the Gulf of Mexico and South America, the pairwise Φ_{ST} estimates resulted in highly significant differences among these three regions (Table 2); the Brazilian and the Caribbean locations showed significant differences between them, but also when compared to locations from the Gulf of Mexico and the western North Atlantic (IRL-Florida Atlantic) (range $\Phi_{ST} = 0.597$ – 1.000 , $P < 0.001$).

The phylogenetic tree (Figure 2a), using mtDNA genomes, indicates two divergent lineages separating the Gulf of Mexico/Atlantic and the Caribbean (CAR). This pattern was supported by the haplotype network. Furthermore, there was a second clade comprising haplotypes exclusively from the Caribbean Sea, which separated from those of the western North Atlantic and Gulf of Mexico for a high number of mutations (30–37) (Figure 2b). This pattern of genetic divergence was further confirmed in the haplotype network obtained from the 810 bp mtDNA-CR fragment which, in addition, showed a third mtDNA lineage comprising individuals from Brazil (Figure 2c). This evidence clearly confirms the existence of three mtDNA lineages in the western Atlantic Ocean.

The distribution and frequency of the mitochondrial DNA lineages are explained by the species evolutionary history, but also by reproductive and population dynamics. In the case of the bull shark, two matrilineal lineages have been reported in the western Atlantic

TABLE 1 Sampling locations and regions studied in the western north Atlantic and summary statistics per location

			Latitude–longitude	N	Nh	h	π	S
Western North Atlantic	IRL		28°03'19"N –80°34'34"W	12	4	0.803	0.00040	15
Northern Gulf of Mexico	TEX		29°34'11"N –94°56'12"W	5	5	1.000	0.00040	15
	LOU		25°51'19"N –91°12'92"W	5	5	1.000	0.00010	6
	CH		26°46'33"N –82°08'31"W	12	7	0.879	0.00030	18
Southern Gulf of Mexico	TAM		21°57'36"N –97°59'41"W	11	10	0.982	0.00030	24
Caribbean	CAR		18°20'0"N –88°5'0"W	6	3	0.733	0.00005	2

Note. π , nucleotide diversity; h, haplotype diversity; N, sample size, Nh, number of haplotypes; S, segregating sites.

	IRL (12)	CH (12)	TEX (5)	LOU (5)	TAM (11)	CAR (8)	BZ (49)
IRL (12)	–	0.159	0.008	0.526	0.080	0.862***	0.682***
CH (12)	0.001	–	0.006	0.000	0.000	0.741***	0.683***
TEX (5)	0.137*	0.016	–	0.160	0.122	1.000***	0.799***
LOU (5)	0.080	0.063	0.062	–	0.000	0.658***	0.597***
TAM (11)	0.011	0.000	0.005	0.015	–	0.826***	0.682***
CAR (8)	0.882***	0.904***	0.916**	0.961**	0.908***	–	0.679***

TABLE 2 Pairwise ϕ_{ST} estimates between locations for the whole mtDNA genomes (below diagonal) and for the 810 bp mtDNA-CR sequences (above diagonal)

Sample size for each locality is shown in parenthesis for the mtDNA genome (column) and mtDNA-CR (row). Estimates showing significant P values are in bold.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

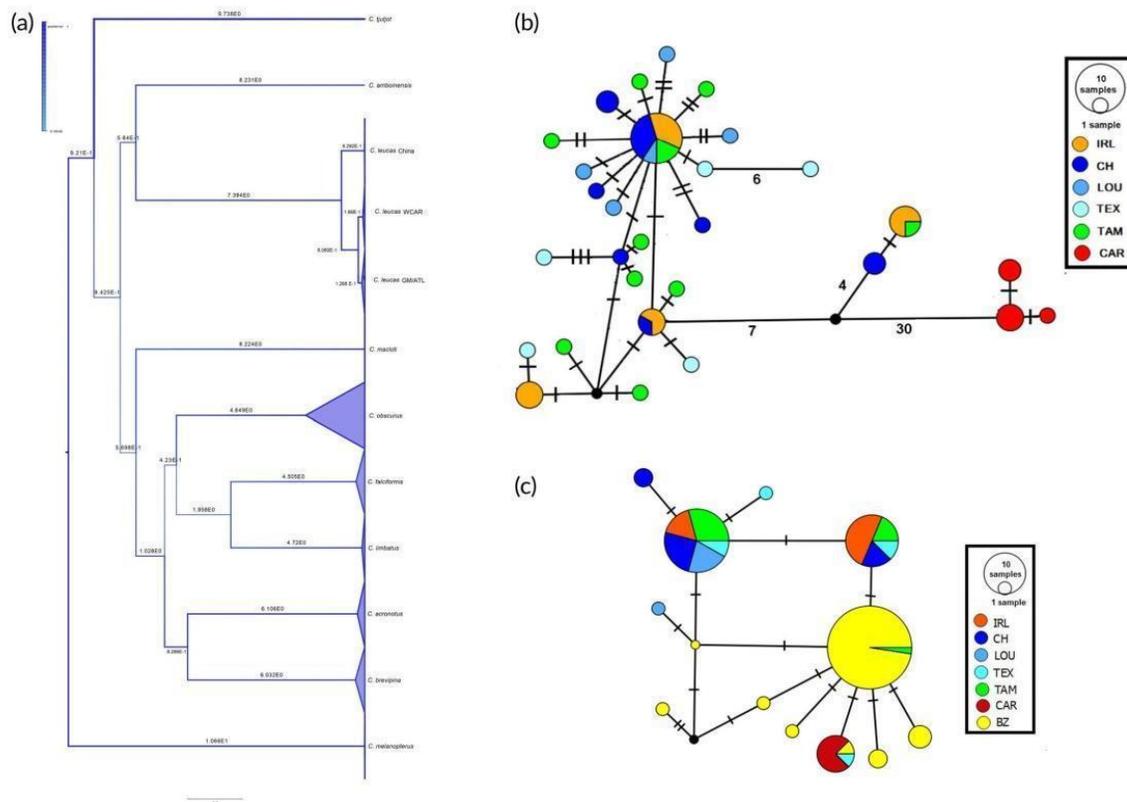


FIGURE 2 (a) Phylogenetic tree based on the mtDNA genome of bull shark *Carcharhinus leucas* against representative Carcharhinid species obtained with BEAST. Numbers in branches are estimates of divergence times in number of substitutions per site per million years. Posterior probabilities according to the Bayesian approximation are represented by the blue colour gradient. GM/ATL, Gulf of Mexico and Atlantic; CAR, Caribbean. Minimum spanning tree using the whole mtDNA genome sequences (b) and using the 810 bp mtDNA-CR fragment (c) Texas (TEX), Louisiana (LOU, Charlotte Harbor (CH), Indian River Lagoon (IRL), Tamiahua (TAM), Caribbean (CAR) and Brazil (BZ). Circle size is according to the haplotype abundance and intermediate lines/numbers in branches are the mutational steps between haplotypes

Ocean, corresponding to North America and South America (Karl *et al.*, 2011), but so far the limits of these possible populations and the genetic connection of these two broad regions with intermediate localities is unknown.

This study focused on immature individuals from the western North Atlantic, Gulf of Mexico and Caribbean Sea. This approach using juveniles aimed to identify the possible genetic signature in the area of origin, avoiding the potential bias from sampling adult

individuals which usually move to other areas. Neonates and juveniles typically remain closer to their natal site (Curtis *et al.*, 2011; Thorburn & Rowland, 2008), and contain the genetic signature of those specific locations.

The haplotypes using the complete mitogenome (16,707–16,708 pb) displayed a homogeneous distribution among areas of the Atlantic, and the northern and southern Gulf of Mexico, concordant with previous conventional tracking studies (Kohler & Turner, 2019). However, the Caribbean Sea had exclusive and highly divergent haplotypes. This is relevant because the tissue samples in this location were collected across multiple years (2013–2018), suggesting temporal stability of the genetic signature in this area, and not due to random events, including the close relationship of individuals.

The level of divergence based on the number of site differences among the most abundant haplotype from the Caribbean Sea and from North America (38 SNPs) is remarkable, and was higher than that reported between mitogenomes of *S. zygaena* Linnaeus 1758 from the East and West Atlantic (13 different SNPs; Guy *et al.*, 2017). Mitogenomes from the western North Atlantic and CAR diverged in 153–156 SNPs, a similar number of differences as compared to the bull shark mitogenome from China (156; Chen *et al.*, 2014), which is concordant with previous reports of differences between the Atlantic and Pacific lineages by Naylor *et al.* (2012) and Pirog *et al.* (2019).

The mitochondrial genome under neutral evolution under the effect of a phylogeographic break accumulates mutations at a constant rate that results in levels of divergence as observed here. As a contrast, the segregation of maternal lineages driven by female philopatry results in differences in haplotype frequencies based on a few nucleotide differences. Sex-biased dispersal usually has an effect on increasing haplotype frequencies of maternal lineages in a particular nursery area as has been reported for the bull shark (Sandoval Laurrabaquio-Alvarado *et al.*, 2019) and other shark species (Chapman *et al.*, 2015).

The high genetic divergence observed between mtDNA lineages may result from a phylogeographic or ecological break limiting gene flow between populations from the Gulf of Mexico and the Caribbean Sea. Similar divergence between the North Atlantic and the Gulf of Mexico compared to Central America has been reported based on mtDNA-CR sequences for the blacktip shark (Keeney *et al.*, 2005), the scalloped hammerhead (Chapman *et al.*, 2009; Pinhal *et al.*, 2020) and the bonnethead (Fields *et al.*, 2016), supporting the existence of limited gene flow between these two regions. Genetic divergence has been also reported for sharks among the waters of North and South America (Bernard *et al.*, 2017; Karl *et al.*, 2011), as we corroborated in this study in the comparisons of all our western North Atlantic and Brazilian mtDNA-CR sequences.

The magnitude of population differentiation reported for shark species in the western Atlantic Ocean seems to be proportional to the distance among localities. As an example, in the blacktip shark, significant differences were estimated between the western North Atlantic, the Gulf of Mexico (southern and northern) and Yucatan (Φ_{SC} estimated varied from 0.089 to 0.317). However, higher genetic differences were found when compared to Belize in the Caribbean Sea,

$\Phi_{SC} > 0.7$, $P < 0.00001$ (Gledhill *et al.*, 2015; Keeney *et al.*, 2005) and between the northern and southern locations in the western Atlantic Ocean, $\Phi_{SC} = 0.8$ (Sodré *et al.*, 2012). Nevertheless, there was no correlation between geographical and genetic distances for either the mtDNA genomes data set ($r^2 = 0.116$, $P > 0.05$) or the mtDNA-CR sequences ($r^2 = 0.371$, $P > 0.05$), supporting the existence of a phylogeographic break separating the Caribbean Sea from the other regions.

Similar levels of genetic differences based on mtDNA-CR sequences were also reported for bull sharks between samples from the US Atlantic and the northern Gulf of Mexico, $\Phi_{ST} = 0.097$ to 0.27 (Sandoval Laurrabaquio-Alvarado *et al.*, 2019) and between locations from the northern and southern western Atlantic, $\Phi_{ST} > 0.8$ (Karl *et al.*, 2011). In the present study, Φ_{ST} estimates coincide largely with these levels of divergence (western North Atlantic vs. Caribbean Sea, $\Phi_{ST} > 0.7$; Central America vs. South America, $\Phi_{ST} = 0.67$).

The haplotype network comparing the Brazilian, North American and Caribbean samples (Figure 2c) is similar to those reported for the blacktip shark and scalloped hammerhead (Gledhill *et al.*, 2015; Pinhal *et al.*, 2020). Within these three mitochondrial lineages of the bull shark in the western Atlantic (north, central and south), some haplotypes are shared among these areas. In all networks the genetic lineages are separated by one or two mutations using the mtDNA-CR. Our results show that a better resolution in the extent of genetic divergence is possible by using the complete mitochondrial genome. Future efforts should include mitogenomes from South America and also increase the number of mitogenomes from Central America.

In the western Atlantic Ocean, several provinces and eco-regions have been documented based on differences in oceanographic features (Robertson & Cramer, 2014; Wilkinson *et al.*, 2009) generating a variety of habitats but also limitations to connectivity between areas for a variety of fish species (Carrillo *et al.*, 2015). The complex dynamics of the Caribbean Current generates three major regions: a northern region dominated by the strong northerly flow of this current, a southern region with weak southward or variable flow of the current, and an intermediate region between these two areas which acts as a boundary between the northern and southern circulation regimes (Carrillo *et al.*, 2015; 2017).

