



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

**BIOLOGÍA EVOLUTIVA**

### **EVIDENCIA GENÉTICA DE FILOPATRÍA REGIONAL DE *Sphyrna lewini* (CARCHARHINIFORMES: SPHYRNIDAE) EN EL GOLFO DE MÉXICO**

## **TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**MASSIEL ALFONSO GONZÁLEZ**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. PÍNDARO DÍAZ JAIMES. ICMyL, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. CLAUDIA PATRICIA ORNELAS GARCÍA. INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM.

DR. GERARDO PÉREZ PONCE DE LEÓN. INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM.

**Ciudad Universitaria, CD. MX., Agosto, 2020**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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





# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

**BIOLOGÍA EVOLUTIVA**

**EVIDENCIA GENÉTICA DE FILOPATRÍA REGIONAL DE *Sphyrna lewini*  
(CARCHARHINIFORMES: SPHYRNIDAE) EN EL GOLFO DE MÉXICO**

## **TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**MASSIEL ALFONSO GONZÁLEZ**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. PÍNDARO DÍAZ JAIMES. ICMyL, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. CLAUDIA PATRICIA ORNELAS GARCÍA. INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM.

DR. GERARDO PÉREZ PONCE DE LEÓN. INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM.

**Ciudad Universitaria, CD. MX., 2020**

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  
OFICIO FCIE/DAIP/0307/2020  
ASUNTO: Oficio de Jurado

**M. en C. Ivonne Ramírez Wence**  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas y Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **22 de junio de 2020** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Evolutiva** de la estudiante **ALFONSO GONZÁLEZ MASSIEL** con número de cuenta **519492022** con la tesis titulada **“EVIDENCIA GENÉTICA DE FILOPATRÍA REGIONAL DE *Sphyrna lewini* (CARCHARHINIFORMES: SPHYRNIDAE) EN EL GOLFO DE MÉXICO”**, realizada bajo la dirección del **DR. PÍNDARO DÍAZ JAIMES**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente:	<b>DR. JUAN SERVANDO NÚÑEZ FARFÁN</b>
Vocal:	<b>DR. JAIRO ANDRÉS ARROYAVE GUTIÉRREZ</b>
Secretario:	<b>DRA. CLAUDIA PATRICIA ORNELAS GARCÍA</b>
Suplente:	<b>DRA. GABRIELA PARRA OLEA</b>
Suplente:	<b>DRA. ELLA GLORIA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ</b>

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

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 04 de agosto de 2020

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**



## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por todos los recursos académicos que me brindó para cursar la maestría.

Al apoyo económico otorgado por CONACyT para poder realizar mis estudios, así como al financiamiento otorgado por el PAPIIT IN: 204518 que llevó como título: Evaluación de la divergencia genética por fidelidad a sitios de crianza de dos especies de tiburón en el Golfo de México y conservación de los recursos genéticos en sus poblaciones.

A la Coordinación de Super Computo DGTIC, UNAM por el acceso al HP System Cluster Platform 3000 SL "Miztli" bajo el proyecto LANCAD-UNAM-DGTIC-341 (2020) "Análisis bioinformático, estadístico y genómica poblacional de especies de importancia comercial en costas Mexicanas".

A mi asesor de tesis, Dr. Píndaro Díaz Jaimes por abrirme las puertas de su laboratorio. Gracias por su dedicación y compromiso, sus consejos han sido determinantes en mi formación académica.

A los miembros del Comité Tutoral, doctores Claudia Patricia Ornelas García y Gerardo Pérez Ponce de León por todo el apoyo brindado durante estos dos años. Gracias por el tiempo dedicado a la revisión del manuscrito y las valiosas contribuciones que aportaron a este proyecto.

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

Son muchas las personas que de una forma u otra me acompañaron durante esta trayectoria, pero siempre hay algunas que dejan una huella...

Primero que todo, agradezco a mis padres por la educación que me dieron desde pequeña y gracias a la cual hoy he llegado hasta aquí. Su apoyo incondicional, su confianza y sobre todo su amor, me han dado las fuerzas necesarias para lograr lo que me propongo. A pesar de la distancia, sé que siempre cuidan de mí... los quiero muchoooooo.

A mi familia, en especial a mi abuelita Mami por todo su amor.

A Alex y Brownie por ser mi compañía de cada día. Solo ustedes saben sacarme una sonrisa cuando siento que todo se viene abajo. Solo ustedes (Brownie puede que aún no entienda estas cosas 😊) saben lo difícil que ha sido este tiempo lejos de mi familia y en un país muy diferente al nuestro. Gracias a ustedes, hoy soy una mujer más fuerte.

A Adolfo y Claudia por ser tan lindos desde el primer día. Sin dudas son de las mejores personas que conozco. Gracias por hacernos sentir como en casa, saben que para nosotros son parte de nuestra familia.

A Ivonne y familia por consentirnos tanto y estar a nuestro lado en uno de los momentos más difíciles, cuando todo era nuevo. También forman parte de nuestra familia mexicana.

A mis amigas las Gabys, Laura y Magui (orden alfabético) por todos los altibajos que hemos tenido que demuestran lo que es una verdadera amistad. No importa la distancia que nos separa o el tiempo que llevamos sin vernos, las sigo extraño mucho.

A mis amigos del Lab: Fer, Pedro, Nadia y Pao, así como al Dr. Uribe por todos los momentos que hemos compartido y lo agradable que hacen la convivencia.

A todos...

*Muchas gracias*

## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	3
1. INTRODUCCIÓN .....	5
1.1 OBJETIVOS .....	7
1.2 ANTECEDENTES.....	8
1.3 MARCO TEÓRICO .....	10
1.3.1 Información básica de <i>Sphyrna lewini</i> .....	10
1.3.2 Marcadores moleculares .....	13
1.3.3 Características del Golfo de México .....	15
2. METODOLOGÍA.....	17
2.1 COLECTA DEL MATERIAL BIOLÓGICO .....	17
2.2 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS .....	18
2.2.1 Extracción de DNA .....	18
2.2.2 Amplificación de <i>loci</i> microsatélites.....	19
2.2.3 Sonicación y limpieza de las muestras .....	20
2.2.4 Preparación de bibliotecas genómicas y secuenciación .....	20
2.3 PROCESAMIENTO DE DATOS .....	21
2.3.1 Estimación de diversidad genética nuclear y mitocondrial.....	22
2.3.2 Análisis de diferenciación genética .....	23
3. RESULTADOS.....	25
3.1 DIVERSIDAD GENÉTICA NUCLEAR Y MITOCONDRIAL.....	26
3.2 EVALUACIÓN DE ESTRUCTURA GENÉTICA.....	29
4. DISCUSIÓN .....	32
4.1 DIVERSIDAD GENÉTICA NUCLEAR Y MITOCONDRIAL.....	32

4.2 ESTRUCTURA GENÉTICA .....	36
4.3 FILOPATRÍA DE <i>Sphyrna lewini</i> .....	38
5. CONCLUSIONES.....	41
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. (a) Vista ventral y lateral de *Sphyrna lewini*, modificado de FAO (2016); (b) Distribución geográfica de *S. lewini*, tomado de IUCN (2018)..... 11
- Figura 2. Ecorregiones del Golfo de México. (1) GM\_Norte, (2) GM\_Sur. Plataforma del norte (1.1), Talud del norte (1.2), Cuenca del Golfo (1.3), Plataforma del sur (2.1), Abanico del Misisipi (2.2), Talud del sur (2.3), Cuenca del Golfo de México (2.4). Modificado de Wilkinson *et al.* (2009). ..... 16
- Figura 3. Total de muestras colectadas de neonatos y juveniles de *Sphyrna lewini* en el Golfo de México entre los años 2010 y 2019. Golfo de México-Campeche N=10, Champotón N=1 y Cd. del Carmen N=4 (2018). Tabasco N=38 (2010 y 2013). Tampico N=3, La Pesca N=6, San Fernando N=10 y Matamoros N=2 (2019). Total N=74. .... 18
- Figura 4. Mapa del mitogenoma de *Sphyrna lewini* en el Golfo de México. .... 26
- Figura 5. Distribución de las frecuencias alélicas para los *loci* microsatélites SLE013, SLE025, SLE027, SLE028, SLE033, SLE038, SLE054, SLE086 y SLE089 en neonatos y juveniles de *Sphyrna lewini* en el Golfo de México. .... 27
- Figura 6. Comparación de los valores promedio de diversidad genética nuclear de *Sphyrna lewini* entre Golfo de México Sur y Golfo de México Norte, basados en el análisis de nueve *loci* microsatélites. Tamaño de muestra (N), número de alelos (Na), número de alelos efectivos (Ne), heterocigosidad esperada (He). .... 29
- Figura 7. Comparación de los índices de diversidad genética del mitogenoma de individuos de *Sphyrna lewini* entre el Golfo de México Sur y Golfo de México Norte. Tamaño de muestra (N), número de sitios polimórficos (S), número de haplotipos (h), diversidad haplotípica (Hd) y diversidad nucleotídica ( $\pi$ ). .... 29
- Figura 8. Probabilidad de pertenencia de los individuos de *Sphyrna lewini* a cada grupo definido, inferida con datos de 7 *loci* microsatélites en Structure. Golfo de México Sur (verde) y Golfo de México Norte (azul). (a) total de individuos; (b) conjunto NoRelMicros. .... 30

Figura 9. Red de haplotipos obtenida mediante un algoritmo de *Median Joining* a partir del análisis de la Región Control del mitogenoma de *Sphyrna lewini* en el Golfo de México. Para su construcción fueron empleados los datos del conjunto NoRelMitos. El tamaño del círculo es proporcional al número de individuos que presentaron ese haplotipo. .... 31

Figura 10. Comparación de los valores promedio de heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ) obtenidos en el presente estudio y los informados previamente para *S. lewini* empleando al menos 8 de los 9 *loci* microsatélites analizados. MX: Pacífico mexicano; CR: Costa Rica; PAN: Panamá; ECU: Ecuador; OAB: Cuencas árabes..... 33

## LISTA DE TABLAS

Tabla I. <i>Loci</i> microsatélites empleados: SLE013, SLE025, SLE027, SLE028, SLE033, SLE038, SLE054, SLE086 y SLE089 descritos por Nance <i>et al.</i> (2009) en <i>Sphyrna lewini</i> . .....	19
Tabla II. Caracterización de los <i>loci</i> microsatélites analizados en neonatos y juveniles de <i>Sphyrna lewini</i> en el Golfo de México. Tamaño de muestra (N), Número de alelos (Na), Número de alelos efectivos (Ne), Riqueza alélica (Rs), Heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He). .....	26
Tabla III. Caracterización del mitogenoma, porción codificantes de proteínas y Región Control de individuos neonatos y juveniles de <i>Sphyrna lewini</i> en el Golfo de México. Número de sitios polimórficos (S), número de haplotipos (h), diversidad haplotípica (Hd) y diversidad nucleotídica ( $\pi$ ). .....	28
Tabla IV. Valores de $F_{ST}$ y $\Phi_{ST}$ pareados basados en el mitogenoma de todos los individuos neonatos y juveniles de <i>Sphyrna lewini</i> (encima; Golfo de México Sur N=52, Golfo de México Norte N=21) y el conjunto NoRelMitos (debajo; Golfo de México Sur N=49, Golfo de México Norte N=21). .....	30
Tabla V. Valores de $F_{ST}$ y $\Phi_{ST}$ para cada uno de los genes que presentaron al menos un sitio informativo en el mitogenoma de <i>Sphyrna lewini</i> del Golfo de México. Los valores fueron calculados con el conjunto NoRelMitos. ....	30
Tabla VI. Comparación del tamaño de muestra (N), número de <i>loci</i> y número de alelos (Na) obtenidos en el presente estudio con los trabajos previos realizados en <i>S. lewini</i> en donde emplean al menos 8 de los 9 <i>loci</i> microsatélites analizados. MX: Pacífico mexicano; CR: Costa Rica; PAN: Panamá; ECU: Ecuador; OAB: Cuencas árabes. ....	33
Tabla VII. Comparación de los índices de diversidad para el genoma mitocondrial obtenidos en el presente estudio y los previamente informados en condriictios y peces óseos. Número de sitios polimórficos (S), Proporción de S (Pn), Número de haplotipos (h), Diversidad haplotípica (Hd) y Diversidad nucleotídica ( $\pi$ ). .....	34