Differences in relevant reproductive characteristics for bull sharks, such as length at first maturity and potential reproductive asynchrony between North America and Central America, have been reported (Jenson, 1976; Castro, 2012), and may result in limited interactions between sharks of both regions representing potential reproductive barriers between populations. Tagging data suggest limited movement of bull sharks from North American waters (Carlson *et al.*, 2010; Kohler & Turner, 2019), similar to other shark species (e.g., scalloped hammerhead, and tiger shark; Rooker *et al.*, 2019).

The highly significant genetic differences between bull shark populations from North and Central America, the reported differences in reproductive parameters for the species among these areas, and the evidence of divergent lineages found for other related shark species among these areas suggests the existence of a divergent lineage of bull sharks in Central America, with a different evolutionary history

from those previously reported for North and South America. By using a mutational rate between 0.8% for scalloped hammerheads (Duncan *et al.*, 2006) and 0.4% for blacktip sharks (Keeney & Heist, 2006) and a generational time of 15 years for bull sharks (Natanson *et al.* 2014), the time for divergence between North and Central America was estimated between 68,000 and 126,700 years. Sea levels in the Caribbean Sea declined during glacial periods below -14.6 m on average that have been dated to occur 86,600 years ago (Moseley *et al.*, 2013). The decrease in sea level might have reduced access to estuaries, which are primary habitats for the species as nurseries creating a gap in the species distribution across the western Atlantic leading to the interruption of the gene flow between the Gulf of Mexico and Caribbean. However, since results in the present study are based on the single use of mitochondrial sequences, additional data would be required to clearly determine whether the divergence signal is driven entirely by philopatry or due to limited dispersion between areas separated by phylogeographic discontinuities.

Limitations to gene flow between populations from the above-mentioned biogeographical provinces requires evidence from nuclear DNA markers to confirm that the geographic break separating the western North Atlantic and the Caribbean plays a paramount role in isolating populations of both areas. In previous studies using microsatellite markers, significant genetic differences were reported between the western North Atlantic and South America, $\Phi_{ST} = 0.009$, $P < 0.05$ (Karl *et al.*, 2011). However, results were based on the use of only five microsatellite loci and reported differences require further confirmation because of the low number of markers used. Additional studies based on genomics would be useful in the definition of the bull shark population genetic structure in the western Atlantic Ocean.

In conclusion, this study provides consistent evidence for the existence of three independent evolutionary bull shark lineages in the entire western Atlantic Ocean: the first comprising the western North Atlantic and Gulf of Mexico, the second in Central America and the third in South America. These results add to previous genetic patterns reporting regional divergence and need to be considered for the implementation of management strategies for species conservation.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to M. en C. Melina Ricaño Soriano for sample collection from Tamiagua and also to Andrés López for providing the sequences from Brazil previously reported in Karl *et al.* (2011). NSLA would like to thank the Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología and CONACYT for PhD fellowship support. This study was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) SEP-CONACYT grant 253381. Bioinformatic analyses were carried out on HP system cluster platform 3000SL "Miztli" under Project LANCAD-UNAM-DGTIC-341 (2018).

CONTRIBUTIONS

P.D.J., N.S.L.A. and S.H.A. conceived and designed the study. N.S.L.A. and S.H.A. completed the laboratory work and completed writing. P.D.J., D.A. and N.S.L.A. drafted the manuscript with the

support of P.B.P., D.A., J.C.P.J. and L.C.G. P.B.P., D.A. and J.C.P.J. provided tissue samples.

ETHICS STATEMENT

All sharks were sampled by authorized staff under official permits or scientific exemptions of U.S. state government agencies whereas samples from Mexico were obtained from commercial catches.

ORCID

Píndaro Díaz-Jaimes  <https://orcid.org/0000-0002-3230-3538>

Douglas H. Adams  <https://orcid.org/0000-0002-3539-6629>

REFERENCES

- Benavides, M. T., Horn, R. L., Feldheim, K. A., Shivji, M. S., Clarke, S. C., Winter, S., ... Chapman, D. D. (2011). Global phylogeography of the dusky shark *Carcharhinus obscurus*: Implications for fisheries management and monitoring the shark fin trade. *Endangered Species Research*, 14, 13–22. <https://doi.org/10.3354/esr00337>.
- Bernard, A. M., Horn, R. L., Chapman, D. D., Feldheim, K. A., Garla, R. C., Brooks, E. J., ... Shivji, S. M. (2017). Genetic connectivity of a coral reef ecosystem predator: The population genetic structure and evolutionary history of the Caribbean reef shark (*Carcharhinus perezii*). *Journal of Biogeography*, 44, 2488–2500. <https://doi.org/10.1111/jbi.13062>.
- Bowen, B. W., Gaither, M. R., DiBattista, J. D., Lacchei, M., Andrews, K. R., Grant, W. S., ... Briggs, J. C. (2016). Comparative phylogeography of the ocean planet. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113, 7962–7969. <https://doi.org/10.1073/pnas.1602404113>.
- Briggs, J. C., & Bowen, B. W. (2012). A realignment of marine biogeographic provinces with particular reference to fish distributions. *Journal of Biogeography*, 39, 12–30. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2011.02613.x>.
- Carlson, J. K., Ribera, M. M., Conrath, C. L., Heupel, M. R., & Burgess, G. H. (2010). Habitat use and movement patterns of bull sharks *Carcharhinus leucas* determined using pop-up satellite archival tags. *Journal of Fish Biology*, 77, 661–675. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2010.02707.x>.
- Carmo, C. B., Ferrette, B. L. S., Camargo, S. M., Roxo, F. F., Coelho, R., Garla, R. C., ... Mendonça. (2019). A new map of the tiger shark (*Galeocerdo cuvier*) genetic population structure in the western Atlantic Ocean: Hypothesis of an equatorial convergence Centre. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 29, 760–772. <https://doi.org/10.1002/aqc.3029>.
- Carrillo, L., Johns, E. M., Smith, R. H., Lamkin, J. T., & Largier, J. L. (2015). Pathways and hydrography in the Mesoamerican barrier reef system part 1: Circulation. *Continental Shelf Research*, 109, 164–176.
- Carrillo, L., Tamkin, J. T., Johns, E. M., Vásquez-Yeomans, L., Sosa-Cordero, F., Malca, E., ... Gerard, T. (2017). Linking oceanographic processes and marine resources in the western Caribbean Sea large marine ecosystem subarea. *Environmental Development*, 22, 84–96.
- Castro, J. I. (2012). The sharks of North America. *Copeia*, 613, 765–767.
- Chapman, D. D., Feldheim, K. A., Papastamatiou, Y. P., & Hueter, R. E. (2015). There and Back again: A review of residency and return migrations in sharks, with implications for population structure and management. *Annual Reviews of Marine Sciences*, 7, 547–570. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010814-015730>.
- Chapman, D. D., Pinhal, D., & Shivji, M. S. (2009). Tracking the fin trade: Genetic stock identification in western Atlantic scalloped hammerhead sharks *Sphyrna lewini*. *Endangered Species Research*, 9, 221–228. <https://doi.org/10.3354/esr00241>.
- Chen, X., Liu, M., Peng, Z., & Shi, X. (2014). Mitochondrial genome of the bull shark *Carcharhinus leucas* (Carcharhiniformes: Carcharhinidae).

- Mitochondrial DNA*, 1736, 1–2. <https://doi.org/10.3109/19401736.2013.855906>.
- Clement, M., Snell, Q., Walker, P., Posada, D., & Crandall, K. (2002). TCS: Estimating gene genealogies. *Parallel and Distributed Processing Symposium, International Proceedings*, 2, 184.
- Curtis, T. H., Adams, D. H., & Burgess, G. H. (2011). Seasonal distribution and habitat associations of bull sharks in the Indian River Lagoon, Florida: A 30-year synthesis. *Transactions of the American Fisheries Society*, 140, 1213–1226. <https://doi.org/10.1080/00028487.2011.618352>.
- Dimens, P. V., Willis, S., Grubbs, D. R., & Portnoy, D. S. (2019). A genomic assessment of movement and gene flow around the South Florida vicariance zone in the migratory coastal blacknose shark, *Carcharhinus acronotus*. *Marine Biology*, 166, 7. <https://doi.org/10.1007/s00227-019-3533-1>.
- Domingues, R. R., Bruels, C. C., Gadig, O. B. F., Chapman, D. D., Hilsdorf, A. W. S., & Shivji, M. S. (2019). Genetic connectivity and phylogeography of the night shark (*Carcharhinus signatus*) in the western Atlantic Ocean: Implications for conservation management. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 29, 102–114. <https://doi.org/10.1002/aqc.2961>.
- Dudgeon, C. L., Blower, D. C., Broderick, D., Giles, J. L., Holmes, B. J., Kashiwagi, T., ... Ovenden, J. R. (2012). A review of the application of molecular genetics for fisheries management and conservation of sharks and rays. *Journal of Fish Biology*, 80, 1789–1843. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2012.03265.x>.
- Duncan, K. M., Martin, A. P., Bowen, B. W., & de Couet, H. G. (2006). Global phylogeography of the scalloped hammerhead shark (*S. lewini*). *Molecular Ecology*, 15, 2239–2251.
- Excoffier, L., Laval, G., & Schneider, S. (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, 1, 47–50.
- Fields, A. T., Feldheim, K. A., Gelsleichter, J., Pfoertner, C., & Chapman, D. D. (2016). Population structure and cryptic speciation in bonnethead sharks *Sphyrna tiburo* in the South-Eastern U.S.A. and Caribbean. *Journal of Fish Biology*, 89, 2219–2233. <https://doi.org/10.1111/jfb.13025>.
- Gledhill, K. S., Kessel, S. T., Guttridge, T. L., Hansell, A. C., Bester-van der Merwe, A. E., Feldheim, K. A., ... Chapman, D. D. (2015). Genetic structure, population demography and seasonal occurrence of blacktip shark *Carcharhinus limbatus* in Bimini, The Bahamas. *Journal of Fish Biology*, 87, 1371–1388. <https://doi.org/10.1111/jfb.12821>.
- Gonzalez, C., Gallagher, A. J., & Caballero, S. (2019). Conservation genetics of the bonnethead shark *Sphyrna tiburo* in Bocas del Toro, Panama: Preliminary evidence of a unique stock. *PLoS One*, 14, 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220737>.
- Greig, T. W., Moore, M. K., Woodley, C. M., & Quattro, J. M. (2001). Mitochondrial gene sequences useful for species identification of western North Atlantic Ocean sharks. *Fishery Bulletin*, 103, 516–523.
- Guy, D. S., Ruck, C. L., Lopez, J. V., & Shivji, M. S. (2017). Complete mitogenome sequences of smooth hammerhead sharks, *Sphyrna zygaena*, from the eastern and western Atlantic. *Mitochondrial DNA Part B Resources*, 2, 806–807. <https://doi.org/10.1080/23802359.2017.1390421>.
- Jenson, N. H. (1976). Reproduction of the Bull Shark, *Carcharhinus leucas*, in the Lake Nicaragua-Rio San Juan System. Investigations of the Ichthyofauna of Nicaraguan Lakes. Paper 40, <http://digitalcommons.unl.edu/ichthyofauna/40>.
- Karl, S. A., Castro, A. L. F., Lopez, J. A., Charvet, P., & Burgess, G. H. (2011). Phylogeography and conservation of the bull shark (*Carcharhinus leucas*) inferred from mitochondrial and microsatellite DNA. *Conservation Genetics*, 12, 371–382. <https://doi.org/10.1007/s10592-010-0145-1>.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., ... Drummond, A. (2012). Geneious basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 28, 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>.
- Keeney, D. B., Heupel, M. R., Hueter, R. E., & Heist, E. J. (2005). Microsatellite and mitochondrial DNA analyses of the genetic structure of blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) nurseries in the northwestern Atlantic, Gulf of Mexico, and Caribbean Sea. *Molecular Ecology*, 14, 1911–1923. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02549.x>.
- Keeney, D. B., & Heist, E. J. (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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03036.x>.
- Kohler, N. E., & Turner, P. A. (2019). Distributions and movements of Atlantic shark species: A 52-year retrospective atlas of mark and recapture data. *Marine Fisheries Review*, 81, 1–93. <https://doi.org/10.7755/mfr.81.2.1>.
- Moseley, G. E., Smart, P. L., Richards, D. A., & Hoffman, D. L. (2013). Speleothem constraints on marine isotope stage (MIS) 5 relative sea levels, Yucatan peninsula, Mexico. *Journal of Quaternary Science*, 28, 293–300. <https://doi.org/10.1002/jqs.2613>.
- Natanson, L. J., Adams, H. D., Winton, M. V., & Maurer, J. R. (2014). Age and growth of the bull shark in the Western North Atlantic Ocean. *Transactions of the American Fisheries Society*, 143, 732–743. <https://doi.org/10.1080/00028487.2014.892537>.
- Naylor, G. J. P., Cairns, N. J. H., Jensen, K., Rosana, K. A. M., White, W. T., & Last, P. R. (2012). A DNA sequence-based approach to the identification of shark and ray species and its implications for global elasmobranch diversity and parasitology. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 367, 1–262. <https://doi.org/10.1206/754.1>.
- Pinhal, D., Domingues, R. R., Bruels, C. C., Ferrete, B. L. S., Gadig, O. B. F., & Shivji, M. S. (2020). Restricted connectivity and population genetic fragility in a globally endangered hammerhead shark. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 30, 501–517. <https://doi.org/10.1007/s11160-020-09607-x>.
- Pirog, A., Ravnigé, V., Fontaine, M. C., Rieux, A., Gilibert, A., Cliff, G., ... Magalon, H. (2019). Population structure, connectivity, and demographic history of an apex marine predator, the bull shark *Carcharhinus leucas*. *Ecology and Evolution*, 9, 12980–13000. <https://doi.org/10.1002/ece3.5597>.
- Quattro, J. M., Stoner, D. S., Driggers, W. B., Anderson, C. A., Priede, K. A., Hoppmann, E. C., ... Grady, J. M. (2006). Genetic evidence of cryptic speciation within hammerhead sharks (genus *Sphyrna*). *Marine Biology*, 148, 1143–1155. <https://doi.org/10.1007/s00227-005-0151-x>.
- Robertson, D. R., & Cramer, K. L. (2014). Defining and dividing the greater Caribbean: Insights from the biogeography of shorefishes. *PLoS One*, 9, e102918. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102918>.
- Rocha, L. A., Craig, M. T., & Bowen, B. W. (2007). Phylogeography and the conservation of coral reef fishes. *Coral Reefs*, 26, 501–512. <https://doi.org/10.1007/s00338-007-0261-7>.
- Rooker, J. R., Dance, M. A., Wells, R. J. D., Ajemian, M. J., Block, B. A., Castleton, M. R., ... Walter, J. F. (2019). Population connectivity of pelagic megafauna in the Cuba-Mexico-United States triangle. *Scientific Reports*, 9, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38144-8>.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DeBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., & Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP v6: DNA sequence polymorphism analysis of large datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 34, 3299–3302.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandoval Laurrabaquio-Alvarado, N., Islas-Villanueva, V., Adams, D. H., Uribe-Alcocer, M., & Díaz-Jaimes, P. (2019). Genetic evidence for regional philopatry of the bull shark (*Carcharhinus leucas*), to nursery areas in estuaries of the Gulf of Mexico and western North Atlantic Ocean. *Fisheries Research*, 209, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2018.09.013>.
- Slatkin, M. (1993). Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution*, 47, 264–279. <https://doi.org/10.2307/2410134>.