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ATP6: ATP sintasa subunidad 6

ATP8: ATP sintasa subunidad 8

COX1: citocromo c oxidasa subunidad 1

COX2: citocromo c oxidasa subunidad 2

COX3: citocromo c oxidasa subunidad 3

CytB: citocromo b

NAD1: NAD deshidrogenasa subunidad 1

NAD2: NAD deshidrogenasa subunidad 2

NAD3: NAD deshidrogenasa subunidad 3

NAD4: NAD deshidrogenasa subunidad 4

NAD4l: NAD deshidrogenasa subunidad 4l

NAD5: NAD deshidrogenasa subunidad 5

NAD6: NAD deshidrogenasa subunidad 6

## RESUMEN

Los tiburones se encuentran entre los principales recursos pesqueros a nivel mundial y debido a la sobreexplotación y destrucción de sus hábitats, han presentado una disminución acelerada de sus poblaciones en las últimas décadas. El tiburón martillo común *Sphyrna lewini* es una de las especies amenazadas a lo largo de su distribución circunglobal, de ahí que esté incluido en la categoría "En Peligro Crítico" según la IUCN. Por tanto, el estudio de su dinámica poblacional y las consecuencias sobre su diversidad y estructura genética, resulta primordial en la determinación de la escala espacial adecuada para el manejo y protección de la especie. A pesar de que *S. lewini* es una especie migratoria y presenta una alta capacidad de dispersión, se ha demostrado que las hembras tienden a regresar a su lugar o región de nacimiento a dar luz, comportamiento conocido como filopatría. Esto produce una segregación diferencial de haplotipos mitocondriales, mientras se mantiene una homogeneidad genética en el DNA nuclear debido a la dispersión aleatoria de los machos.

En el presente estudio se emplearon nueve *loci* microsatélites y el genoma mitocondrial completo para evaluar la diversidad y estructura genética de *S. lewini* en el Golfo de México y su relación con un posible comportamiento filopátrico en hembras. Para ello fueron procesadas 74 muestras de neonatos y juveniles pertenecientes a áreas de crianza de las ecorregiones Sur y Norte del Golfo.

Se obtuvo el genotipado de los nueve *loci* microsatélites en 70 individuos y se secuenciaron 73 mitogenomas. Los mitogenomas obtenidos estuvieron formados por 16 723 pares de bases (pb), siendo los más pequeños informados para la especie. La diversidad genética, en términos de número de alelos y heterocigosidades (microsatélites) y sitios polimórficos y haplotipos (mitogenoma completo), fue inferior a la reportada para otras poblaciones de la especie. Esto probablemente se deba al menor tamaño de muestra y área geográfica evaluada en el presente estudio, así como la edad de las poblaciones de la especie en el Atlántico, que se supone son las de formación más reciente. Al analizar cada porción del mitogenoma, la mayor diversidad la presentó la Región Control, contrario a lo reportado para la población del Pacífico mexicano donde el fragmento más variable fue NAD5. Esto puede estar determinado por la inusual variabilidad encontrada en un fragmento de 10 pb de la Región Control.

Los análisis de estructura mostraron homogeneidad genética al evaluar los marcadores nucleares y el mitogenoma completo. Sin embargo, hubo señal de diferenciación entre Sur y Norte al utilizar solo la Región Control del mtDNA, lo que probablemente se deba a la elevada

tasa de sustitución que caracteriza a este fragmento y su consecuente resolución para detectar diferencias a pequeña escala geográfica y entre linajes separados hace unos pocos cientos o miles de años.

La homogeneidad genética detectada con marcadores nucleares y la diferenciación genética encontrada con la Región Control de mtDNA en neonatos y juveniles muestreados en áreas de crianza del Golfo de México, sugieren la existencia de filopatría en las hembras. A su vez, la similitud genética detectada con marcadores mitocondriales entre las localidades pertenecientes a una misma región, y la diferenciación encontrada entre las ecorregiones Golfo de México Sur y Golfo de México Norte sugieren que la especie exhibe un comportamiento filopátrico regional. De esta forma fueron identificados dos linajes, uno presentado por los individuos de áreas de crianza de Tamaulipas y el otro de Tabasco+Campeche. No obstante, no descartamos la posible existencia de filopatría natal, por lo que es necesario aumentar el número de muestras para algunas localidades y complementar la información genética con técnicas de marcaje.

## ABSTRACT

Sharks are among the main fishery resources at global scale and due to overexploitation and habitats destruction; their populations have suffered an accelerated decline in the recent decades. The Scalloped hammerhead *Sphyrna lewini* is one of those threatened species throughout its global distribution; hence, it is included in the category "Critically Endangered" according to the IUCN. Therefore, the study of the species population dynamics and its consequences on the diversity and genetic structure is essential for determining the proper spatial scale in the management of the species. Although *S. lewini* is a migratory species and has a high dispersal capacity, females have been shown to return to the area where they were born, behavior known as philopatry. This produces a differential segregation of mitochondrial haplotypes, while maintaining genetic homogeneity in nuclear DNA due to the random dispersion of males.

In the present study, we employed nine microsatellite loci and the complete mitochondrial genome to assess the genetic diversity and structure of *S. lewini* in the Gulf of Mexico and its relationship with suggested philopatric behavior in females. We analyzed samples from 74 neonates and juveniles belonging to breeding areas of the Southern and Northern Gulf of Mexico ecoregions.

We obtained genotypes of nine microsatellite loci for 70 individuals and sequenced 73 mitogenomes. The mitogenomes obtained were composed by 16,723 base pairs (bp), being the smallest reported for the species. Genetic diversity, in terms of the number of alleles and heterozygosities (microsatellites) and polymorphic sites and haplotypes (mitogenomes), was lower than that reported for other populations of the species. This is probably due to the smaller sample size and the geographic area analyzed in the present study, as well as the age of the Atlantic populations, which are supposed to be the most recent of the species. When analyzing each portion of the mitogenome, the greatest diversity was shown by the Control Region, contrary to that reported for the population of the Mexican Pacific where the most variable fragment was NAD5. This is determined by the unusual variability found in a 10 bp fragment from the Control Region.

By evaluating nuclear markers and the complete mitogenome in structure analyzes, we found genetic homogeneity. However, we found significant differentiation between South and North when analyzing only the Control Region of the mtDNA. This is probably due to the high substitution rate that characterizes this region and its consequent resolution to detect differences on a small geographic and lineage scale, separated a few hundred or thousands of years ago.

The genetic homogeneity detected with nuclear markers and the significant differentiation found with the Control Region of mtDNA, in neonates and juveniles sampled in breeding areas of the Gulf of Mexico, suggest the existence of philopatry in females. At the same time, the genetic similarity detected with mitochondrial markers between the localities belonging to the same region, and the differentiation found between the South and North ecoregions of the Gulf of Mexico suggest that the species exhibits a regional phylopatric behavior. Thus, two lineages were identified, one presented by individuals from breeding areas in Tamaulipas and the other from Tabasco + Campeche. However, we do not rule out the possible existence of natal philopatry, so it is necessary to increase the number of samples for some localities and complement the genetic information with marking techniques.

## 1. INTRODUCCIÓN

El estudio de la dinámica poblacional y sus consecuencias sobre la diversidad genética de especies comerciales es un aspecto de importancia primordial para el aprovechamiento racional y conservación de la biodiversidad. De estos elementos se desprenden decisiones importantes para la definición de unidades evolutivamente significativas (ESU, por sus siglas en inglés) (Waples, 1995) y unidades de manejo (Moritz, 1994) y con esto, prioridades de conservación que resultan urgentes en el contexto contemporáneo de la pérdida acelerada de biodiversidad.

Las especies marinas con amplio rango de distribución y alta capacidad de dispersión, generalmente presentan niveles bajos de estructura genética (Heist, 2004). Sin embargo, variaciones ambientales (e.g. temperatura y productividad (Ketchum *et al.*, 2014)) y la existencia de determinados comportamientos reproductivos van a determinar los movimientos de los individuos. Esto puede limitar el flujo de genes entre poblaciones adyacentes, incluso en ausencia de barreras físicas (Champan *et al.*, 2015; Dudgeon *et al.*, 2012).

Uno de los comportamientos que suele generar la aparición de diferencias genéticas entre poblaciones de regiones geográficas relativamente cercanas es la filopatría (Hueter *et al.*, 2005). Esta se define como la tendencia que tienen los individuos a permanecer en su lugar de nacimiento o regresar a este para reproducirse (Mayr, 1963) y ha sido documentada en varios grupos como tortugas (Lee *et al.*, 2007; Bowen *et al.*, 2004), peces óseos (Rooker *et al.*, 2008; Thorrold *et al.*, 2001) y mamíferos marinos (Baker *et al.*, 2013; Tsai *et al.*, 2013). La filopatría se presenta de manera diferencial en hembras y/o machos, por lo que la detección de diferenciación genética depende del sexo filopátrico y el tipo de herencia de los marcadores moleculares utilizados. De esta forma, se espera un mayor grado de diferencias genéticas al utilizar marcadores uniparentales (heredados por el sexo filopátrico) respecto al empleo de marcadores biparentales (heredados por ambos sexos).

En condriictios (*i.e.* peces cartilaginosos), los estudios genéticos y de marcaje indican que generalmente las hembras de ciertas especies regresan preferentemente a sus lugares de nacimiento exactos (filopatría natal) o regiones (filopatría regional), ya sea para el apareamiento o parto, a pesar de que realizan movimientos de largas distancias, que les permitiría reproducirse en otros lugares (Chapman *et al.*, 2015). Esta conducta diferencial entre sexos produce una segregación de haplotipos mitocondriales (heredados por vía materna), mientras se mantiene una homogeneidad genética en el DNA nuclear debido a la dispersión aleatoria de los machos.

Entre las principales ventajas propuestas para este comportamiento están: (1) aumento del potencial de cooperación entre individuos que se reproducen dentro de los grupos sociales (Chesser, 1991) y (2) aumento en la supervivencia de neonatos y juveniles, lo cual es esencial debido a que los tiburones no presentan cuidados parentales (Hueter *et al.*, 2005). Sin embargo, en las especies que exhiben comportamiento filopátrico, las pesquerías y alteraciones del hábitat en las áreas de reproducción y crianza tienen un impacto negativo sobre las nuevas camadas y los efectos poblacionales pueden ser profundos (Hueter *et al.*, 2005).

Las áreas de crianza para tiburones costeros suelen ser estuarios, manglares, lagunas costeras y bahías semi-cerradas (Salinas-De-León *et al.*, 2017; Salomón-Aguilar *et al.*, 2009; Castro, 1983). Estas se caracterizan por presentar aguas turbias, altamente productivas, que le brindan a los neonatos y juveniles protección contra depredadores y disponibilidad de alimentos. La importancia de estas áreas radica en que son sitios de agregación de hembras grávidas y juveniles que en caso de ser capturados no logran ser reclutados ni reproducirse, generándose una pérdida de diversidad por herencia materna.