- Sodré, D., Rodrigues-Filho, L. F. S., Souza, R. F. C., Rêgo, S. P., Schneider, H., Sampaio, I., & Vallinoto, M. (2012). Inclusion of south American samples reveals new population structuring of the blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) in the western Atlantic. *Genetics and Molecular Biology*, 35, 752–760. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572012005000062>.
- Suchard, M. A., Lemey, P., Baele, G., Ayres, D. L., Drummond, A. J., & Rambaut, A. (2018). Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1. *Virus Evolution*, 4, vey016 <https://doi.org/10.1093/ve/vey016>.
- Thorburn, D. C., & Rowland, A. J. (2008). Juvenile bull sharks *Carcharhinus leucas* (Valenciennes, 1839) in northern Australian rivers. *The Beagle: Records of the Museums and Art Galleries of the Northern Territory*, 24, 79–86.
- Toonen, R. J., Bowen, B. W., Iacchi, M., & Briggs, J. C. (2016). Biogeography, marine. In R. M. Kliman (Ed.), *Encyclopedia of evolutionary biology* (Vol. 1, pp. 166–178). Oxford, UK: Academic Press.
- Wilkinson, T., Wiken, E., Bezaury-Creel, J., Hourigan, T., Agardy, T., Hermann, H., ... Padilla, M. (2009). *Marine ecoregions of North America* (p. 200). Montreal, QC, Canada: Commission for Environmental Cooperation.

How to cite this article: Laurrabaquio-Alvarado NS, Díaz-Jaimes P, Hinojosa-Álvarez S, et al. Mitochondrial DNA genome evidence for the existence of a third divergent lineage in the western Atlantic Ocean for the bull shark (*Carcharhinus leucas*). *J Fish Biol.* 2021;1–8. <https://doi.org/10.1111/jfb.14698>

VIII. Capítulo 4

Análisis cualitativo de datos pesqueros publicados sobre tiburón toro en el Golfo y Caribe de México: implicaciones para su manejo y conservación.

La pesquería de tiburones es una actividad económica importante en el Golfo de México y Caribe (DOF, 2022), está conformada por especies con un diferente grado de vulnerabilidad y productividad biológica, lo que entre otros factores ecológicos y socioeconómicos debe tomarse en cuenta para procurar una pesca sostenible de este recurso (Pérez-Jiménez y Méndez-Loeza, 2015; Bravo-Zavala et al., 2022). En general, en México, existen diversos limitantes para lograr la sostenibilidad de los tiburones como un recurso económico, entre lo que podemos mencionar, la falta de información de captura por especie (Bonfil, 1997), y en muchos casos falta de conocimiento de la pesquería, y de estrategias de conservación a nivel regional y local, lo que en gran medida está influenciado por la abundancia relativa en las diferentes regiones donde se capturan determinadas especies y de cómo una comunidad específica hace uso del recurso.

Particularmente, el tiburón toro (*Carcharhinus leucas*) es una especie importante de manera comercial, ecológica y turística en el Caribe y Golfo de México. Debido a esto, es necesario conocer y analizar información procedente de datos pesqueros procedentes de diferentes fuentes bibliográficas. Esta recopilación de información pesquera nos permitirá conocer el nivel de presión pesquera que puede estar experimentando la especie en los diferentes estados que conforman el Golfo de México y Caribe. El objetivo del presente capítulo fue recopilar y analizar de manera cualitativa la información sobre el tiburón toro publicada tanto en tesis académicas como artículos científicos en el Golfo de México Sur y Caribe mexicano. Para poder realizar este análisis, se realizó una búsqueda de bibliografía relevante que tuviera información sobre los siguientes rubros: ubicación, abundancia relativa, temporalidad y características reproductivas.

El análisis realizado resalta la importancia de la especie en los principales registros de capturada en todos los estados que conforman el Golfo de México y Caribe (Bonfil, 1997; Castillo-Géniz et al., 1998; Blanco-Parra et al., 2016; DOF 2022), así como, señalar que la pesquería de la especie en esta zona puede suponer un riesgo debido a la alta presencia de hembras adultas (Pérez-Jiménez

y Mendez-Loeza, 2015), algunas preñadas (Castillo-Géniz 2001; Pérez-Jiménez et al., 2020), neonatos y juveniles (Bonfil, 1997; Castillo-Géniz, 2001), considerando además su baja productividad biológica (Castillo-Géniz, 2001).

Metodología

Se realizó una revisión de literatura (tesis y artículos científicos) sobre la pesquería de tiburón toro en la plataforma de google académico, y en las bases de datos de las universidades públicas de los estados que conforman el Caribe y Golfo de México y de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se revisaron los textos que tuvieran información acerca de los siguientes rubros: ubicación, abundancia relativa, temporalidad y características reproductivas. Fueron utilizados los siguientes criterios de búsqueda: tiburón (es), tiburón toro, pesca, pesquería, Golfo de México y Caribe de México, México. Tanto por separado como combinados y en español e inglés, dependiendo de la plataforma de búsqueda.

Los datos del Golfo de México para este análisis provienen principalmente de los siguientes textos: Marín-Osorno, (1992); Bonfil, (1997); Castillo-Géniz et al., (1998); Castillo-Géniz, (2001); Pérez-Jiménez y Mendez-Loeza (2015); Pérez-Jiménez et al., (2016); Pérez-Jiménez et al., 2020) y en el Diario Oficial de la Federación (DOF, 2022). Para la zona del Caribe de México, existieron menos datos publicados, se retoma el artículo de Bonfil, (1997) y el DOF (2022), además se agregan los de Blanco-Parra et al. (2016 y 2022). Cabe señalar que en algunos de los artículos se hizo una revisión de textos anteriores, por lo que sirven como base para saber que se ha escrito al respecto, de esta manera, además de los escritos mencionados, se hizo una revisión de algunos de los textos principales utilizados por los autores y se incorporaron otras revisiones como la tesis de licenciatura del Hoyos-Padilla (2001), quién recopila los datos publicados hasta ese momento sobre áreas de crianza de tiburones en el Caribe de México, y diversas fuentes de información que se van citando en el lugar correspondiente

Resultados

Los datos encontrados en conjunto brindan información de 11,222 individuos analizados, los cuales fueron agrupados de acuerdo con la información correspondiente en: 1) Ubicación y abundancia relativa, 2) temporalidad, 3) Estructura de edades y 4) Características reproductivas.

Ubicación y abundancia relativa

Dentro de la zona mexicana perteneciente al AOCC la captura del tiburón toro se ha reportado en los cinco estados que conforman el Golfo de México: Tamaulipas, Veracruz, Tabasco, Campeche y Yucatán (Bonfil, 1997; Castillo-Géniz et al., 1998; Pérez-Jiménez et al., 2015) y en el Caribe, en el estado de Quintana Roo (Bonfil, 1997; Blanco-Parra et al., 2016; DOF, 2022), catalogada dentro de las principales especies comerciales en la región.

La frecuencia de capturas de la especie es variable en los diferentes estados que conforman el Golfo de México. En comparación con Tamaulipas (39 organismos), Veracruz (75 organismos) presentó una mayor frecuencia de captura (Marín-Osorno, 1992), mientras que, al comparar los cinco estados del Golfo de México, en Veracruz y Campeche se reportó una mayor captura (48.9% y 33.7% respectivamente; Castillo-Géniz, 2001). En el estudio de Bonfil, (1997), señala una abundancia relativa similar para la especie en Tamaulipas, Veracruz, Campeche, Yucatán y Quintana Roo, en cada uno de los cuales la asigna en la categoría “muy común”, siendo la especie con mayor número de asignaciones bajo esta categorización, sólo faltando ésta en el estado de Tabasco donde señala que no existían reportes confirmados hasta el momento. En el artículo de Pérez-Jiménez y Méndez-Loeza (2015) se señala la captura de la especie en la región centro y sur de Campeche, en Tabasco y Yucatán, pero no se reporta la abundancia relativa entre estos estados.

En el plan de manejo publicado por el INAPESCA (DOF, 2022) el tiburón toro presentó los siguientes porcentajes de capturas por cada estado del Golfo de México y Caribe: Quintana Roo 17.9 %, Tabasco 40.56 %, siendo la principal especie capturada en estos estados, Veracruz, 1.73 %, no se encontró dentro de las principales especies capturadas en Yucatán, Tamaulipas y Campeche.

Presencia en zonas de agua intercontinental

El tiburón toro es una especie costera que suele usar como áreas de crianza estuarios y ríos. La presencia de la especie en ríos ha sido muy poco confirmada de manera formal en México, un registro reporta la presencia de la especie en el río Actopan y Papaloapan al Sur de Veracruz de acuerdo con comunicación personal con pescadores (Marín-Osorno 1992). También se ha encontrado un a la especie en el río Usumacinta y Laguna de las Ilusiones en el estado de Tabasco (Sosa-Nishizaki et al., 1998). Por el contrario, en la reciente revisión realizada por Gausmann

(2021) sobre todas las localidades estuarinas y ribereñas en las que se ha encontrado a la especie, resalta la alta frecuencia de registros de en zonas estuarinas dentro del Golfo de México y Caribe (por ejemplo, La Laguna de Términos, el Río Usumacinta, Río Pánuco, etc.).

Mediante algunos reportes se ha señalado la posible existencia de AC, tanto en las costas de Golfo de México como en el Caribe con base en la presencia de de neonatos y juveniles de la especie en estuarios y ríos (Applegate, 1984 y Montiel, 1988 en Hoyos-Padilla, 2001; Marín, 1992; Bonfil, 1997); así como de algunas observaciones de campo donde se ha visto a hembras entrar a estos sitios para alumbrar a sus crías (Marín, 1992). Dentro de las zonas que potencialmente funcionan con AC para el tiburón toro, en el Golfo de México, se encuentran: la Laguna de Tamiahua en Veracruz (Montiel, 1988 en Hoyos-Padilla, 2001) y Alvarado (Marín, 1992), así como la Laguna de Términos en Campeche (Uribe, 1993 en Hoyos-Padilla, 2001), mientras que para la zona del Caribe resaltan la Laguna de Yalahau (Bonfil, 1997; Hoyos-Padilla, 2001) y Chetumal (Applegate, 1984 en Hoyos-Padilla, 2001; Blanco-Parra et al., 2022). Hay reportes de la captura en el Golfo y Caribe de hembras preñadas, aunque no se ha determinado si los sitios propuestos funcionan como AC de acuerdo con los criterios propuestos por Heupel et al., (2007). Hasta el momento únicamente la Bahía de Chetumal ha sido corroborada como AC para la especie (Blanco-Parra et al., 2022). En algunos estuarios se han encontrado juveniles y neonatos, así como hembras y machos adultos (Sosa-Nishizaki et al., 1998; Delgadillo-Mateos 2018), lo que es importante considerar al ser zonas con una alta posibilidad de degradación ambiental y riesgo de captura.

Temporalidad

En cuanto a la temporalidad, la presencia del tiburón toro fue reportada en todos los meses del año por en Tamaulipas y Veracruz y (Marín-Osorno 1992; Castillo-Géniz 2001) en general en el Golfo de México y en Tabasco (Pérez-Jiménez y Mendez-Loeza 2015); sin embargo, se ha catalogado como una especie abundante en invierno, de acuerdo con los registros durante los meses de noviembre y diciembre en Veracruz y Tamaulipas (Marín-Osorno, 1992), entre noviembre y marzo en el estado de Campeche (Pérez-Jiménez y Mendez-Loeza 2015), lo que coincide con el avistamiento de la especie para fines turísticos durante noviembre y febrero en Playa del Carmen. La presencia de la especie también ha sido registrada de manera abundante durante los meses de verano lo que posiblemente esté ligado al alumbramiento de las hembras, como se menciona en la sesión de características reproductivas. De acuerdo al DOF (2022), en los dos estados con mayor

captura la especie se presentó con mayor frecuencia en los meses de marzo, abril y diciembre en Quintana Roo, mientras que en Tabasco fueron julio y septiembre.

Composición por tallas

Tanto en el Golfo de México como en el Caribe se han encontrado individuos neonatos, juveniles, sub-adultos y adultos, con una mayor proporción de adultos y sub-adultos en todos los estados (Bonfil, 1997; Cruz-Martínez et al., 2005).

Los neonatos se han reportado principalmente en Campeche y Quintana Roo (Bonfil, 1997; Blanco-Parra et al., 2022; Pérez-Jiménez et al., 2020), mientras que los juveniles se han visto en todos los estados del Golfo de México (Bonfil, 1997; Castillo et al., 2001; Pérez-Jiménez et al., 2020) aunque con una mayor proporción en Veracruz y Campeche (Castillo, 2001); los sub-adultos y adultos han sido reportados en los seis estados de la región (Bonfil, 1997; Castillo, 2001), sin embargo, en el caso de Yucatán los registros fueron durante el invierno, mientras que en Tabasco todo el año (Perez-Jimenez y Mendez-Loeaza, 2015). En el caso del Caribe se han registrado individuos entre 90 y 300 cm LT (Blanco-Parra et al., 2016; 2022). Las tallas máximas de captura se encuentran entre 334 y 350 cm LT en todo el Golfo de México (Castillo-Géniz 2001; Cruz-Martínez et al., 2005), correspondientes a una edad máxima de 28 años para las hembras (271 +/- 8.5 cm LT) y 23 años en el caso de los machos (254 cm; Cruz-Martínez et al., 2005).

Características reproductivas

Estimaciones de parámetros reproductivos procedentes de bibliografía para el tiburón toro en la costa Atlántica de México, se han realizado únicamente en el Golfo de México (Marín-Osorno, 1992; Castillo-Géniz et al., 2001; Cruz-Martínez et al., 2005), mientras que un déficit de información existe en el Caribe (Blanco-Parra et al., 2016). Con base en estos datos se estima que el apareamiento ocurre entre junio y julio de acuerdo con el análisis de 4 machos adultos que tenían abundante cantidad de esperma en sus vesículas seminales, una hembra que portaba en los ovarios nueve ovocitos próximos a ovular, otra con cicatrices copulatorias y un huevo uterino, y una más con seis huevos uterinos (Marín-Osorno, 1992). Estos registros se relacionan con registros de mayor abundancia de machos durante el mes de julio (Castillo Géniz, 2001); y en la captura registrada durante julio del 2016 en este estudio, donde fueron capturados 34 individuos en el Caribe de México, siendo sólo uno de ellos hembra, todos los machos (excepto uno) midieron más de 200 cm de longitud total y de acuerdo con la examinación de *claspers* eran individuos maduros,

lo que es normal durante esos meses cada año, de acuerdo a las observaciones realizadas por Humberto Anduce, pescador en Puerto Morelos desde hace más de 15 años.

En Veracruz y Campeche, se determinó que la edad de madurez en la especie ocurre a los 10 años para las hembras (204 cm LT) y entre 9 y 10 años para los machos (190-200 LT; Cruz Martínez et al., 2005), este último dato concuerda con la estimación para machos realizada considerando la captura de todos los estados del Golfo de México, basándose en el desarrollo de los claspers y 204 cm LT para hembras (Castillo-Géniz et al., 2001).

Una mayor cantidad de hembras preñadas ha sido reportada en los meses de abril y diciembre en el Golfo de México (Castillo-Géniz et al., 2001). La talla de los embriones durante los meses de otoño-invierno se ha reportado entre 37.7-45.6 cm. LT (Marín-Osorno, 1992), incluso se han registrado embriones recién desarrollados entre septiembre y noviembre (Castillo-Géniz et al., 2001), mientras que la de los embriones de las hembras preñadas capturadas durante primavera-verano, abril y mayo fue de 66-76 cm LT (Marín-Osorno, 1992) y entre 65-70 cm de LT entre noviembre y mayo (Castillo-Géniz et al., 2001); lo anterior coincide con los datos de embriones registrados durante el trabajo de campo de este estudio para 29 embriones procedentes de tres hembras preñadas capturadas en el Caribe de México (30-49.5 cm LT) durante los meses de noviembre y diciembre del 2015. Estos últimos, son los únicos datos registrados hasta el momento de hembras preñadas y embriones en el Caribe de México.

De acuerdo con datos más recientes, hembras preñadas son avistadas en los buceos realizados en Playa del Carmen (Hoyos-Padilla et al. 2023), así como registros de captura pesquera en Cancún y Puerto Morelos durante los meses de invierno; si bien, estos registros no indica la labor de alumbramiento por parte de las hembras en esas zonas, es posible que alerte la presencia de una mayor cantidad de hembras preñadas en la captura pesquera durante esta época del año.

Discusión

El tiburón toro es objeto de una importante explotación pesquera en el AOcc, así como en diversos países y estados en México (Bonfil, 1997; Tavares y Sánchez, 2012; Pérez-Jiménez et al., 2012; Aguilar et al., 2014; DOF, 2022). Existe evidencia de la posible extirpación local en estuarios de Estados Unidos (O'Connell et al., 2007), y algunas disminuciones en la frecuencia de su captura

en el sureste del Golfo de México (Pérez-Jiménez et al., 2012), mientras que en otras localidades parece mantenerse estable (Rigby et al., 2021). Estos registros resaltan la necesidad de un monitoreo y regulación constante de su pesquería, así como identificar los factores sociales, económicos, biológicos y ecológicos que deben ser tomados en cuenta para lograr un mejor manejo pesquero entre las diferentes regiones del Golfo de México y Caribe (Pérez-Jiménez et al., 2016).

En el caso particular del tiburón toro en la zona de estudio, es importante considerar la heterogeneidad en la dinámica social, económica y ecológica entre estados y localidades para establecer medidas específicas de manejo, por ejemplo, se debe considerar que en el estado de Quintana Roo y Tabasco el tiburón toro es la principal especie capturada mientras que en estados como Campeche son otras las especies que suponen más del 97 % de la captura (ej. *R. terraenovae*, *C. acronotus*, *S. lewini* y *S. tiburo*), además de que la temporalidad y tallas pueden diferir entre estas localidades (DOF, 2022).

De acuerdo con estimaciones de la pesquería de Estados Unidos, en el Atlántico norte se determinó un potencial incremento en la abundancia del tiburón toro entre 1994-2009 (Carlson et al., 2012), y en las capturas de estuarios en Texas entre 1976 y 2010 (Froeschke et al., 2012), lo que ha permitido catalogar a la especie como estable en esa zona (Rigby et al., 2021). Los autores atribuyen a las legislaciones pesqueras establecidas previamente en Estados Unidos desde 1993, donde se incluyen límites en las cuotas recreativas y comerciales, restricciones en equipos de pesca, talleres de identificación de especies para los distribuidores de mercancía relacionada con la comercialización de tiburones, así como la disminución en el uso de redes dentro de estuarios y AC, aunque también existen reportes de grave disminución local en estuarios de esta zona de más del 90 % (O'Connell et al., 2007).

En el Sureste del Golfo de México y Caribe, existe poca información histórica, lo que limita el conocimiento del estado de conservación de las poblaciones en esta zona (Pérez-Jimenez et al., 2012; Blanco-Parra et al., 2016); sin embargo, se sabe que la especie *C. leucas* es frecuente en las capturas de todos los estados mexicanos del Golfo de México y Caribe, en algunos casos permiten suponer una disminución en la abundancia de la especie (Pérez-Jimenez et al., 2012). La frecuencia en las capturas del tiburón toro fueron altas en los años 80s, bajas en registros posteriores (2007-2009) en el Sureste del Golfo de México (Pérez-Jimenez et al., 2012); además los registros del

Instituto Nacional de la Pesca indican que existen capturas de individuos inmaduros en el Golfo de México, incluyendo su captura en la pesquería ribereña de escama (NOM-029-PESC-2006).

Como una de las medidas principales, en México se ha establecido una veda en general para los tiburones y rayas del Golfo y Caribe del 1ro de mayo al 30 de junio en Tamaulipas, Veracruz y Quintana Roo, del 15 de mayo al 15 de junio, y del 1 al 29 de agosto en Tabasco, Yucatán y Campeche (DOF, 2014). El manejo generalizado para las especies podría no estar atendiendo de manera correcta las necesidades de conservación en tiburones (Bonfil, 1997) incluyendo a *C. leucas*. Por ejemplo, en México la veda para el Golfo y Caribe no toma en cuenta que la principal captura de la especie se realiza entre los meses de noviembre a marzo en algunas regiones de Campeche (Pérez-Jiménez y Mendez-Loeza, 2015), incluyendo a hembras preñadas tanto en la zona del Golfo de México y Caribe durante diciembre y abril (Castillo-Géniz, 2001). Además, no es posible vigilar que el reglamento se cumpla en todas las localidades como es el caso de la Bahía de Chetumal, en donde se capturan individuos inmaduros de *C. leucas* con frecuencia, incluidos los meses de veda (Blanco-Parra et al., 2022).

El tiburón toro presenta una temporalidad y ubicación marcada, tanto en el Golfo de México como en Caribe, lo que puede facilitar la incorporación de medidas locales que minimicen su riesgo de sobrepesca o de disminución poblacional. Se requiere de un análisis profundo en las políticas de manejo, tratando de separar zonas para evaluar la dinámica de la pesquería local, esto puede ayudar en el establecimiento de medidas específicas por zonas. En Isla Mujeres y Puerto Morelos se ha podido llegar a establecer acuerdos mediante los cuales organizaciones no gubernamentales, sector privado y público trabajan en conjunto para aminorar la captura comercial de la especie.

Es indispensable que se establezcan sitios prioritarios de conservación para la especie, por ejemplo, aquellos considerados como AC o potenciales AC, dentro de las cuales deberían establecerse medidas de conservación adicionales a las ya existentes. Aunado a esto, es necesario diseñar estrategias de educación ambiental dirigida a los pescadores para concientizar la no captura y establecer un sistema de vigilancia eficiente. Es necesario establecer acuerdos internacionales cuando sea necesario, lo que específicamente podría funcionar entre Belice y México al compartir la Bahía de Chetumal, un área de crianza importante para la especie (Blanco-Parra et al., 2022).