*Sphyrna lewini* es una especie pelágica-costera y semi-oceánica que habita las aguas tropicales y subtropicales del mundo. Particularmente en el Atlántico Occidental, se distribuye desde New Jersey (Estados Unidos) hasta Brasil, incluyendo el Golfo de México y Mar Caribe (Compagno, 2001). Es vivípara, de fecundidad relativamente alta (14 a 41 crías), periodo de generación largo (15 años) y baja resiliencia a la explotación pesquera (Baum *et al.*, 2003). Para 1999, era considerada una especie muy abundante, con un alto potencial de explotación (FAO, 1999). Sin embargo, sus poblaciones han disminuido considerablemente de ahí que actualmente se encuentre en el Apéndice II del CITES (CITES, 2013) y se clasifique como 'En Peligro Crítico' según la IUCN (Rigby *et al.*, 2019).

En el Golfo de México han sido identificadas posibles áreas de crianza de *S. lewini*. Particularmente, en la zona del Golfo de México Norte perteneciente a Estados Unidos, estudios basados en datos de abundancia de neonatos y juveniles han propuesto a Isla Dauphin (Parsons y Hoffmayer, 2007) y costas de Texas (Hueter y Tyminski, 2007). En México, en las costas de Tamaulipas se carece de estudios de este tipo, aunque los datos de pesca indican una alta concentración de individuos de *S. lewini* en estas zonas, lo cual sugiere la existencia de un área de crianza (CONAPESCA-INP, 2004). Por su parte, en el Golfo de México Sur se identificó a la localidad de San Pedro-Frontera en Tabasco como una de las principales áreas de crianza de la región (Cuevas, 2018). Esta fue definida con base en los siguientes criterios propuestos por Heupel *et al.* (2007): (1) hay una mayor abundancia de tiburones en esta área, (2) los tiburones

tienden a permanecer en esta área durante períodos prolongados y (3) el área o hábitat se utiliza repetidamente a través de los años. Bajo otros criterios (Knip *et al.*, 2010), la región que abarca Ciudad del Carmen y Champotón también es considerada un área de crianza (Cuevas, 2018). La identificación de posible filopatría hacia estas áreas de crianza permitirá direccionar los planes de conservación y con esto la preservación del acervo genético de la especie.

El uso de marcadores moleculares ha permitido identificar nuevas especies, delimitar poblaciones, estimar tasas de evolución molecular y tamaño poblacional efectivo y analizar la presencia de comportamientos como la filopatría (Dudgeon *et al.*, 2012). En este último, el nivel de divergencia genética entre individuos de diferentes áreas de crianza va a estar determinado por el grado de arraigo a los sitios de nacimiento de las hembras adultas (Hueter *et al.*, 2005).

En el presente estudio se emplearon marcadores moleculares mitocondriales generados mediante tecnologías de secuenciación de nueva generación y marcadores nucleares como los microsatélites, para evaluar la diversidad y estructura poblacional de *S. lewini* en el Golfo de México y determinar si las hembras presentan filopatría a las áreas de crianza propuestas para esta región. La información obtenida será de utilidad para el desarrollo de planes de conservación y manejo pesquero de la especie.

## 1.1 OBJETIVOS

1. Estimar la diversidad genética nuclear y mitocondrial de *S. lewini* en el Golfo de México, mediante el empleo de *loci* microsatélites y genomas mitocondriales completos (mitogenomas).
2. Evaluar la estructura genética de *Sphyrna lewini* en el Golfo de México y su relación con la existencia de comportamiento filopátrico en las hembras.

## 1.2 ANTECEDENTES

En el transcurso del tiempo evolutivo, la diversidad y estructura genética de las poblaciones está sujeta a cambios. Estos cambios van a estar determinados, entre otros factores, por la capacidad de dispersión de los individuos, sus comportamientos, la conectividad de las poblaciones, las variaciones en las condiciones ambientales y la adaptación a cambios naturales o antropogénicos (Dudgeon *et al.*, 2012).

La filopatría es uno de los comportamientos que pueden ocasionar la aparición de diferencias genéticas a escalas geográficas pequeñas (Hueter *et al.*, 2005) y se define como la tendencia que tienen los individuos a permanecer en su lugar de nacimiento o regresar a este (Mayr, 1963). Esta se presenta de manera diferencial en hembras y/o machos, por lo tanto, el grado de arraigo del sexo filopátrico a los sitios de nacimiento, va a determinar el nivel de divergencia genética entre poblaciones (Hueter *et al.*, 2005). En el caso de las aves, generalmente el sexo filopátrico es el masculino, mientras que en mamíferos es el femenino (Greenwood, 1980).

Entre las principales consecuencias de la filopatría están un aumento en el nivel de coancestrías (Chesser, 1991) y la formación de linajes genéticamente diferenciados (Hueter *et al.*, 2005), los cuales deben ser caracterizados y delimitados geográficamente para lograr un buen manejo y uso sustentable de las especies de interés. Esto toma especial relevancia cuando se trata de grupos como los tiburones, donde las tasas de captura son insostenibles para muchas poblaciones y una gran proporción de especies están amenazadas (Chapman *et al.*, 2015).

En los tiburones, la filopatría ha sido ampliamente descrita en las hembras y se ha documentado de diversas fuentes de datos como estudios genéticos y de marcaje. Entre las técnicas de marcaje están la telemetría acústica, donde cada marca emite un código específico que es registrado por un receptor submarino y la telemetría satelital, donde las marcas envían una señal cuando estas entran en contacto con el aire y esta señal es captada por un receptor satelital. Ambas técnicas permiten conocer la posición de los individuos en tiempo real y han sido utilizadas para detectar filopatría en especies como *Heterodontus portusjacksoni* (Bass *et al.*, 2017), *Sphyrna mokarran* (Guttridge *et al.*, 2017) y *Carcharhinus longimanus* (Howey-Jordan *et al.*, 2013).

Por otra parte, entre los trabajos con base en información genética en donde se evalúa este comportamiento destacan los realizados en *Carcharhinus leucas* (Sandoval-Laurrabaquio *et al.*, 2019), *Glyphis glyphis* (Feutry *et al.*, 2017), *Sphyrna tiburo* (Portnoy *et al.*, 2015), *Carcharhinus limbatus* (Keeney *et al.*, 2005) y *Carcharodon carcharias* (Pardini *et al.*, 2001). En

todos ellos, la dispersión sesgada por el sexo femenino ha conducido al mismo patrón: homogeneidad genética nuclear debido a los movimientos aleatorios de los machos y diferenciación mitocondrial resultante del comportamiento filopátrico de las hembras.

En el caso de *S. lewini*, el primer indicio de filopatría fue propuesto por Duncan y Holland (2006) y se basó en la selección continua por parte de los tiburones adultos de un área de crianza en Hawái. Poco después, Duncan *et al.* (2006) realizaron un estudio de filogeografía global de la especie para el cual emplearon la Región Control del mtDNA y detectaron la existencia de tres linajes, los cuales quedaron aislados dentro de las cuencas oceánicas hace cientos o miles de años. Estos autores llegaron a la conclusión de que las poblaciones unidas por una línea costera continua tienen una alta conectividad y que la dispersión oceánica por parte de las hembras es rara. La diferenciación genética fue explicada por la presencia de barreras físicas que limitan el flujo de genes, aunque no descartaron la filopatría. Posteriormente, Chapman *et al.* (2009) mediante el uso del mismo marcador, pero con un mayor tamaño de muestra (N=177) detectaron que las poblaciones de la especie están segregadas geográficamente en el Atlántico Occidental, lo cual fue explicado por filopatría de las hembras. Sin embargo, en este estudio no fueron utilizados marcadores nucleares, por lo que no es correcto hablar de filopatría si se desconoce cómo afecta la dispersión de los machos el flujo genético de la población. Finalmente, Daly-Engel *et al.* (2012) mediante el empleo de marcadores nucleares y mitocondriales confirmaron la existencia de este comportamiento a escala global, sin definir alguna zona en específico que pudiera resaltar por sus niveles de diversidad y divergencia. En el caso particular del Golfo de México solo fueron muestreados 43 individuos procedentes de dos sitios costeros de Estados Unidos (N=20 y N=23) y estos no mostraron señal de diferenciación genética. Por lo tanto, hasta este momento no hay estudios que indiquen que *S. lewini* presenta un comportamiento filopátrico a las principales áreas de crianza reconocidas en el Golfo de México.

### 1.3 MARCO TEÓRICO

#### 1.3.1 Información básica de *Sphyrna lewini*

##### Ubicación taxonómica

La familia Sphyrnidae es un grupo monofilético derivado del orden Carcharhiniformes caracterizada por la presencia de una cabeza dorsoventralmente comprimida y expandida lateralmente (Gilbert, 1967) (Figura 1a). Está formada por dos géneros: *Eusphyrna* con dos especies descritas y *Sphyrna* con nueve especies descritas (Fricke *et al.*, 2020). Dentro de este último, se encuentra *S. lewini* (Griffith y Smith, 1834) conocida como tiburón martillo común.

Reino: Animalia

Phylum: Chordata

Clase: Chondrichthyes

Orden: Carcharhiniformes

Familia: Sphyrnidae

Género: *Sphyrna*

Especie: *Sphyrna lewini* (Griffith y Smith, 1834)

##### Hábitat y distribución geográfica

*Sphyrna lewini* es una especie pelágica-costera y semioceánica que habita las aguas tropicales y subtropicales del mundo. Particularmente, en el Atlántico Occidental se distribuye desde New Jersey (Estados Unidos) hasta Brasil, incluyendo el Golfo de México y Mar Caribe (IUCN, 2018) (Figura 1b). Los adultos se localizan con mayor frecuencia en aguas abiertas, en profundidades superiores a los 275 m (Compagno, 2001), mientras que los neonatos y juveniles están confinados a zonas costeras como estuarios, manglares, lagunas costeras y bahías (Salinas-De-León *et al.*, 2017; Salomón-Aguilar *et al.*, 2009; Castro, 1983).

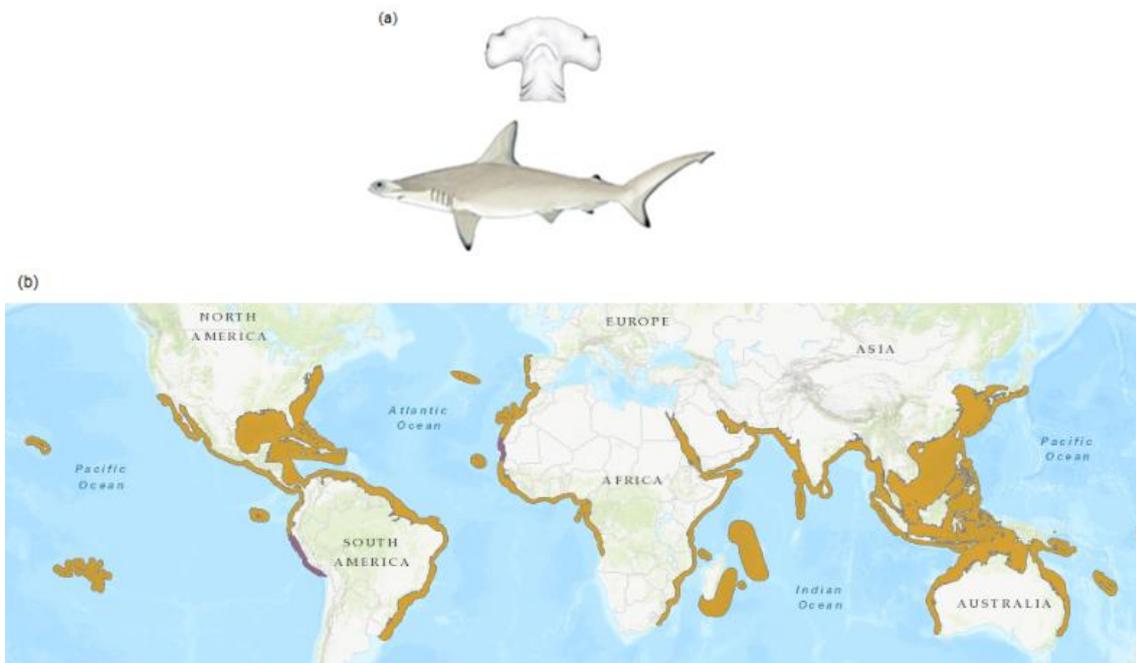


Figura 1. (a) Vista ventral y lateral de *Sphyrna lewini*, modificado de FAO (2016); (b) Distribución geográfica de *S. lewini*, tomado de IUCN (2018).