Vigilar la talla de captura mínima para tiburones podría ser una estrategia de manejo en algunos estuarios como Chetumal y Tamiahua, particularmente, limitar la captura de individuos menores de 190 cm de LT en la parte norte, ya que de acuerdo a diversos estudios corresponde a la talla de primera madurez sexual, (Castillo-Géniz, 2001; Cruz-Martínez et al., 2005), mientras que hacia el sur, particularmente en el caso de Chetumal, la talla de captura permitida debería ser menor a los 160 cm LT, considerando que se suelen capturar individuos neonatos y juveniles (Blanco-Parra et al., 2022) y que posiblemente esta localidad pertenece a otra población, dados los resultados de genética aquí presentados, lo que podría implicar que la especie en esta área madura sexualmente entre los 160 y 170 cm LT, de acuerdo a datos publicados de América Central (Jensen 1976). Otra medida que podría ajustarse a la Bahía de Chetumal, es extender la veda de captura en este sitio durante el mes de julio cuando hay una gran captura de la especie (Blanco-Parra et al., 2022).

Se ha propuesto limitar el uso de ciertas artes de pesca dirigida a especies vulnerables como el tiburón toro y tomar en cuenta las diferencias en el ciclo de vida de las especies y su temporalidad en cada región, para establecer mejores medidas de manejo (Pérez-Jiménez y Méndez-Loeza, 2015).

El riesgo ecológico por pesca para el tiburón toro se ha evaluado en algunas localidades del Golfo de México como Tamiahua, en esta localidad la especie presenta una productividad biológica media y riesgo medio a la pesca con palangre (Delgadillo-Mateos 2018), mientras que de manera general se determinó una productividad biológica baja (Castillo-Geniz, 2001), y vulnerabilidad entre baja y media en diferentes pesquerías del Golfo de México (Bravo-Zavala et al., 2022). Lo que sustenta la idea de que las medidas de conservación para la especie en diferentes pesquerías del Golfo de México y Caribe deben basarse en características biológicas, ecológicas y pesqueras como estructura de tallas, temporalidad, riesgo ecológico, artes de pesca usado, etc., esto evitaría disminuciones poblacionales localizadas y cambios en importantes parámetros reproductivos como disminución en la talla de primera madurez (O'Connell et al., 2007; Castillo-Géniz, 2001; Delgadillo-Mateos, 2018).

La información aquí sintetizada y los datos de diferenciación genética encontrados en este estudio, demuestran la necesidad en delimitar unidades de manejo para el tiburón toro en el Caribe y Golfo de México, particularmente la zona Sur de Quintana Roo debido a las diferencias genéticas

encontradas en Chetumal, que posiblemente pertenece a una población diferente al resto del Caribe mexicano y Golfo de México, además de la diferencia entre los porcentajes de captura que la especie representa en los estados del Golfo y Caribe, así como el contexto social, donde Quintana Roo es un lugar principalmente turístico.

IX. Discusión general

El tiburón toro es una especie costera que se distribuye a lo largo de todos los márgenes continentales, sin embargo, se han encontrado diferencias genéticas tanto a pequeña como a gran escala geográfica que permiten suponer la existencia de diferentes linajes a lo largo de su distribución global (Pirog et al., 2019; Testerman 2014), aunque aún es necesaria la determinación del número total de especies y poblaciones de tiburón toro existentes.

De acuerdo con lo reportado por Naylor (2012), es posible que la especie esté conformada por un conjunto de varias especies relacionadas. En términos poblacionales, mediante la utilización de tres regiones del ADNmt y 25 microsatélites se determinó la existencia de tres linajes (Pirog et al., 2019): Atlántico Occidental (costa de Florida), Pacífico Occidental e Índico Occidental. Se ha sugerido realizar un manejo diferencial entre tres unidades, separando a los individuos del Océano Índico Occidental y Pacífico Occidental, similar a lo publicado en la tesis doctoral de Testerman (2014), donde mediante la utilización de 11 microsatélites nucleares se divide al tiburón toro en tres linajes: Atlántico (muestras únicamente de Florida), Indo-Australia y Fiji.

Los antecedentes muestran que para el tiburón toro existe un patrón general de heterogeneidad genética entre localidades separadas mediante cuencas oceánicas y continentales (por ejemplo, Atlántico Occidental y Pacífico Occidental), mientras que asumen homogeneidad genética a lo largo de los márgenes continentales (Naylor 2012, Testerman 2014, Pirog 2019).

Los resultados de este estudio mostraron homogeneidad genética entre las localidades de Estados Unidos, Golfo de México Sur y el Caribe de México Norte (hasta Isla Mujeres), mediante SNPs. Sin embargo, se corroboró la existencia de diferencias genéticas entre Sur (Brasil) y Norte de América (Estados Unidos y México) mediante la región control del ADNmt reportada anteriormente por Karl y colaboradores (2011). Además, se reporta diferenciación genética entre

el Sur y Norte del AOcc, y una tercera localidad ubicada en el Caribe Sur Occidental de México (muestras de Chetumal).

La separación de linajes entre el hemisferio Sur y Norte del AOcc se ha reportado en diversas especies de tiburones: en el tiburón limón (*Negaprion brevirostris*; Schultz et al., 2008), tiburón arenero (*Carcharhinus obscurus*; Benavides et al., 2011), tiburón puntas negras (*Carcharhinus limbatus*; Sodré et al., 2012) y tiburón toro (*Carchrhinus leucas.*, Karl et al., 2011). Y empieza a incrementar evidencia de separación también entre localidades del Norte de América y Centroamérica, por ejemplo, en el tiburón puntas negras (Keeney et al., 2005), tiburón martillo común (*Sphyrna lewini*; Pinhal et al., 2020) y cabeza de pala (*Sphyrna tiburo*; González et al., 2019).

La estructura genética suele ser explicada por la combinación de diversos factores para una misma especie (Ashe, 2015; Pinhal et al., 2020). En el caso del AOcc, la estructura genética en tiburones entre el Norte y Sur de América se ha relacionado con factores como las corrientes marinas (Domingues et al., 2017), la desembocadura del río Amazonas (Pinhal et al., 2020), aislamiento por distancia (Domingues et al., 2019), particularmente baja migración entre zonas (Domingues et al., 2017), filopatría (Karl et al., 2011) y eventos geológicos como los cambios en las condiciones marinas durante el Pleistoceno (Carmo et al., 2019). Mientras que las divisiones poblacionales a menor escala geográfica en el AOcc se han asociado a la alta residencia, migración limitada, fidelidad al sitio, y filopatría de las especies (Keeney et al., 2003; Keeney et al., 2005; Escatel-Luna et al., 2015; Portnoy et al., 2016; Diaz-Jaimes et al., 2021).

En este estudio, la homogeneidad genética entre las localidades de Estados Unidos, Golfo de México Sur y el Caribe de México Norte (hasta Isla Mujeres), mediante SNPs, puede explicarse con la falta de barreras al flujo genético existentes en esa zona para la especie, lo que concuerda con los datos de marcaje y genéticos previos (Sandoval-Laurrabaquio, 2015; Karl et al., 2011) y con la hipótesis sobre la migración entre zonas relacionada con el cambio de temperatura (Marín-Osorno, 1992). Sin embargo, los valores significativos de diferenciación genética analizando la región control del ADNmt, entre el AC ubicada en el Atlántico de Florida, particularmente en Indian River Lagoon y las AC ubicadas en el Golfo de Norte (Charlotte Harbor, Louisiana y Texas), pero homogeneidad genética con los marcadores nucleares (microsatélites), se explica por la filopatría regional de las hembras, considerando la diferencia en cuanto a herencia parental de

los marcadores utilizados, ADNmt (uniparental) y microsatélites (biparental),, como se ha reportado para otras especies de tiburón (Keeney et al., 2005) y para *C. leucas* (Karl et al., 2011; Tillett et al., 2012) .

La filopatría es un comportamiento con repercusiones evolutivas y ecológicas importantes en conservación. Por ejemplo, constituye información valiosa para la determinación de rutas migratorias de las hembras para identificar zonas de parto, y en general para el rastreo de poblaciones, si esto resulta en diferencias genéticas identificables (Domingues et al. 2021). Reconocer los sitios a los que las hembras son filopátricas es relevante, ya que existirá una mayor probabilidad de que estos sitios sean ocupados por las hembras en cada ciclo reproductivo.

La heterogeneidad genética entre todas las AC estudiadas y la de Chetumal, al sur del Caribe mexicano realizado mediante el análisis del genoma mitocondrial completo, permitió registrar un número significativo de diferencias nucleotídicas (N = 35-37). La divergencia entre el Norte y Centro de América pudo originarse por factores climáticos como los cambios en el nivel del mar durante los periodos glaciares, tomando en cuenta que el tiempo de divergencia calculado en este estudio para esas dos zonas fue de entre 68,000 y 126,700 años, sin embargo, el no encontrar haplotipos compartidos de la localidad de Chetumal con ninguna de las otras estudiadas, es posible considerar que la divergencia genética se pudo haber mantenido por el poco o nulo flujo genético entre localidades, y la filopatría de las hembras hacia AC.

El uso del ADNmt como único marcador molecular en la estimación entre Norte y el Sur del Caribe (Chetumal) tiene limitantes a considerar. Por su carácter uniparental, solo es posible registrar los linajes maternos en las poblaciones lo que reduce la posibilidad de evaluar relaciones ancestrales biparentales. Se recomienda completar esta parte del estudio con otro tipo marcadores nucleares (por ejemplo, SNPs o microsatélites) para las localidades que no fueron analizadas con éstos, lo que permitirá tener un panorama más amplio de la genética poblacional de la especie entre las poblaciones analizadas, así como realizar datos de marcaje, ya que esto permitiría tener clara la dinámica poblacional de la especie en el AOcc. Además, determinar si la heterogeneidad encontrada obedece a una señal histórica de interrupción del flujo o más actual es importante para la gestión del recurso lo cual requiere el uso de marcadores con tasas de mutación más altas como los microsatélites nucleares (Wan, 2004; Freeland, 2005; Pirog et al., 2019).

Adicionalmente, se pudieron comparar secuencias previamente publicadas de Brasil (Karl et al., 2010), las cuales resultaron significativamente diferentes de las procedentes de Chetumal y todas las localidades de la zona norte. Esto nos permite suponer la existencia de tres poblaciones en el AOcc para el tiburón toro.

Implicaciones en conservación

Los tiburones, de manera general, se encuentran entre los grupos marinos más vulnerables debido a la alta tasa de disminución poblacional que han presentado en las últimas décadas como resultado de factores como la degradación del hábitat, contaminación y sobre pesca (Davidson et al., 2016; Dulvy et al., 2021). El estado de conservación puede ser diferente entre especies, y entre las poblaciones que las conforman, lo que suele estar relacionado con factores sociales, biológicos y ecológicos tanto a nivel global como local, y hace necesario contar con información biológica, ecológica y genética de las poblaciones para una mejor implementación de medidas de conservación y manejo.

Algunas características reproductivas como talla de primera madurez sexual, época de apareamiento y alumbramiento pueden variar entre localidades (Pirog et al., 2019) y más aún si las poblaciones presentan diferencias genéticas. Particularmente, en el AOcc resalta que la talla de primera madurez sexual reportada tanto para hembras como para machos en Centro América (160 y 170 cm LT; Jensen, 1976) es mucho menor a las de Brasil y Norteamérica (190 y 254 cm LT, respectivamente); los meses de alumbramiento son diferentes, ocurriendo entre abril y junio para el Norte, tentativamente de abril-junio para Centroamérica, y de noviembre a febrero para Sudamérica (Pirog et al., 2019). Lo que sugiere establecer medidas de manejo diferentes para cada zona, como temporadas de veda, talla mínima y cuotas de captura, incluyendo la AC de Chetumal en donde se capturan neonatos y juveniles, incluso en época de veda (Blanco-Parra et al., 2022).

El tiburón toro es una especie considerada por la lista roja de la Unión internacional para la Conservación de la naturaleza (IUCN por sus siglas en inglés) como vulnerable y con población decreciente; su estado de conservación cambió en la última evaluación realizada en el 2020 de casi amenaza a vulnerable, indicando un peor estado para la especie de manera global (Rigby et al., 2021). Esto pone de manifiesto que la especie presenta un riesgo alto de extinción en vida silvestre (IUCN, 2012), por tanto, cualquier información sobre aspectos de la biología y genética evolutiva

de la especie, será de gran valor para contribuir a enriquecer o establecer los planes de manejo para la especie.