#### Comportamiento reproductivo

La especie se reproduce anualmente (Castro, 2009; Hazin *et al.*, 2001), es vivípara y presenta una fecundidad relativamente alta (14 a 41 crías, promedio de 25) en comparación con la de otros tiburones (White *et al.*, 2008). En el Golfo de México, las hembras alcanzan su madurez reproductiva alrededor de los 250 cm de longitud, mientras que los machos a los 180 cm (Branstetter, 1987). El apareamiento se produce en aguas abiertas (Salinas de León *et al.*, 2017) y se pueden dar eventos de poliginia y poliandria (Marie *et al.*, 2019). El periodo de gestación es de 8 a 10 meses (White *et al.*, 2008) y transcurrido este tiempo, las hembras adultas migran a las zonas de crianza a parir (Castro, 1983). Los juveniles permanecen en estas áreas alrededor de un año (Marie *et al.*, 2017). Cuando las hembras alcanzan una longitud de aproximadamente 115 cm, abandonan estos sitios y comienzan a migrar hacia aguas profundas mucho antes que los machos (160 cm) hasta alcanzar su talla reproductiva y de esta forma estar biológicamente listas para su primer evento de apareamiento (Klimley *et al.*, 1988).

#### Amenazas y estado de conservación

Los tiburones se encuentran entre los principales recursos pesqueros marinos de importancia mundial, con estimaciones de capturas que llegan a 736 491 t por año (FAO, 2009). En el caso de los esfírnidos, una de las especies que está siendo sobreexplotada es *S. lewini* (Baum *et al.*,

2003). Incluso, se estima que entre 1.3 y 2.7 millones de individuos de *S. zygaena* y *S. lewini* están involucrados en el comercio de aletas cada año (Clarke *et al.*, 2006). Particularmente en el Golfo de México, *S. lewini* representa el 10% de la captura anual (SAGARPA, 2001). Aunado a la sobrepesca hay otros factores que hacen más vulnerable a la especie como la baja resiliencia a la explotación, tiempo generacional superior a los 15 años, pérdida de hábitat, baja fecundidad comparada con los teleósteos y alta depredación de neonatos y juveniles (Shepherd y Myers, 2005; Baum *et al.*, 2003; Holland *et al.*, 1993).

Para 1999 *S. lewini* era considerada como una especie con alto potencial de explotación por su abundancia (FAO, 1999). Sin embargo, ineficientes estrategias de manejo provocaron que esta fuera incluida en el 2007 en la Lista Roja de la IUCN con el *status* de “En Peligro” (Baum *et al.*, 2007), en el 2013 en el Apéndice II del CITES (CITES, 2013) y en el 2019 pasara a la categoría “En Peligro Crítico” según la IUCN (Rigby *et al.*, 2019).

Con el fin de contribuir a la protección de esta especie, así como el resto de los tiburones, en México se han desarrollado varias acciones. Ejemplos de estas son la creación de la NOM 029-PESC-2006 que regula la pesquería de elasmobranquios y el establecimiento de periodos de veda que particularmente en el Golfo de México y Mar Caribe abarcan del 1 de mayo al 30 de junio (Tamaulipas, Veracruz y Quintana Roo) y del 15 de mayo al 15 de junio y del 1 al 29 de agosto (Tabasco, Yucatán y Campeche) (CONAPESCA, 2019). Además, junto a Estados Unidos y Canadá se ha implementado el Plan de acción de América del Norte para un comercio sustentable de especies de tiburón, siendo *S. lewini* una de las ocho especies que lo conforman (CCA, 2017).

Aun cuando se han desarrollado algunas acciones para el manejo sostenible de especies marinas de importancia comercial, estas podrían no ser del todo eficientes para la conservación de cada especie en particular. Por ejemplo, el periodo de veda es el mismo para todos los elasmobranquios, aun cuando se conoce que la temporada reproductiva es diferente entre las especies. En este sentido, el conocimiento de la diversidad y estructura genética de las poblaciones es esencial en el desarrollo de planes de conservación, manteniendo una pesca sustentable (Dudgeon *et al.*, 2012). La delimitación de las poblaciones permite detectar unidades a las cuales aplicar diferentes estrategias de manejo de forma que se conserve su identidad genética y su viabilidad al futuro, considerando elementos como la variabilidad genética y tamaño poblacional efectivo. Además, el empleo de herramientas moleculares permite estimar el grado de conectividad entre las distintas poblaciones, información esencial en tiburones, en donde si bien la capacidad de dispersión es alta, existen comportamientos

como la filopatría que generan la aparición de diferencias genéticas a escala geográfica fina (Hueter *et al.*, 2005).

### 1.3.2 Marcadores moleculares

#### Microsatélites

Los microsatélites o STRs (del inglés, *short tandem repeats*) son secuencias cortas (de una a seis bases nucleotídicas) repetidas en tándem un determinado número de veces, con una variación notable en el número de copias entre individuos (Tautz, 1993). Estos se caracterizan por estar distribuidos a lo largo del genoma nuclear, presentar un elevado polimorfismo, ser codominantes y generalmente neutrales, de herencia mendeliana simple y su amplificación y análisis son relativamente fáciles (Selkoe y Toonen, 2006; Li *et al.*, 2003).

#### Microsatélites en estudios poblacionales en elasmobranquios

Las características mencionadas anteriormente hacen que los microsatélites sean uno de los marcadores más utilizados en análisis poblacionales. Estos permiten estudiar la demografía actual y patrones de conectividad entre poblaciones (Selkoe y Toonen, 2006), evaluar parentesco, determinar el sistema de apareamiento y estimar diversidad y estructura genética. En elasmobranquios, numerosas investigaciones se han basado en el empleo de estos marcadores como el estudio de la reconstrucción de genotipos parentales que reveló poliandria y filopatría en *Negaprion brevirostris* (Feldheim *et al.*, 2004) y los estudios de filogeografía realizados en *Carcharhinus leucas* (Karl *et al.*, 2011) y *Carcharhinus plumbeus* (Portnoy *et al.*, 2010).

Particularmente para *S. lewini*, estos marcadores han sido utilizados para análisis poblacionales a escala global y regional. Los primeros microsatélites específicos fueron diseñados por Nance *et al.* (2009) y puestos a prueba en poblaciones del Pacífico Este (Nance *et al.*, 2011), Australia (Ovenden *et al.*, 2011), el Pacífico colombiano (Quintanilla *et al.*, 2015), la Península Arábiga (Spaet *et al.*, 2015) y Papua Nueva Guinea (Green *et al.*, 2017). Además, fueron empleados en un estudio de filogeografía global de la especie (Daly-Engel *et al.*, 2012). La utilización de estos marcadores ha permitido responder preguntas de diversidad genética y estructura poblacional, parentesco y paternidad múltiple.

## Mitogenomas

El DNA mitocondrial (mtDNA) es un genoma circular localizado en las mitocondrias, las cuales están en el citoplasma de las células eucariotas. Este está formado por 37 genes que corresponden a dos subunidades de rRNA, 22 tRNA y 13 genes codificantes de proteínas que intervienen en el proceso de respiración. Entre estos fragmentos se encuentran espaciadores de corta longitud y la denominada Región Control o D-loop (Wolstenholme, 1992).

Este genoma es de herencia materna (aunque en determinados taxones se ha descrito heteroplasmia (Päckert *et al.*, 2019)) y se caracteriza por la ausencia de recombinación. Por lo tanto, generalmente los descendientes de una hembra comparten el mismo haplotipo. Estas características han hecho que este sea uno de los marcadores más populares para estudios filogeográficos y filogenéticos.

En los elasmobranquios, el mtDNA es considerado una molécula muy conservada en su estructura, con tasas de sustitución siete u ocho órdenes menores que la de los primates (Martin *et al.*, 1992). Sin embargo, no todas las regiones del mtDNA tienen la misma tasa de sustitución y por consiguiente la diversidad nucleotídica y la capacidad de detectar estructura genética puede variar mucho en dependencia del fragmento analizado. Si bien la Región Control es el marcador más utilizado debido a su elevada tasa de sustitución (Avice, 2004), se ha demostrado que otras regiones como NAD5 pueden ser más variables (Rosales, 2018; Feutry *et al.*, 2014).

Los avances en el campo de la genómica han permitido obtener el genoma mitocondrial completo de muchas especies, incluyendo tiburones. Particularmente, el mitogenoma de *S. lewini* informado hasta la fecha consta de 16 726 pares de bases (pb) con una composición de 31.4% A, 26.3% C, 13.2% G y 29.1 % T (Chen *et al.*, 2015).

## Mitogenomas en estudios poblacionales en elasmobranquios

Hasta la fecha, solo cuatro estudios han empleado genomas mitocondriales completos para análisis poblacionales en elasmobranquios. En todos ellos se pudieron detectar diferencias genéticas entre las áreas analizadas, las cuales fueron explicadas por filopatría. En tres de estos fueron evaluadas poblaciones de *Glyphis glyphis* (Feutry *et al.*, 2014; Feutry *et al.*, 2017) y *Pristis pristis* (Feutry *et al.*, 2015) de ríos de Australia. A pesar de que el área de muestreo y el tamaño de muestra analizado fueron similares para ambas especies, la diversidad genética fue muy superior en *P. pristis* (106 sitios polimórficos), mientras que en *G. glyphis* solo fueron detectados 19 sitios polimórficos. En el otro estudio fueron muestreados neonatos y juveniles de *S. lewini*

del Pacífico mexicano (Rosales, 2018). En total, se identificaron 115 sitios polimórficos y la señal de diferenciación genética más consistente fue la detectada entre la región norte (Sinaloa y Nayarit) y sur (Oaxaca y Chiapas).

### 1.3.3 Características del Golfo de México

El Golfo de México es un cuerpo de agua semi-cerrado que debido a la variación en la temperatura de la superficie marina en invierno, se divide en dos ecorregiones denominadas Golfo de México Norte y Golfo de México Sur (Figura 2). La primera se extiende desde la bahía de Gullivan, en la costa oeste de Florida, hasta el norte del río Pánuco, en el estado de Tamaulipas. Por su parte, el Golfo de México Sur abarca la parte tropical meridional del Golfo de México e incluye las aguas frente a los estados de Veracruz, Tabasco, Campeche y Yucatán, así como la parte profunda del talud frente a Florida y al abanico del Misisipi (Wilkinson *et al.*, 2009).

El Golfo de México Norte es una ecorregión semitropical y tropical, influenciada por corrientes tropicales en el verano (temperatura promedio entre 28-30°C) y temperaturas continentales durante el invierno (T promedio entre 14-24°C). La plataforma continental es amplia (hasta 250 kilómetros desde el litoral) y tiene una profundidad máxima de 200 m, seguida de un pronunciado talud continental que abarca el 40% de la región con profundidades que van de los 200 hasta los 3000 m (Wilkinson *et al.*, 2009).

La ecorregión del Golfo de México Sur presenta corrientes tropicales, donde la temperatura promedio oscila entre 24-25°C en invierno y 28-28.5°C en verano. La plataforma continental es amplia (24% de la región) con profundidades máximas de 200 m, mientras que el talud abarca el 33% de la región con profundidades que van de los 200 hasta los 3000 m (Wilkinson *et al.*, 2009).

Ambas ecorregiones se caracterizan por la presencia de deltas, lagunas costeras, estuarios y manglares. Debido a la gran escorrentía de agua dulce y sedimentos fluviales, la productividad es elevada y va de condiciones eutróficas en aguas costeras a oligotróficas en las profundidades del océano (Wilkinson *et al.*, 2009). Las grandes descargas de agua dulce de los ríos modifican las características físico-químicas costeras y las comunidades biológicas de la región. Sin embargo, en la porción oeste del Golfo Norte los aportes de agua dulce son muy limitados, lo que resulta en una región de agua clara y elevada salinidad (Wilkinson *et al.*, 2009).

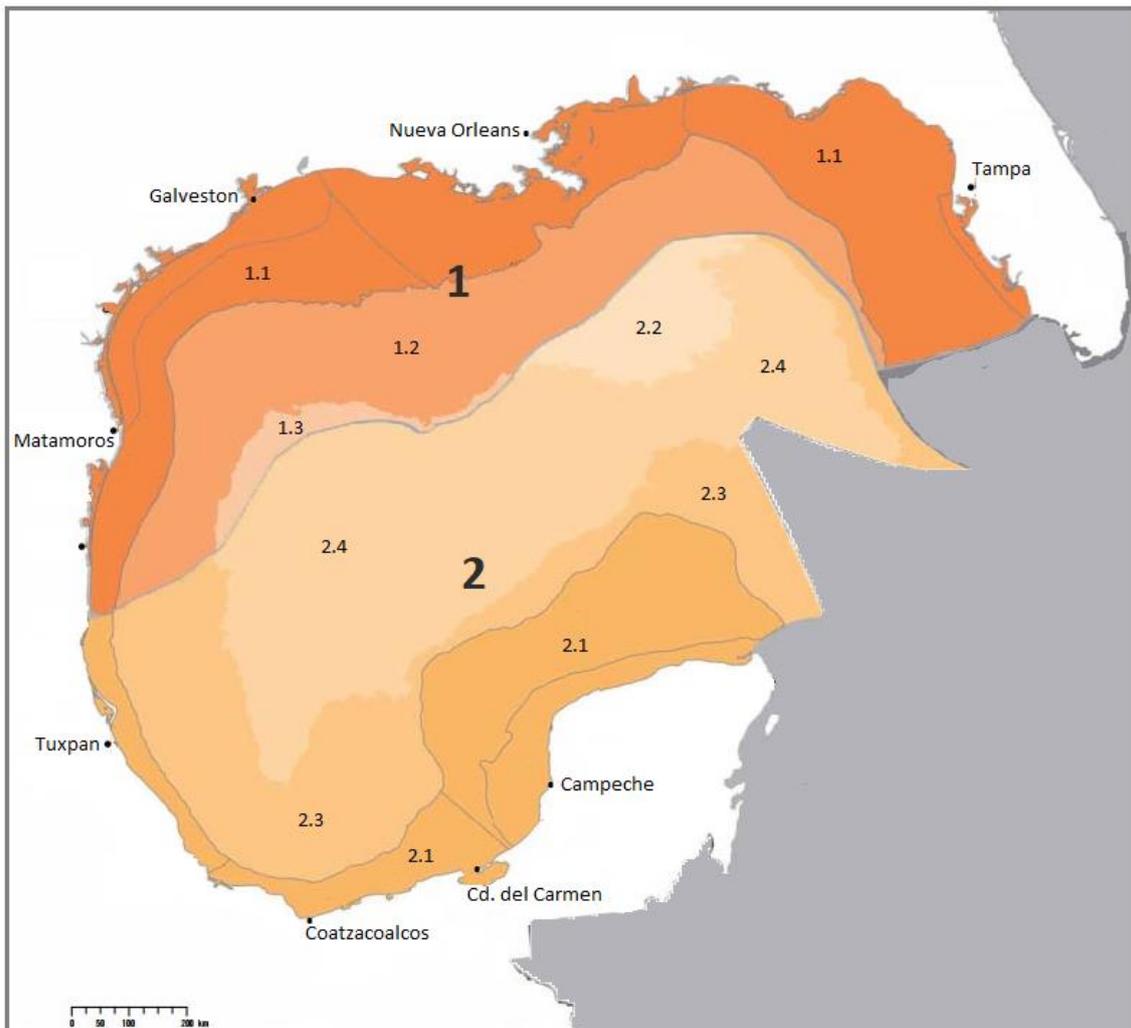


Figura 2. Ecorregiones del Golfo de México. (1) GM\_Norte, (2) GM\_Sur. Plataforma del norte (1.1), Talud del norte (1.2), Cuenca del Golfo (1.3), Plataforma del sur (2.1), Abanico del Misisipi (2.2), Talud del sur (2.3), Cuenca del Golfo de México (2.4). Modificado de Wilkinson *et al.* (2009).

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 COLECTA DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Las muestras consistieron en fragmentos de aleta o músculo de la región ventral de individuos neonatos y juveniles provenientes de pesquerías artesanales de tres de los estados mexicanos que conforman el Golfo de México (Tamaulipas, Tabasco y Campeche) (Figura 3). De los estados de Veracruz y Yucatán no se obtuvieron muestras debido a que en ninguna de las colectas realizadas en este sitio se reportó la captura de *S. lewini*. Estas pesquerías son realizadas por pequeñas embarcaciones, cercanas a la línea de costa (máximo 10 millas) y se caracterizan por emplear técnicas tradicionales y de bajo desarrollo tecnológico.

Todas las muestras de Tabasco procedieron del área de crianza San Pedro-Frontera (N=38), mientras que en Campeche fueron muestreadas tres localidades: Ciudad del Carmen (N=4), Champotón (N=1) y pequeñas islas de aguas abiertas del Golfo de México cercanas a Campeche (N=10). De Tamaulipas fueron muestreadas cuatro localidades: Matamoros (N=2), San Fernando (N=10), La Pesca (N=6) y Tampico (N=3) (Figura 3). La distancia mínima en línea recta entre los puntos muestreados en Tamaulipas y los de Tabasco es de aproximadamente 660 km (Tampico - San Pedro-Frontera). En total fueron colectadas 74 muestras las cuales fueron preservadas a temperatura ambiente en etanol o amortiguador dimetil sulfóxido (DMSO) saturado con NaCl. El periodo de colecta abarcó desde el año 2010 hasta marzo de 2019.

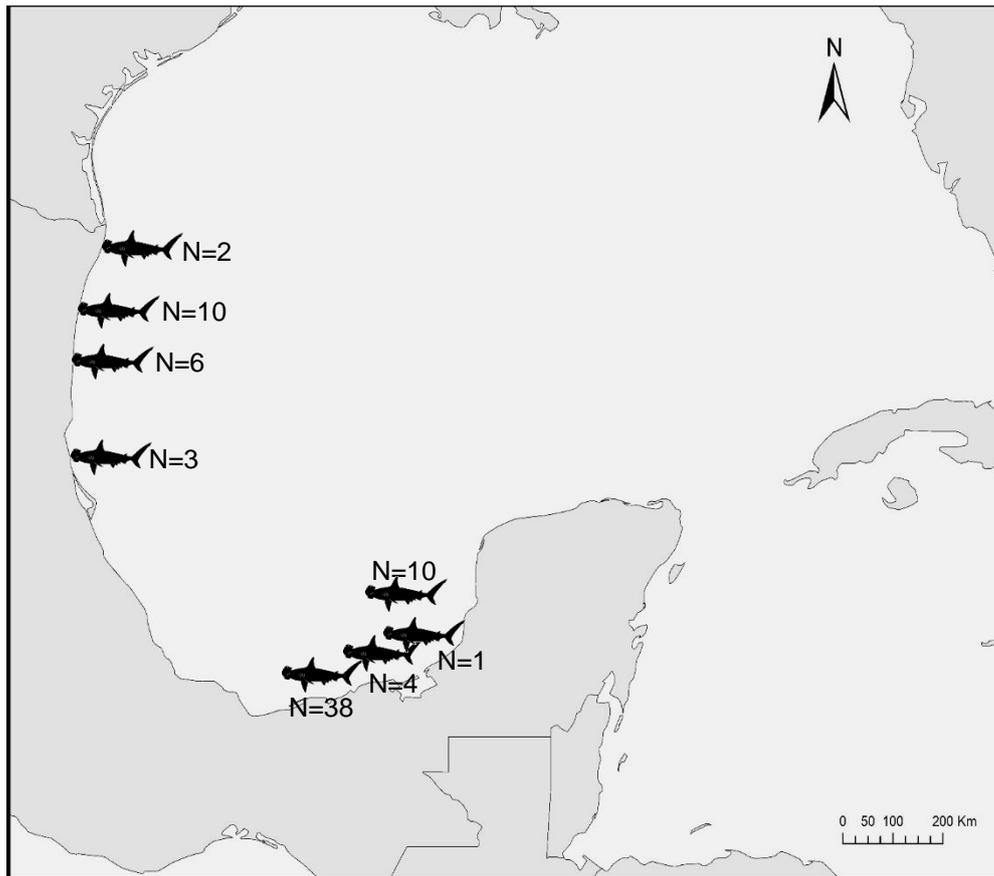


Figura 3. Total de muestras colectadas de neonatos y juveniles de *Sphyrna lewini* en el Golfo de México entre los años 2010 y 2019. Golfo de México-Campeche N=10, Champotón N=1 y Cd. del Carmen N=4 (2018). Tabasco N=38 (2010 y 2013). Tampico N=3, La Pesca N=6, San Fernando N=10 y Matamoros N=2 (2019). Total N=74.

## 2.2 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

### 2.2.1 Extracción de DNA

La extracción de DNA se llevó a cabo siguiendo el método tradicional de fenol-cloroformo (Sambrock *et al.*, 1989), con algunas modificaciones. El tejido fue digerido en una solución de buffer TE (Tris-EDTA, EDTA: ácido etilendiaminotetraacético), detergente SDS (dodecilsulfato sódico) al 10% para lisar las células y proteínasa K para la digestión de proteínas. La extracción se realizó a 37°C durante 24 horas o 56 °C durante seis horas. Posteriormente se realizaron lavados con el fin de eliminar restos de contaminantes orgánicos e inorgánicos. Estos se hicieron en tres pasos para lo cual se utilizó fenol, fenol cloroformo y cloroformo-alcohol isoamílico, respectivamente. Por último, la precipitación de DNA fue con etanol absoluto y el DNA fue rehidratado en 50 ul de buffer TE. Una vez obtenidos los extractos de DNA, se realizó la cuantificación con Nanodrop 2000TM de ThermoFisher SCIENTIFIC y la corrida en geles de agarosa al 1.5% para verificar la cantidad y calidad del DNA.