El tiburón toro es una de las especies más comunes en la captura de tiburones en los estados del Golfo y Caribe mexicanos, ya que la zona norte es diferente genéticamente de la zona sur del Caribe mexicano (Chetumal), se sugiere considerarse como dos unidades de manejo distintas, tomando en cuenta también las características sociales entre los estados que conforman la región. El análisis de los datos pesqueros publicados muestra también que la captura de la especie en México incluye neonatos, juveniles, adultos y hembras preñadas, lo que puede poner en riesgo algunas localidades en donde se encuentra la especie.

En el Atlántico noroeste, en la costa de Estados Unidos (desde Maryland a Florida Keys) y el norte del Golfo de México, se determinó un potencial incremento en la abundancia del tiburón toro entre 1994 y 2009 (Carlsson et al., 2012), misma tendencia reportada en las capturas de estuarios en Texas entre 1976 y 2010 (Froeschke et al., 2012). Estos registros han permitido catalogar a la especie como estable en esa zona, lo cual se atribuye a la regulación pesquera establecida mediante legislaciones en Estados Unidos desde 1993 (Rigby et al., 2021; Carlsson et al., 2012; Froeschke et al., 2012). Estas regulaciones incluyen límites permitidos en las cuotas recreativas y comerciales, restricciones en equipos de pesca, talleres de identificación de especies para los distribuidores de mercancía relacionada con la comercialización de tiburones, así como la disminución en el uso de redes dentro de estuarios y áreas de crianza, aunque también existen reportes de disminución local grave (O'Connell et al., 2007)

La poca información que existe para México se debe a que la mayoría de los registros no son realizados por especie, por lo que el análisis pesquero de las poblaciones en México es difícil. A pesar de ello, las observaciones de los pescadores indican que la especie es frecuente en las capturas de los estados mexicanos del Golfo de México y Caribe, donde no existen regulaciones pesqueras, y no es posible vigilar que se cumplan las vedas establecidas para la región de la Bahía de Chetumal, en donde se capturan individuos inmaduros de *C. leucas* con frecuencia (Blanco-Parra et al., 2022).

En el estudio genético aquí presentado se mostró que de Estados Unidos hasta el Caribe norte de México conforman una población panmítica, por lo tanto, al compartir una única población

podrían compartir un plan de manejo para la especie, considerando que mientras en Estados Unidos se reporta un aumento poblacional para *C. leucas*, es posible que en la zona de México sea diferente, de acuerdo a lo reportado por diversos autores (Marín, 1992; Bonfil, 1997; Castillo-Géniz, 200; Pérez-Jiménez et al., 2012).

El tiburón toro es una especie costera, que suele usar como AC zonas estuarinas, las cuales suelen presentar asentamientos humanos, lo que está estrechamente relacionado con un incremento en el riesgo de disminución poblacional, debido a factores como la pesca y la degradación del hábitat. Por tanto, conocer el uso de estas áreas por el tiburón toro, así como determinar su fidelidad y filopatría a las mismas, es importante debido a que en México pueden ocurrir disminuciones poblacionales como las reportadas en estuarios de Estados Unidos, mayor al 90 % (O'Connell et al., 2007). En este estudio se demostró que la especie es filopatría hacia algunas AC, particularmente en Indian River Lagoon y Chetumal, este comportamiento ha causado diferencias genéticas que deben tomarse en cuenta para preservar la variabilidad genética de la especie. Además, los resultados se relacionan con el uso habitual que las hembras hacen de estas zonas, lo que sugiere la preservación de estos sitios como prioritarios para la conservación de la especie.

El tiburón toro es una de las principales especies capturadas para fines comerciales a lo largo del área de este estudio (Golfo de México y Caribe), y considerada como una población *panmítica* en todo el Atlántico Occidental. Sin embargo, los resultados de este estudio identificaron diferencias genéticas entre diferentes localidades. Esta información es útil para entender mejor la dinámica poblacional de la especie, y por lo tanto realizar mejores propuestas para su manejo y conservación, particularmente los resultados permiten concluir el flujo genético entre la zona norte del AOcc y la interrupción del flujo genético entre la zona norte, centro y sur de América. Además, se concluye que el comportamiento filopátrico de la especie es un elemento importante a considerar para la preservación de sitios específicos que la especie utiliza como AC.

Es necesario estimar si existe una diferencia en el estado de conservación entre las tres poblaciones propuestas (Norte, Centro y Sur de América) y entre las áreas de crianza del Este de Florida y Golfo de México. Por lo pronto, se sugiere asumir que en Estados Unidos y México la especie tiene un estado de conservación diferente, siendo mejor conservada en el primer país mencionado, aunque genéticamente sea una sola población.

X. Conclusiones

En este estudio fue posible identificar los siguientes patrones de diferenciación genética para la especie *Carcharhinus leucas* en el AOCC: 1) Homogeneidad genética desde las costas de Estados Unidos hasta el Norte del Caribe mexicano (Isla Mujeres) mediante el estudio de SNPS, 2) Evidencia de Filopatría por parte de las hembras hacia áreas de crianza en la zona de estudio, principalmente reflejado en la composición genética de Indian River Lagoon y Chetumal, y 3) Posible división poblacional en el AOCC para la especie en tres unidades: Norte (Atlántico de EU y Golfo de México), Centro (desde el Caribe Sur de México) y Sur (Sudamérica). Además, el análisis de datos pesqueros permite resaltar a la especie como de gran importancia en la pesquería del Golfo y Caribe de México, lo que en conjunto con los datos genéticos señalan que un mejor manejo de la especie como recurso pesquero debe contemplar la divisiones poblacionales y ecológicas, y con base en esto desarrollar estrategias a nivel regional y local, atendiendo las características biológicas, ecológicas, sociales y culturales.

Los resultados tienen importantes implicaciones en la conservación de la especie, indicando los posibles límites poblacionales se delimitan también los países que comparten a este tiburón como recurso pesquero, en el caso de la población Norte, México y Estados Unidos, en el Centro, México (Caribe Sur) y posiblemente todos los países de América Central, aunque aún es necesario determinar el límite exacto al Sur y Norte de esta población, así como determinar dónde empieza la población de Brasil. Esto también debería complementarse con datos de marcaje de la especie, considerando la poca evidencia que existe de sus movimientos migratorios entre diferentes localidades del AOCC.

Las tres posibles poblaciones deben ser confirmadas y consideradas como unidades diferentes de manejo, ya que posiblemente tengan un diferente estado de conservación, incluso, pueden considerarse unidades de manejo o conservación más locales, como lo es el Caribe y Golfo de México Sur y Norte, considerando sus diferencias socio-económicas.

La filopatría confirmada para la especie en este estudio, también debe considerarse en la conservación de la especie, ya que indica sitios prioritarios de conservación, como pueden ser Indian River Lagoon en el norte, y Chetumal en el Sur. Esto ayudaría a preservar zonas que la especie usa regularmente como AC y a procurar su diversidad genética.

XI. Literatura citada

- Alam, M. T., Petit III, R. A., Read, T. D., & Dove, A. D. (2014). The complete mitochondrial genome sequence of the world's largest fish, the whale shark (*Rhincodon typus*), and its comparison with those of related shark species. *Gene*, 539(1), 44-49.
- Andrews, S. (2010). Babraham bioinformatics-FastQC a quality control tool for high throughput sequence data. URL: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
- Andrews, K. R., & Luikart, G. (2014). Recent novel approaches for population genomics data analysis. *Molecular Ecology*, 23 (7) 1661-1667.
- Andrews, K. R., Good, J. M., Miller, M. R., Luikart, G., & Hohenlohe, P. A. (2016). Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nature Reviews Genetics*, 17(2), 81-92.
- Ashe, J. L., Feldheim, K. A., Fields, A. T., Reyier, E. A., Brooks, E. J., O'Connell, M. T., ... & Chapman, D. D. (2015). Local population structure and context-dependent isolation by distance in a large coastal shark. *Marine Ecology Progress Series*, 520, 203-216.
- Bayona-Vásquez, N. J., Glenn, T. C., Kieran, T. J., Pierson, T. W., Hoffberg, S. L., Scott, P. A., ... & Faircloth, B. C. (2019). Adapterama III: Quadruple-indexed, double/triple-enzyme RADseq libraries (2RAD/3RAD). *PeerJ*, 7, e7724.
- Beacham, T. D., Candy, J. R., McIntosh, B., MacConnachie, C., Tabata, A., Kaukinen, K., ... & Varnavskaya, N. (2005). Estimation of stock composition and individual identification of sockeye salmon on a Pacific Rim basis using microsatellite and major histocompatibility complex variation. *Transactions of the American Fisheries Society*, 134(5), 1124-1146.
- Behjati, S., & Tarpey, P. S. (2013). What is next generation sequencing? *Archives of Disease in Childhood-Education and Practice*, 98(6), 236-238.
- Blanco-Parra, M. del P., AlbertoNiño-Torres, C., Ramírez-González, A., & Sosa-Cordero, E. (2016). Tendencia histórica de la pesquería de elasmobranquios en el estado de Quintana Roo, México. *Ciencia Pesquera*, 24, 125-137.
- Blanco-Parra, M. D. P., Sandoval-Laurrabaquio-Alvarado, N., Díaz-Jaimes, P., & Niño-Torres, C. A. (2022). Evidence of a nursery area for bull shark, *Carcharhinus leucas* (Müller y Henle, 1839) in the Mesoamerican Reef System region. *Environmental Biology of Fishes*, 105(9), 1193-1202
- Bonfil, R. (1997). Status of shark resources in the Southern Gulf of Mexico and Caribbean: implications for management. *Fisheries Research*, 29(2), 101-117.

- Bravo-Zavala, F. G., Pérez-Jiménez, J. C., Tovar-Ávila, J., & Arce-Ibarra, A. M. (2022). Vulnerability of 14 elasmobranchs to various fisheries in the southern Gulf of Mexico. *Marine and Freshwater Research*, 73(8), 1064-1082.
- Brunnschweiler, J. M., Queiroz, N., & Sims, D. W. (2010). Oceans apart? Short-term movements and behaviour of adult bull sharks *Carcharhinus leucas* in Atlantic and Pacific Oceans determined from pop-off satellite archival tagging. *Journal of fish biology*, 77(6), 1343-1358.
- Carlson, J. K., Ribera, M. M., Conrath, C. L., Heupel, M. R., & Burgess, G. H. (2010). Habitat use and movement patterns of bull sharks *Carcharhinus leucas* determined using pop-up satellite archival tags. *Journal of fish biology*, 77(3), 661-675.
- Carlson, J. K., Hale, L. F., Morgan, A., & Burgess, G. (2012). Relative abundance and size of coastal sharks derived from commercial shark longline catch and effort data. *Journal of Fish Biology*, 80(5), 1749-1764.
- Castillo-Géniz, J. L., Márquez-Farias, J. F., De La Cruz, M. R., Cortés, E., & Del Prado, A. C. (1998). The Mexican artisanal shark fishery in the Gulf of Mexico: towards a regulated fishery. *Marine and Freshwater Research*, 49(7), 611-620.
- Castillo Géniz J.L. (2001). Aspectos biológico-pesqueros de los tiburones que habitan las aguas del Golfo de México. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- 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(1), 37-48.
- Castro J.I. *The Sharks of North America* (2011). Oxford University Press. 640 páginas.
- Catchen, J., Hohenlohe, P. A., Bassham, S., Amores, A., & Cresko, W. A. (2013). Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Molecular ecology*, 22(11), 3124-3140.
- Chapman, D. D., Pinhal, D., & Shivji, M. S. (2009). Tracking the fin trade: genetic stock identification in western Atlantic scalloped hammerhead sharks *Sphyrna lewini*. *Endangered Species Research*, 9(3), 221-228.
- Chapman, D. D., Feldheim, K. A., Papastamatiou, Y. P., & Hueter, R. E. (2015). There and back again: a review of residency and return migrations in sharks, with implications for population structure and management. *Annual review of marine science*, 7, 547-570.
- 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. 125(4/2):251-655. Rome: FAO.

Cruz-Martínez, A., Chiappa-Carrara, X., & Arenas-Fuentes, V. (2005). Age and growth of the bull shark, *Carcharhinus leucas*, from southern Gulf of Mexico. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, 35(13), 367-374.