### 2.2.2 Amplificación de *loci* microsatélites

Se realizó la amplificación de nueve *loci* microsatélites específicos: SLE013, SLE025, SLE027, SLE028, SLE033, SLE038, SLE054, SLE086 y SLE089 (Tabla I) descritos por Nance *et al.* (2009). Estos fueron seleccionados debido a que presentaron los mayores grados de polimorfismo en las poblaciones del Pacífico Este, donde fueron descritos. Para la amplificación se utilizó el kit TYPE IT Multiplex-MICROSATELLITE KIT de QIAGEN y los *primers* sintetizados por APPLIED BIOSYSTEMS. La mezcla de PCR se preparó para un volumen final de 5  $\mu$ l: 1.5  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O libre de RNA, 2.5  $\mu$ l de Type-it Multiplex PCR Master Mix, 2x (HotStarTaq plus DNA polimerase, Type-it Microsatellite PCR Buffer con 6 mM MgCl<sub>2</sub> y dNTP's), 0.4  $\mu$ M del *primer reverse* (100 pmol) y 0.4  $\mu$ M del *primer forward* (10 pmol) marcado con un fluoróforo. Esto permitió realizar en una misma reacción la amplificación de varios microsatélites siempre y cuando estos estuvieran marcados con fluoróforos diferentes o no coincidieran en su distribución de tamaños alélicos. Las amplificaciones se llevaron a cabo en dos grupos definidos a continuación:

Grupo I: SLE027, SLE028, SLE038, SLE054

Grupo II: SLE013, SLE025, SLE033, SLE086, SLE089

El programa de amplificación consistió en (i) una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, (ii) 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, hibridación a 60°C por 1:50 minutos y extensión a 72°C por 30 segundos y (iii) un período de extensión final a 60°C por 30 minutos. El genotipado del producto de PCR se realizó en el Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y la Salud del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Tabla I. *Loci* microsatélites empleados: SLE013, SLE025, SLE027, SLE028, SLE033, SLE038, SLE054, SLE086 y SLE089 descritos por Nance *et al.* (2009) en *Sphyrna lewini*.

<i>Locus</i>	Secuencia <i>primer</i> (5' - 3')	T hibridación (°C)
SLE013	F: ATGTTTATGACCATACGTGCG	60
	R: TTGATTGGCATT CAGTGACC	
SLE025	F: CTCAGGCTAGTTGCACAGAAA	57
	R: TCAACTCCCCACAATCCCAT	
SLE027	F: GAGACCAGCCAAAGGAAAAA	60
	R: ATGCCATATTCATCCAGGCAC	
SLE028	F: TTTGGAGACATTGCAGAAAG	55
	R: CACTTGGGACTACACACTG	
SLE033	F: TTGGTCAATGTCCTCTTGCA	57
	R: CCCATGCTGTTTTGTTCTTTG	

SLE038	F: AGCCTACTTCTGCCACATTTT	60
	R: AATCAAAGTTCCTGCAGTCCT	
SL054	F: CTGACACTGCCAATTTGCAT	60
	R: CCAACTGGAGTTGTCAATCCA	
SLE086	F: TACAGACAGATTTTCAGTGTGT	60
	R: ACGAATACGCATTCATACAC	
SLE089	F: TTACCACAGTTTGTGTGGGTG	60
	R: AAGTTTCAGTGTTCAGTGTGC	

### 2.2.3 Sonicación y limpieza de las muestras

Para la preparación de las librerías genómicas se realizó una dilución del extracto de DNA en buffer TE en una proporción 1:1. Luego se llevó a cabo la fragmentación por sonicación con el empleo de Bioruptor pico® de Diagenode y Minichiller® de Huber para el enfriamiento del agua, ambos equipos localizados en el Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y la Salud del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Cada ciclo constó de 30 segundos con sonicación y 30 segundos en ausencia de señal. El número de ciclos por muestra varió en función del estado de preservación del DNA. El rango estuvo entre los 10 ciclos (para DNAs íntegros) y tres ciclos (para DNAs muy degradados). El producto de sonicación se visualizó en un gel de agarosa al 1.5% y solo fueron seleccionadas las muestras que presentaron un barrido alrededor de los 150 a 300 pb.

Posteriormente se realizó la limpieza de las muestras con el empleo de perlas magnéticas, etanol y buffer TE para rehidratar el DNA. Durante este proceso se eliminó el DNA de bajo peso molecular, así como restos de proteínas y RNA. De esta forma las muestras estuvieron listas para comenzar a preparar las bibliotecas genómicas.

### 2.2.4 Preparación de bibliotecas genómicas y secuenciación

Las bibliotecas genómicas fueron preparadas empleando el *kit* KAPA HyperPrep v3.15 de KAPA BIOSYSTEMS con algunas modificaciones en los volúmenes de reacción. El protocolo consta de 5 etapas:

- (1) *Reparación final y cola de Adeninas*: son fosforilados los extremos 5' mientras que en el extremo 3' se incorpora una cola de Adeninas.
- (2) *Ligación*: se unen a la cola poliA los adaptadores universales complementarios a la plataforma de Illumina. En este punto, a cada muestra se le incorporan combinaciones únicas de adaptadores que permiten reconocer a que individuos pertenece cada secuencia.

(3) *Limpieza post-ligación*: elimina los dímeros de adaptadores así como los adaptadores sobrantes.

(4) *Amplificación por PCR*: El programa de PCR consistió en (i) desnaturalización inicial a 98°C por 45 segundos, (ii) 15 ciclos de desnaturalización a 98°C por 15 segundos, hibridación a 60°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos y (iii) extensión final a 72°C por 60 segundos.

(5) *Selección de tamaño*: son seleccionados los fragmentos con longitudes de 150 a 300 pares de bases.

El producto de las bibliotecas fue visualizado en geles de agarosa al 1.5% para comprobar que los fragmentos de DNA estaban en el rango de tamaño deseado (150-300 pb). Luego se realizó la cuantificación empleando el fluorómetro Qubit™ 3 de Invitrogen, que utiliza colorantes fluorescentes específicos para las moléculas objetivo, evitando la sobrestimación de la lectura de DNA. Finalmente, todas las muestras fueron llevadas a una concentración total de 30 ng e incorporadas a un *pool* que fue enviado a secuenciar en la plataforma Illumina HiSeq 4000, en la Universidad de Georgia, Estados Unidos.

### 2.3 PROCESAMIENTO DE DATOS

Una vez obtenidos los electroferogramas de los microsatélites, estos fueron analizados con el programa GENEMAPPER 5.0 (Applied Biosystems™) para realizar la identificación de los picos correspondientes a las tallas alélicas y posteriormente la determinación de los genotipos. La presencia de alelos nulos se evaluó con el software MICROCHECKER (van Oosterhout *et al.*, 2004). Además se determinó la probabilidad de existencia de asociaciones entre los diferentes *loci* mayores que las esperadas si ocurrieran al azar (equilibrio de ligamiento), para lo cual se empleó el programa GenePop v4.1.0 (Rousset, 2008). El cálculo se realizó con 10 000 permutaciones, 100 grupos y 10 000 iteraciones por grupo. Se asumió la existencia de desequilibrio de ligamiento cuando el valor de probabilidad fuera mayor a 0.05. Para conocer si la población se encontraba en equilibrio genético se calculó la probabilidad de no diferencia entre la heterocigosidad esperada y observada mediante el programa GenePop v4.1.0 (Rousset, 2008) con el método de cadenas de Markov y los siguientes parámetros: 10 000 permutaciones y 100 grupos y 10 000 iteraciones por grupo. Las desviaciones del equilibrio fueron estimadas mediante el cálculo del estadístico  $F_{is}$  según Weir y Cockerham (1984), acorde a la fórmula  $F_{is}=1-(H_o/H_e)$ .

Para el DNA mitocondrial, una vez obtenidas las lecturas, se realizó el mapeo de estas con respecto a un genoma de referencia informado para la especie (Número de referencia en NCBI:

NC\_022679) con el empleo del programa Geneious v9.1.8 (Kearse *et al.*, 2012). En este paso fueron removidos los adaptadores (“trimming”) de los extremos 5` (7pb) y 3` (3pb). Una mutación fue considerada como verdadera (y no error de secuenciación) cuando presentó al menos una profundidad de 4X. Una vez verificados todos los sitios variables, se generó una secuencia consenso para cada muestra. Posteriormente se realizó el alineamiento de todas las secuencias obtenidas empleando la opción MUSCLE de Geneious y se generó una secuencia consenso la cual fue anotada en el sitio web MITOS (Bernt *et al.*, 2013).

Por otra parte, se realizaron pruebas de parentesco con el fin de evitar el uso de réplicas y con esto eliminar el sesgo de muestreo familiar (Anderson y Dunham, 2008). Para ello se utilizaron los nueve microsatélites y los individuos fueron agrupados por región y año de colecta. Estas pruebas se hicieron en el programa COLONY (Jones y Wang, 2010) con las siguientes condiciones: Sistema de apareamiento I: polígamo, Sistema de apareamiento II: con endogamia, Especie: Dioica y Diploide, Longitud de la corrida: Larga, Método de análisis: Máxima verosimilitud, Precisión: Alta (Feutry *et al.*, 2017). Solo los pares de hermanos completos (HC) o medio hermanos (MH) que presentaron una probabilidad por encima de 0.95, fueron considerados como relaciones verdaderas.

En la estimación de diversidad y estructura genética mitocondrial, cuando los dos miembros de una pareja presentaron la misma secuencia (hermanos por parte de madre), uno de ellos fue eliminado de los análisis (conformando así el conjunto que de ahora en adelante será denominado NoRelMitos). Para los microsatélites, un conjunto similar fue creado mediante la eliminación de uno de los miembros de cada pareja (NoRelMicros). Si un individuo perteneció a más de una pareja, este fue el descartado para así maximizar la cantidad de muestras.

### 2.3.1 Estimación de diversidad genética nuclear y mitocondrial

Para los microsatélites, se consideró polimórfico el *locus* que presentara al menos dos alelos y la frecuencia del alelo más común no excediera el 95% (Graur y Li, 2000). Con GENALEX v6.5 (Peakall y Smouse, 2012) fueron calculados varios índices de diversidad como: número de alelos (Na), frecuencia alélica, número de alelos efectivos (Ne), alelos raros (Nr), alelos privados y heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He). Con el programa FSTAT (Goudet, 2001), se determinó la riqueza alélica (Rs) que es un índice diversidad genética y expresa una proporción de alelos por *locus* que no depende del tamaño de la muestra.

Para los mitogenomas, utilizando el programa DNAsp v5.2 (Librado y Rozas, 2009) se determinaron los siguientes estimadores de diversidad genética: número de sitios polimórficos (S), número de haplotipos (h), diversidad haplotípica (Hd) y diversidad nucleotídica ( $\pi$ ). Los análisis se hicieron considerando el mitogenoma completo, la porción codificante de proteínas y cada uno de los genes por separado. De esta forma fueron identificadas las regiones más variables.

### 2.3.2 Análisis de diferenciación genética

Con base en las ecorregiones definidas en el Golfo de México (Wilkinson *et al.*, 2009), el área de crianza descrita para *S. lewini* en Tabasco, los reportes de abundancia de neonatos y juveniles en Tamaulipas y los reportes de poca abundancia de neonatos y juveniles en Veracruz, las muestras fueron separadas en dos grupos: Golfo de México Sur (San Pedro-Frontera, Cd. del Carmen, Champotón y GM\_Campeche) y Golfo de México Norte (Matamoros, San Fernando, La Pesca y Tampico) y. Los análisis de diferenciación genética se realizaron con todos los individuos y con los conjuntos NoRelMicros y NoRelMitos.