Curtis, T. H., Adams, D. H., & Burgess, G. H. (2011). Seasonal distribution and habitat associations of bull sharks in the Indian River Lagoon, Florida: a 30-year synthesis. *Transactions of the American Fisheries Society*, 140(5), 1213-1226.

Dahle, G., Johansen, T., Westgaard, J. I., Aglen, A., & Glover, K. A. (2018). Genetic management of mixed-stock fisheries “real-time”: the case of the largest remaining cod fishery operating in the Atlantic in 2007–2017. *Fisheries Research*, 205, 77-85.

Davidson, L. N., Krawchuk, M. A., & Dulvy, N. K. (2016). Why have global shark and ray landings declined: improved management or overfishing? *Fish and Fisheries*, 17(2), 438-458.

Delgadillo Mateos C. (2018). Evaluación de riesgo ecológico de dos especies de tiburón de importancia comercial en Tamiahua, Veracruz, México. Tesis de maestría. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Díaz-Arce, N., & Rodríguez-Ezpeleta, N. (2019). Selecting RAD-Seq data analysis parameters for population genetics: the more the better? *Frontiers in genetics*, 10, 533.

Díaz-Jaimes, P., Bayona-Vásquez, N. J., Adams, D. H., & Uribe-Alcocer, M. (2016). Complete mitochondrial DNA genome of bonnethead shark, *Sphyrna tiburo*, and phylogenetic relationships among main superorders of modern elasmobranchs. *Meta gene*, 7, 48-55.

Díaz-Jaimes, P., Bayona-Vásquez, N. J., Escatel-Luna, E., Uribe-Alcocer, M., Pecoraro, C., Adams, D. H., ... & Babbucci, M. (2021). Population genetic divergence of bonnethead sharks *Sphyrna tiburo* in the western North Atlantic: Implications for conservation. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 31(1), 83-98.

DOF, 2014
https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5330831&fecha=27/01/2014#gsc.tab=0

DOF, 2022
https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5654592&fecha=09/06/2022#gsc.tab=0

Domingues, R. R., Hilsdorf, A. W. S., & Gadig, O. B. F. (2018). The importance of considering genetic diversity in shark and ray conservation policies. *Conservation Genetics*, 19(3), 501-525.

Domingues, R. R., Bruels, C. C., Gadig, O. B., Chapman, D. D., Hilsdorf, A. W., & Shivji, M. S. (2019). Genetic connectivity and phylogeography of the night shark (*Carcharhinus signatus*) in the western Atlantic Ocean: Implications for conservation management. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 29(1), 102-114.

- Domingues, R. R., Bunholi, I. V., Pinhal, D., Antunes, A., & Mendonça, F. F. (2021). From molecule to conservation: DNA-based methods to overcome frontiers in the shark and ray fin trade. *Conservation Genetics Resources*, *13*(2), 231-247.
- Dudgeon, C. L., Blower, D. C., Broderick, D., Giles, J. L., Holmes, B. J., Kashiwagi, T., ... & Ovenden, J. R. (2012). A review of the application of molecular genetics for fisheries management and conservation of sharks and rays. *Journal of fish biology*, *80*(5), 1789-1843.
- Dulvy, N. K., Pacoureau, N., Rigby, C. L., Pollom, R. A., Jabado, R. W., Ebert, D. A., ... y Simpfendorfer, C. A. (2021). Overfishing drives over one-third of all sharks and rays toward a global extinction crisis. *Current Biology*, *31*(21), 4773-4787.
- Elliott, T. A., & Gregory, T. R. (2015). What's in a genome? The C-value enigma and the evolution of eukaryotic genome content. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *370*(1678), 20140331.
- Escatel-Luna, E., Adams, D. H., Uribe-Alcocer, M., Islas-Villanueva, V., & Díaz-Jaimes, P. (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., Laval, G., & Schneider, S. (2005). Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary bioinformatics*, *1*, 117693430500100003.
- Feldheim, K. A., Gruber, S. H., DiBattista, J. D., Babcock, E. A., Kessel, S. T., Hendry, A. P., ... & Chapman, D. D. (2014). Two decades of genetic profiling yields first evidence of natal philopatry and long-term fidelity to parturition sites in sharks. *Molecular Ecology*, *23*(1), 110-117.
- Feutry, P., Kyne, P. M., Pillans, R. D., Chen, X., Naylor, G. J., & Grewe, P. M. (2014). Mitogenomics of the Speartooth Shark challenges ten years of control region sequencing. *BMC evolutionary biology*, *14*(1), 1-9.
- Feutry, P., Kyne, P. M., Pillans, R. D., Chen, X., Marthick, J. R., Morgan, D. L., & Grewe, P. M. (2015). Whole mitogenome sequencing refines population structure of the Critically Endangered sawfish *Pristis pristis*. *Marine Ecology Progress Series*, *533*, 237-244.
- Fitzpatrick, C. K., Finnegan, K. A., Osaer, F., Narváez, K., & Shivji, M. S. (2017). The complete mitochondrial genome of the Critically Endangered Angelshark, *Squatina squatina*. *Mitochondrial DNA Part B*, *2*(1), 212-213.
- Freamo, H., O'REILLY, P. A. T. R. I. C. K., Berg, P. R., Lien, S., & Boulding, E. G. (2011). Outlier SNPs show more genetic structure between two Bay of Fundy metapopulations of Atlantic salmon than do neutral SNPs. *Molecular Ecology Resources*, *11*, 254-267.

- Freeland, J., Kirk, H., & Petersen, S. (2005). Molecular markers in ecology. *Molecular ecology*, 31-62.
- Froeschke, J. T., Stunz, G. W., Sterba-Boatwright, B., & Wildhaber, M. L. (2010). An empirical test of the 'shark nursery area concept' in Texas bays using a long-term fisheries-independent data set. *Aquatic Biology*, 11(1), 65-76.
- Froeschke, J. T., Froeschke, B. F., & Stinson, C. M. (2012). Long-term trends of bull shark (*Carcharhinus leucas*) in estuarine waters of Texas, USA. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 70(1), 13-21.
- Galván-Tirado, C., Hinojosa-Alvarez, S., Diaz-Jaimes, P., Marcet-Houben, M., & García-De-León, F. J. (2016). The complete mitochondrial DNA of the silky shark (*Carcharhinus falciformis*). *Mitochondrial DNA Part A*, 27(1), 157-158.
- Gausmann, P. (2021). Synopsis of global fresh and brackish water occurrences of the bull shark *Carcharhinus leucas* Valenciennes, 1839 (Pisces: Carcharhinidae), with comments on distribution and habitat use. *Integrative Systematics: Stuttgart Contributions to Natural History*, 4(1), 55-213.
- Giachini Tosetto, E., Bertrand, A., Neumann-Leitão, S., & Nogueira Júnior, M. (2022). The Amazon River plume, a barrier to animal dispersal in the Western Tropical Atlantic. *Scientific Reports*, 12(1), 537.
- Glaus, K. B., Appleyard, S. A., Stockwell, B., Brunnschweiler, J. M., Shivji, M., Clua, E., ... & Rico, C. (2020). Insights Into Insular Isolation of the Bull Shark, *Carcharhinus leucas* (Müller and Henle, 1839), in Fijian Waters. *Frontiers in Marine Science*, 7, 586015.
- Gonzalez, C., Gallagher, A. J., & Caballero, S. (2019). Conservation genetics of the bonnethead shark *Sphyrna tiburo* in Bocas del Toro, Panama: Preliminary evidence of a unique stock. *PLoS One*, 14(8), e0220737.
- Gorman, J., Marra, N., Shivji, M. S., & Stanhope, M. J. (2019). The complete mitochondrial genome of an Atlantic Ocean Shortfin Mako Shark, *Isurus oxyrinchus*. *Mitochondrial DNA Part B*, 4(2), 3642-3643.
- Hara, Y., Yamaguchi, K., Onimaru, K., Kadota, M., Koyanagi, M., Keeley, S. D., ... & Kuraku, S. (2018). Shark genomes provide insights into elasmobranch evolution and the origin of vertebrates. *Nature ecology & evolution*, 2(11), 1761-1771.
- Hellberg, M. E., Burton, R. S., Neigel, J. E., & Palumbi, S. R. (2002). Genetic assessment of connectivity among marine populations. *Bulletin of marine science*, 70(1), 273-290.
- Heupel, M. R., Carlson, J. K., & Simpfendorfer, C. A. (2007). Shark nursery areas: concepts, definition, characterization and assumptions. *Marine ecology progress series*, 337, 287-297.

- Holmes, B. H., Steinke, D., & Ward, R. D. (2009). Identification of shark and ray fins using DNA barcoding. *Fisheries Research*, 95(2-3), 280-288.
- Hoyos-Padilla, E. M. (2001). Las áreas de crianza de tiburones en el caribe y Golfo de México con un enfoque especial a la laguna de Yalahau en Quintana Roo (Tesis de Licenciatura. UNAM).
- Hoyos-Padilla, E. M., Casanova-Santamaria, I., Loria-Correa, J. C., & Sulikowski, J. (2023) The successful use of a submersible ultrasound to confirm pregnancy on free swimming bull sharks, *Carcharhinus leucas*, in a provisioned shark site. *Frontiers in Marine Science*, 10, 1193563.
- Hueter, R. E., & Manire, C. A. (1994). Bycatch and catch-release mortality of small sharks in the Gulf coast nursery grounds of Tampa Bay and Charlotte Harbor.
- Hueter, R. E. (1998). Philopatry, natal homing and localised stock depletion in sharks. *Shark News*, 12, 1-2.
- Hueter, R. E., Heupel, M. R., Heist, E. J., & Keeney, D. B. (2005). The implications of philopatry in sharks for the management of shark fisheries. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, 35, 239-247.
- Jombart, T., Kamvar, Z. N., Collins, C., Lustrik, R., Beugin, M. P., Knaus, B. J., & Jombart, M. T. (2018). Package ‘adegenet’. *Github repository*:< <https://github.com/thibautjombart/adegenet>.
- Junge, C., Donnellan, S. C., Huvneers, C., Bradshaw, C. J., Simon, A., Drew, M., ... & Gillanders, B. M. (2019). Comparative population genomics confirms little population structure in two commercially targeted carcharhinid sharks. *Marine Biology*, 166(2), 1-15.
- Karl, S. A., Castro, A. L. F., Lopez, J. A., Charvet, P., & Burgess, G. H. (2011). Phylogeography and conservation of the bull shark (*Carcharhinus leucas*) inferred from mitochondrial and microsatellite DNA. *Conservation Genetics*, 12(2), 371-382.
- Keeney, D. B., Heupel, M., Hueter, R. E., & Heist, E. J. (2003). Genetic heterogeneity among blacktip shark, *Carcharhinus limbatus*, continental nurseries along the US Atlantic and Gulf of Mexico. *Marine Biology*, 143, 1039-1046.
- Keeney, D. B., Heupel, M. R., Hueter, R. E., & Heist, E. J. (2005). Microsatellite and mitochondrial DNA analyses of the genetic structure of blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) nurseries in the northwestern Atlantic, Gulf of Mexico, and Caribbean Sea. *Molecular Ecology*, 14(7), 1911-1923.
- Keinath, M. C., Timoshevskiy, V. A., Timoshevskaya, N. Y., Tsonis, P. A., Voss, S. R., & Smith, J. J. (2015). Initial characterization of the large genome of the salamander *Ambystoma mexicanum* using shotgun and laser capture chromosome sequencing. *Scientific reports*, 5(1), 1-13.

Kohler NE y Turner PA (2018)/ United States, National Marine Fisheries Service; Northeast Fisheries Science Center (U.S.); Distributions and Movements of Atlantic Shark Species: A 52-Year Retrospective Atlas of Mark and Recapture Data. *Mar Fish Rev* 81:1-93. <https://dx.doi.org/10.7755/MFR.81.2.1>

Kolesnikov A. A., & Gerasimov, E. S. (2012). Diversity of mitochondrial genome organization. *Biochemistry (Moscow)*, 77(13), 1424-1435.

Kumar, R., & Kumar, V. (2018). A review of phylogeography: biotic and abiotic factors. *Geology, Ecology, and Landscapes*, 2(4), 268-274.

Lea, J. S., Wetherbee, B. M., Queiroz, N., Burnie, N., Aming, C., Sousa, L. L., ... & Shivji, M. S. (2015). Repeated, long-distance migrations by a philopatric predator targeting highly contrasting ecosystems. *Scientific reports*, 5(1), 1-11.