Para los *loci* microsatélites, el número de posibles grupos genéticamente diferenciados (K) fue evaluado con el programa Structure 2.3 (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2007), donde se asigna cada individuo a una población con un determinado valor de probabilidad sin asumir *a priori* que pertenecen a alguna. Se partió de un fichero de referencia que contenía los genotipos obtenidos, excluyendo a un *locus* de las parejas de *loci* ligados (fueron excluidos SLE013 y SLE086). Este programa se basa en un modelo de agrupamiento, para lo cual emplea los datos genotípicos de diferentes *loci* no relacionados, para inferir la estructura de la población. El programa se corrió bajo las siguientes condiciones: 500 000 iteraciones para el período de *burn-in* y 1 000 000 repeticiones de cadenas de Markov y Montecarlo (MCMC). Se evaluaron de uno a tres valores de K, con 20 iteraciones para cada uno. Para la determinación del número más probable de poblaciones (K) se graficó el logaritmo natural del valor de verosimilitud, obtenido a partir de cada corrida, contra el número de K. Se seleccionó el número de K con el mayor valor de verosimilitud y la menor varianza (Llanes-Quevedo *et al.*, 2018). El grado de diferenciación genética entre las localidades fue estimado mediante el cálculo del estadístico  $F_{ST}$  y su probabilidad asociada, con 10000 permutaciones en el programa Arlequín 3.5.1.2 (Excoffier y Lischer, 2010).

Para los mitogenomas, primeramente fue estimado el nivel de divergencia genética mediante el cálculo del estadístico  $F_{ST}$  pareado basado en frecuencias haplotípicas ( $F_{ST}$ ) y en distancias

genéticas ( $\Phi_{ST}$ ), con el programa Arlequin (Excoffier y Lischer, 2010). Estos análisis se hicieron con el mitogenoma completo y con cada uno de los genes que presentaron al menos un sitio informativo. De esta forma fue identificada la región que mostró señal de divergencia genética. La red de haplotipos fue construida en Network v.10 (Bandelt *et al.*, 1999) el cual utiliza un algoritmo de *Median Joining*, siendo este el mejor enfoque para análisis de poblaciones geográficamente cercanas. Esta se hizo con los datos del conjunto NoRelMitos.

### 3. RESULTADOS

De las 74 muestras colectadas, se logró la amplificación exitosa de nueve *loci* microsatélites en 70 individuos y se obtuvieron 73 mitogenomas. En las pruebas de parentesco no se detectó la presencia de hermanos completos, pero si 35 parejas de medio hermanos. Tres de estas parejas presentaron los dos miembros con la misma secuencia de mtDNA (hermanos por parte de madre). Por lo tanto, el conjunto NoRelMicros estuvo formado por 53 individuos (GM\_Sur=36; GM\_Norte=17) y el conjunto NoRelMitos por 70 individuos (GM\_Sur=49; GM\_Norte=21).

Todos los *loci* microsatélites se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg, con valores de  $F_{is}$  no significativos (tanto al evaluar de manera independiente al Golfo de México Sur y Norte, como al evaluarlo todo como una única población) (Tabla II). De igual forma, todos estuvieron en desequilibrio de ligamiento, excepto SLE013-SLE027 ( $p=0.02$ ), SLE013-SLE033 ( $p=0.02$ ) y SLE038-SLE086 ( $p=0.03$ ). Uno de los miembros de cada pareja (SLE013 y SLE086) fue eliminado para los análisis de estructura. Luego de realizar la corrección de Bonferroni, solo se detectó la posible presencia de alelos nulos en el *locus* SLE025 ( $p < 0.025$ ).

Por su parte, el mitogenoma estuvo formado por 16 723 pares de bases con una inserción de 10 pb en el tRNA-Cys de 13 individuos. La presencia o ausencia de esta inserción no influyó en los valores de diversidad obtenidos y tampoco en la señal de divergencia detectada. El contenido de GC fue de 39.4% y AT 60.6%. El mitogenoma fue anotado (Figura 4) para posteriormente identificar los genes más variables.



SLE025	9	5.8	9.0	0.69	0.83	0.18 <sup>NS</sup>
SLE027	5	2.1	4.9	0.5	0.54	0.07 <sup>NS</sup>
SLE028	9	4.4	8.4	0.83	0.77	-0.07 <sup>NS</sup>
SLE033	4	1.3	3.9	0.21	0.25	0.05 <sup>NS</sup>
SLE038	6	2.7	5.8	0.56	0.63	0.12 <sup>NS</sup>
SLE054	3	1	2.8	0.04	0.04	-0.01 <sup>NS</sup>
SLE086	2	1.9	2	0.48	0.47	-0.01 <sup>NS</sup>
SLE089	11	5.3	10.8	0.82	0.81	-0.01 <sup>NS</sup>
promedio	7	3.3	6.8	0.55	0.57	-

<sup>NS</sup>Valor de  $p > 0.05$

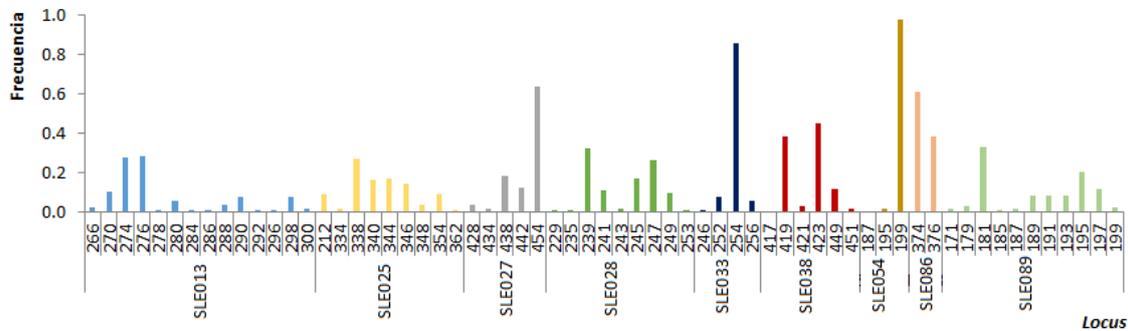


Figura 5. Distribución de las frecuencias alélicas para los *loci* microsatélites SLE013, SLE025, SLE027, SLE028, SLE033, SLE038, SLE054, SLE086 y SLE089 en neonatos y juveniles de *Sphyrna lewini* en el Golfo de México.

En el mitogenoma se encontraron 80 sitios polimórficos (S), de los cuales 25 fueron sitios variables únicos. Se detectaron 38 haplotipos que resultó en una diversidad haplotípica alta ( $H_d=0.96$ ), mientras que la diversidad nucleotídica fue notablemente baja ( $\pi=0.0005$ ) (Tabla III).

Al analizar de manera independiente los 13 genes codificantes de proteínas y D-loop, esta última región resultó ser la más diversa con el mayor número de sitios polimórficos y haplotipos ( $S=15$ ;  $h=14$ ) y los valores máximos de diversidad haplotípica ( $H_d=0.83$ ) y nucleotídica ( $\pi=0.0035$ ). Por el contrario, el gen menos diverso fue ATP8 (Tabla III).

Tabla III. Caracterización del mitogenoma, porción codificantes de proteínas y Región Control de individuos neonatos y juveniles de *Sphyrna lewini* en el Golfo de México. Número de sitios polimórficos (S), número de haplotipos (h), diversidad haplotípica (Hd) y diversidad nucleotídica ( $\pi$ ).

	Longitud (pb)	S	Sitios variables únicos	Sitios informativos	h	Hd	$\pi$
Mitogenoma completo	16723-33	80	25	55	38	0.96	0.0005
Porción codificante proteínas	11299	39	13	26	26	0.93	0.0004
NAD1	954	6	2	4	6	0.26	0.0004
NAD2	1041	7	3	4	8	0.40	0.0005
COX1	1533	3	0	3	4	0.35	0.0002
COX2	684	1	0	1	2	0.32	0.0005
ATP8	162	0	0	0	1	0	0
ATP6	677	2	2	0	3	0.06	0.0001
COX3	783	1	0	1	2	0.11	0.0001
NAD3	348	1	1	0	2	0.03	0.0001
NAD4I	294	2	0	2	3	0.53	0.002
NAD4	1370	6	1	5	6	0.35	0.0005
NAD5	1812	6	3	3	7	0.44	0.0003
CytB	1128	3	0	3	4	0.43	0.0004
NAD6	513	1	1	0	2	0.03	0.0001
Región Control	1095	15	2	13	14	0.83	0.0035

Cuando se realizaron los análisis por regiones geográficas, todos los índices de diversidad genética calculados para los marcadores nucleares y mitocondriales fueron superiores en el Golfo de México Sur, excepto la diversidad haplotípica y los sitios variables únicos que fueron mayores en el Golfo de México Norte, mientras que la diversidad nucleotídica fue igual en ambas regiones (Figura 6 y 7).

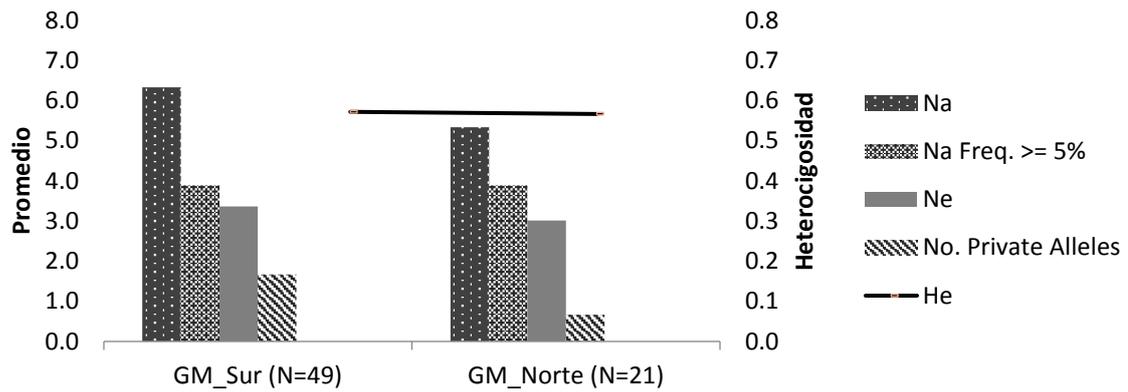


Figura 6. Comparación de los valores promedio de diversidad genética nuclear de *Sphyrna lewini* entre Golfo de México Sur y Golfo de México Norte, basados en el análisis de nueve *loci* microsatélites. Tamaño de muestra (N), número de alelos (Na), número de alelos efectivos (Ne), heterocigosidad esperada (He).

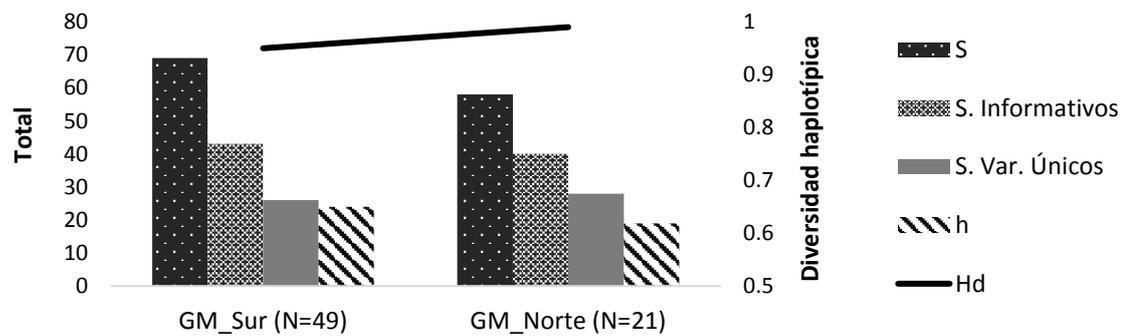


Figura 7. Comparación de los índices de diversidad genética del mitogenoma de individuos de *Sphyrna lewini* entre el Golfo de México Sur y Golfo de México Norte. Tamaño de muestra (N), número de sitios polimórficos (S), número de haplotipos (h), diversidad haplotípica (Hd) y diversidad nucleotídica ( $\pi$ ).