Manuzzi, A., Zane, L., Muñoz-Merida, A., Griffiths, A. M., & Veríssimo, A. (2019). Population genomics and phylogeography of a benthic coastal shark (*Scyliorhinus canicula*) using 2b-RAD single nucleotide polymorphisms. *Biological Journal of the Linnean Society*, 126(2), 289-303.

Marín-Osorno, R. (1992). Aspectos biológicos de los tiburones capturados en las costas de Tamaulipas y Veracruz, México (Tesis Profesional, Universidad Veracruzana, Veracruz, México).

Marra N. J., Stanhope, M. J., Jue, N. K., Wang, M., Sun, Q., Pavinski Bitar, P., ... & Shivji, M. S. (2019). White shark genome reveals ancient elasmobranch adaptations associated with wound healing and the maintenance of genome stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(10), 4446-4455.

Martínez Candelas, I. A. (2019). *Evaluación de Riesgo Ecológico de los Tiburones del sureste del Golfo de México* (Doctoral dissertation, El Colegio de la Frontera Sur).

Mayr E. 1963. *Animal Species and Evolution*. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.

Momigliano, P., Harcourt, R., Robbins, W. D., Jaiteh, V., Mahardika, G. N., Sembiring, A., & Stow, A. (2017). Genetic structure and signatures of selection in grey reef sharks (*Carcharhinus amblyrhynchos*). *Heredity*, 119(3), 142-153.

Morin, P. A., Martien, K. K., & Taylor, B. L. (2009). Assessing statistical power of SNPs for population structure and conservation studies. *Molecular Ecology Resources*, 9(1), 66-73.

Nayfa M. G., & Zenger, K. R. (2016). Unravelling the effects of gene flow and selection in highly connected populations of the silver-lip pearl oyster (*Pinctada maxima*). *Marine genomics*, 28, 99-106.

- Naylor, G. J., Caira, J. N., Jensen, K., Rosana, K. A. M., White, W. T., & Last, P. R. (2012). A DNA sequence-based approach to the identification of shark and ray species and its implications for global elasmobranch diversity and parasitology. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 2012(367), 1-262.
- O'Connell, M. T., Shepherd, T. D., O'Connell, A. M., & Myers, R. A. (2007). Long-term declines in two apex predators, bull sharks (*Carcharhinus leucas*) and alligator gar (*Atractosteus spatula*), in lake pontchartrain, an oligohaline estuary in southeastern Louisiana. *Estuaries and Coasts*, 30(4), 567-574.
- Paris, J. R., Stevens, J. R., & Catchen, J. M. (2017). Lost in parameter space: a road map for stacks. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(10), 1360-1373.
- Pazmiño, D. A., Maes, G. E., Simpfendorfer, C. A., Salinas-de-León, P., & van Herwerden, L. (2017). Genome-wide SNPs reveal low effective population size within confined management units of the highly vagile Galapagos shark (*Carcharhinus galapagensis*). *Conservation Genetics*, 18(5), 1151-1163.
- Pazmiño, D. A., van Herwerden, L., Simpfendorfer, C. A., Junge, C., Donnellan, S. C., Hoyos-Padilla, E. M., ... & Maes, G. E. (2019). Introgressive hybridisation between two widespread sharks in the east Pacific region. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 136, 119-127.
- Pérez Jiménez, J. C., Carranza, M., & Zimbrón, C. (2012). Análisis histórico de las pesquerías de elasmobranquios del sureste del Golfo de México. Recursos Acuáticos Costeros del Surestep. 463-481.
- Pérez-Jiménez J. C. y Mendez-Loeza I. (2015). The small-scale shark fisheries in the southern Gulf of Mexico: Understanding their heterogeneity to improve their management. *Fisheries Research*, Volume 172, Pages 96-104, <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2015.07.004>.
- Pérez-Jiménez, J. C., Peña-Puch, A., Méndez-Loeza, I., Giard-Leroux, A., Flores-Ramos, E., & López-Rasgado, F. J. (2016). Las pesquerías artesanales de elasmobranquios como parte de sistemas pesqueros complejos en el sur del Golfo de México. *Ciencia Pesquera*, 24, 113-124.
- Pérez-Jiménez, J. C., Wakida-Kusunoki, A., Hernández-Lazo, C., & Mendoza-Carranza, M. (2020). Shark-catch composition and seasonality in the data-poor small-scale fisheries of the southern Gulf of Mexico. *Marine and Freshwater Research*, 71(9), 1182-1193.
- Peterson B. K., Weber, J. N., Kay, E. H., Fisher, H. S., & Hoekstra, H. E. (2012). Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PloS one*, 7(5), e37135.

- Pinhal, D., Domingues, R. R., Bruels, C. C., Ferrette, B. L., Gadig, O. B., Shivji, M. S., & Martins, C. (2020). Restricted connectivity and population genetic fragility in a globally endangered Hammerhead Shark. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 30(3), 501-517.
- Pirog, A., Magalon, H., Poirout, T., & Jaquemet, S. (2019_a). Reproductive biology, multiple paternity and polyandry of the bull shark *Carcharhinus leucas*. *Journal of Fish Biology*, 95(5), 1195-1206.
- Pirog, A., Ravigné, V., Fontaine, M. C., Rieux, A., Gilabert, A., Cliff, G., ... & Magalon, H. (2019_b). Population structure, connectivity, and demographic history of an apex marine predator, the bull shark *Carcharhinus leucas*. *Ecology and evolution*, 9(23), 12980-13000.
- Portnoy, D. S., Piercy, A. N., Musick, J. A., Burgess, G. H., & Graves, J. E. (2007). Genetic polyandry and sexual conflict in the sandbar shark, *Carcharhinus plumbeus*, in the western North Atlantic and Gulf of Mexico. *Molecular Ecology*, 16(1), 187-197.
- Portnoy, D. S., & Heist, E. J. (2012). Molecular markers: progress and prospects for understanding reproductive ecology in elasmobranchs. *Journal of Fish Biology*, 80(5), 1120-1140.
- Portnoy, D. S., Puritz, J. B., Hollenbeck, C. M., Gelsleichter, J., Chapman, D., & Gold, J. R. (2015). Selection and sex-biased dispersal in a coastal shark: The influence of philopatry on adaptive variation. *Molecular Ecology*, 24(23), 5877-5885.
- Portnoy, D. S., Hollenbeck, C. M., Bethea, D. M., Frazier, B. S., Gelsleichter, J., & Gold, J. R. (2016). Population structure, gene flow, and historical demography of a small coastal shark (*Carcharhinus isodon*) in US waters of the Western Atlantic Ocean. *ICES Journal of Marine Science*, 73(9), 2322-2332.
- Rangel-Morales, J. M., Rosales-López, L. P., Díaz-Jaimes, P., Amezcua-Martínez, F., Ketchum, J. T., Hoyos-Padilla, M., & Corgos, A. (2022). Regional philopatry of scalloped hammerhead sharks (*Sphyrna lewini*) to nursery areas in the Mexican Pacific. *Hydrobiologia*, 849(14), 3083-3099.
- Read, T. D., Petit, R. A., Joseph, S. J., Alam, M., Weil, M. R., Ahmad, M., ... & Dove, A. D. (2017). Draft sequencing and assembly of the genome of the world's largest fish, the whale shark: *Rhincodon typus* Smith 1828. *BMC genomics*, 18(1), 1-10.
- Rigby, C.L., Espinoza, M., Derrick, D., Pacoureau, N. & Dicken, M. 2021. *Carcharhinus leucas*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2021: e.T39372A2910670. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2021-2.RLTS.T39372A2910670.en>
- Rochette, N. C., & Catchen, J. M. (2017). Deriving genotypes from RAD-seq short-read data using Stacks. *Nature Protocols*, 12(12), 2640-2659.

- Robertson, D. R., & Cramer, K. L. (2014). Defining and dividing the greater Caribbean: insights from the biogeography of shorefishes. *PLoS One*, 9(7), e102918.
- Roskar G., McCallister, M. P., Schaefer, A. M., & Ajemian, M. J. (2020). Elasmobranch community dynamics in Florida's southern Indian River Lagoon. *Estuaries and Coasts*, 44(3), 801-817.
- Saccone, C., De Giorgi, C., Gissi, C., Pesole, G., & Reyes, A. (1999). Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene*, 238(1), 195-209.
- Sandoval-Laurrabaquio Alvarado N. (2015). Filopatría y divergencia genética del tiburón toro (*Carcharhinus leucas*) en costas de Florida, E.U.A., Golfo y Caribe de México. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, UNAM.
- Selkoe, K. A., & Toonen, R. J. (2006). Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology letters*, 9(5), 615-629.
- Sembiring, A., Pertiwi, N. P. D., Mahardini, A., Wulandari, R., Kurniasih, E. M., Kuncoro, A. W., ... & Mahardika, G. N. (2015). DNA barcoding reveals targeted fisheries for endangered sharks in Indonesia. *Fisheries Research*, 164, 130-134.
- Shaklee, J. B., Beacham, T. D., Seeb, L., & White, B. A. (1999). Managing fisheries using genetic data: case studies from four species of Pacific salmon. *Fisheries Research*, 43(1-3), 45-78.
- Shivji, M. S., Chapman, D. D., Pikitch, E. K., & Raymond, P. W. (2005). Genetic profiling reveals illegal international trade in fins of the great white shark, *Carcharodon carcharias*. *Conservation Genetics*, 6(6), 1035-1039.
- Sosa-Nishizaki, O., Taniuch, T., Ishihara, H., & Shimizu, M. (1998). The bull shark, *Carcharhinus leucas* (Valenciennes, 1841), from the Usumacinta River, Tabasco, Mexico, with notes on its serum composition and osmolarity. *Ciencias Marinas*, 24(2), 183-192.
- Tavares, R., & Sánchez, L. (2012). Áreas de cría de tiburones en el Golfo de Venezuela. *Ciencia*, 20(2), 116-124.
- Thorburn, D. C., & Rowland, A. J. (2008). Juvenile bull sharks' *Carcharhinus leucas* (Valenciennes, 1839) in northern Australian rivers. *Beagle: Records of the Museums and Art Galleries of the Northern Territory*, The, 24, 79-86.
- Tillett, B. J., Meekan, M. G., Field, I. C., Thorburn, D. C., & Ovenden, J. R. (2012). Evidence for reproductive philopatry in the bull shark *Carcharhinus leucas*. *Journal of fish biology*, 80(6), 2140-2158.

- Venkatesh, B., Lee, A. P., Ravi, V., Maurya, A. K., Lian, M. M., Swann, J. B., ... & Warren, W. C. (2014). Elephant shark genome provides unique insights into gnathostome evolution. *Nature*, *505*(7482), 174-179.
- Veríssimo, A., Sampaio, Í., McDowell, J. R., Alexandrino, P., Mucientes, G., Queiroz, N., ... & Noble, L. R. (2017). World without borders—genetic population structure of a highly migratory marine predator, the blue shark (*Prionace glauca*). *Ecology and Evolution*, *7*(13), 4768-4781.
- Vignaud, T. M., Maynard, J. A., Leblois, R., Meekan, M. G., Vázquez-Juárez, R., Ramírez-Macías, D., ... & Planes, S. (2014). Genetic structure of populations of whale sharks among ocean basins and evidence for their historic rise and recent decline. *Molecular ecology*, *23*(10), 2590-2601.
- Waples, R. S., & Lindley, S. T. (2018). Genomics and conservation units: The genetic basis of adult migration timing in Pacific salmonids. *Evolutionary Applications*, *11*(9), 1518-1526.
- Ward-Paige, C. A., Mora, C., Lotze, H. K., Pattengill-Semmens, C., McClenachan, L., Arias-Castro, E., & Myers, R. A. (2010). Large-scale absence of sharks on reefs in the greater-Caribbean: a footprint of human pressures. *PloS one*, *5*(8), e11968.
- Wilkinson, T. A. (2009). *Marine ecoregions of North America*. Instituto Nacional de Ecología.
- Woodings, L. N., Murphy, N. P., Doyle, S. R., Hall, N. E., Robinson, A. J., Liggins, G. W., ... & Strugnell, J. M. (2018). Outlier SNPs detect weak regional structure against a background of genetic homogeneity in the Eastern Rock Lobster, *Sagmariasus verreauxi*. *Marine Biology*, *165*, 1-17.
- Worm, B., Davis, B., Kettner, L., Ward-Paige, C. A., Chapman, D., Heithaus, M. R., Kessel S. T. y Gruber, S. H. (2013). Global catches, exploitation rates, and rebuilding options for sharks. *Marine Policy*, *40*, 194-204.