### 3.2 EVALUACIÓN DE ESTRUCTURA GENÉTICA

Para los microsatélites, el análisis de agrupamiento realizado con Structure mostró que todos los individuos presentaron alrededor de un 50% de probabilidad de pertenecer a cada uno de los grupos asignados (Golfo de México Sur o Golfo de México Norte) (Figura 8), siendo K=1 el número de grupos más probable. Por su parte, el valor de  $F_{ST}$  fue bajo y no significativo al analizar a todos los individuos ( $F_{ST}=-0.008$ ,  $p=0.86$ ), así como al evaluar al conjunto NoRelMicros ( $F_{ST}=-0.01$ ,  $p=0.74$ ).

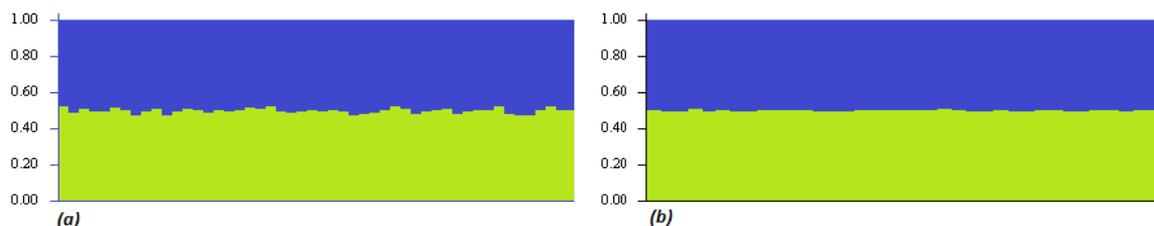


Figura 8. Probabilidad de pertenencia de los individuos de *Sphyrna lewini* a cada grupo definido, inferida con datos de 7 loci microsatélites en Structure. Golfo de México Sur (verde) y Golfo de México Norte (azul). (a) total de individuos; (b) conjunto NoRelMicros.

Para el mitogenoma completo considerando a todos los individuos y al conjunto NoRelMitos, los valores de  $F_{ST}$  y  $\Phi_{ST}$  en ambos casos fueron bajos y no significativos (Tabla IV). Al evaluar de manera independiente a los genes que presentaron al menos un sitio informativo (D-loop, NAD4L, NAD4, COX1, CytB, COX2, NAD5, NAD1 y COX3), solo hubo señal de diferenciación significativa con D-loop (Tabla V). Con esta región fue construida la red de haplotipos, para un total de 14 haplotipos de los cuales seis fueron compartidos por ambas regiones, cinco exclusivos del Golfo de México Sur y tres del Golfo de México Norte (Figura 9). El haplotipo 1 fue el más común (N=26) y estuvo representado en su mayoría por individuos del Golfo de México Sur.

Tabla IV. Valores de  $F_{ST}$  y  $\Phi_{ST}$  pareados basados en el mitogenoma de todos los individuos neonatos y juveniles de *Sphyrna lewini* (encima; Golfo de México Sur N=52, Golfo de México Norte N=21) y el conjunto NoRelMitos (debajo; Golfo de México Sur N=49, Golfo de México Norte N=21).

	Golfo de México Sur		Golfo de México Norte	
Golfo de México Sur			$F_{ST}=0.007^{NS}$	$\Phi_{ST}=0.04^{NS}$
Golfo de México Norte	$F_{ST}=0.004^{NS}$	$\Phi_{ST}=0.03^{NS}$		

<sup>NS</sup>Valor de  $p > 0.05$

Tabla V. Valores de  $F_{ST}$  y  $\Phi_{ST}$  para cada uno de los genes que presentaron al menos un sitio informativo en el mitogenoma de *Sphyrna lewini* del Golfo de México. Los valores fueron calculados con el conjunto NoRelMitos.

	$F_{ST}$	$\Phi_{ST}$
<b>D-loop</b>	0.06*	0.06*
NAD4L	0.09	0.07
NAD4	0.04	0.05
COX1	0.03	0.05
NAD2	0.02	0.03

CytB	0.03	0.03
COX2	0.012	0.012
NAD5	-0.002	0.006
NAD1	-0.01	0.006
COX3	-0.03	-0.03

\*Valor de  $p < 0.05$

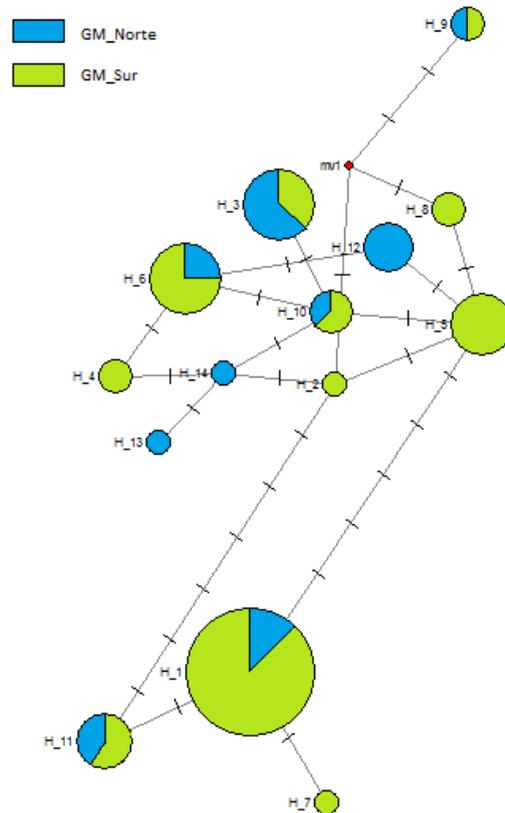


Figura 9. Red de haplotipos obtenida mediante un algoritmo de *Median Joining* a partir del análisis de la Región Control del mitogenoma de *Sphyrna lewini* en el Golfo de México. Para su construcción fueron empleados los datos del conjunto NoRelMitos. El tamaño del círculo es proporcional al número de individuos que presentaron ese haplotipo.

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1 DIVERSIDAD GENÉTICA NUCLEAR Y MITOCONDRIAL

Los valores promedio de diversidad genética en términos de número de alelos, y heterocigosidad observada y esperada estimados para los *loci* microsatélites, fueron inferiores a los reportados para la especie en trabajos previos (Nance *et al.*, 2011; Quintanilla *et al.*, 2015; Spaet *et al.*, 2015) donde utilizan al menos ocho de los nueve *loci* analizados en este estudio (Tabla VI, Figura 10). En el presente trabajo detectamos que el *locus* con mayor número de alelos fue SLE013 (14 alelos), a diferencia de lo encontrado en poblaciones del Pacífico Este (Quintanilla *et al.*, 2015 y Nance *et al.*, 2011) y la Península Arábiga (Spaet *et al.*, 2015) donde el marcador más variable fue SLE025 con 19, 30 y 34 alelos, respectivamente. Justamente, en el *locus* SLE025 fue el único donde se detectó la posible presencia de alelos nulos, lo cual podría explicar el bajo número de alelos encontrados en este trabajo.

Por otra parte, la heterocigosidad promedio obtenida fue inferior a la registrada para individuos de las costas estadounidenses del Golfo de México (Daly-Engel *et al.*, (2012). Dado que los machos tienen una dispersión aleatoria (Daly-Engel *et al.*, 2012), esperaríamos que los niveles de diversidad nuclear en el Golfo de México fueran similares. Nosotros descartamos que la menor diversidad encontrada se deba al tamaño de muestra dado que fueron evaluados 70 individuos, mientras que Daly-Engel *et al.* (2012) analizaron 43 individuos. Tampoco corresponde a variaciones temporales causadas por el periodo de muestreo ya que al hacer la comparación solo con las muestras colectadas en el 2010 y 2013, los valores obtenidos ( $H_o=0.55$ ,  $H_e=0.57$ ) siguieron siendo inferiores. Por lo tanto, en este caso podría estar influyendo el número de marcadores así como la cantidad de variación de cada uno. En el presente estudio fueron analizados nueve *loci* microsatélites específicos, mientras que Daly-Engel *et al.* (2012) emplearon 13 microsatélites específicos e inespecíficos y en muchos casos estos últimos presentaron un mayor número de alelos. Solo cinco microsatélites fueron compartidos por ambos trabajos, por lo que se dificulta la comparación de valores promedio debido a que no todos los marcadores presentan el mismo grado de variación y por tanto no contribuyen igual a la heterocigosidad.

Finalmente, el número de alelos efectivos en la mayoría de los *loci* fue inferior a la mitad del número total de alelos, lo cual indica que aproximadamente el 50% de los alelos de cada *locus* son los que más están contribuyendo a la heterocigosidad. La riqueza alélica en todos los casos fue muy similar al total de alelos, lo que sugiere que el tamaño de muestra fue adecuado.

Tabla VI. Comparación del tamaño de muestra (N), número de *loci* y número de alelos (Na) obtenidos en el presente estudio con los trabajos previos realizados en *S. lewini* en donde emplean al menos 8 de los 9 *loci* microsatélites analizados. MX: Pacífico mexicano; CR: Costa Rica; PAN: Panamá; ECU: Ecuador; OAB: Cuencas árabes.

Autor y Localidad	N	N° <i>loci</i>	Na
Nance <i>et al.</i> (2011) (MX,CR,PAN, ECU)	221	15	-
Quintanilla <i>et al.</i> (2015) (Colombia)	111	15	8.35
Spaet <i>et al.</i> (2015) (OAB)	151	9	16.33
Spaet <i>et al.</i> (2015) (Mar Rojo)	82	9	14.1
Presente estudio (Golfo de México)	70	9	7

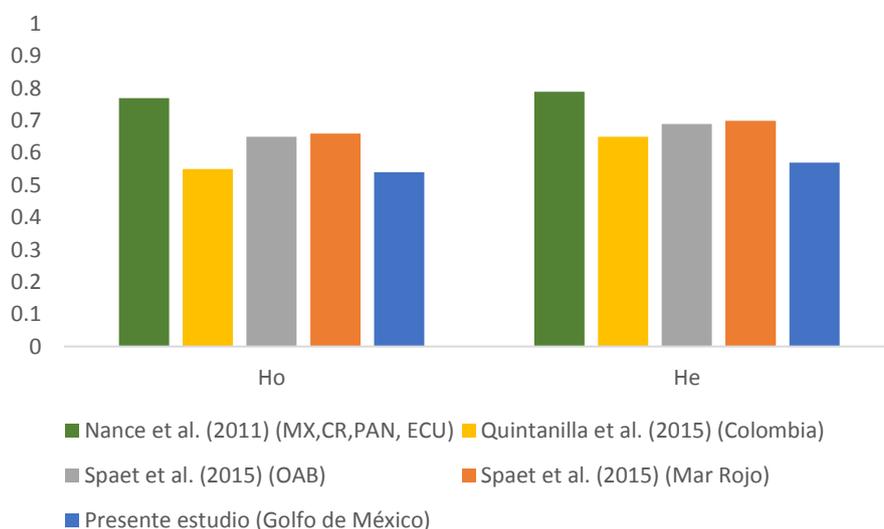


Figura 10. Comparación de los valores promedio de heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He) obtenidos en el presente estudio y los informados previamente para *S. lewini* empleando al menos 8 de los 9 *loci* microsatélites analizados. MX: Pacífico mexicano; CR: Costa Rica; PAN: Panamá; ECU: Ecuador; OAB: Cuencas árabes.

En relación al genoma mitocondrial de *S. lewini*, para las comparaciones con los mitogenomas informados previamente en la especie no se tuvo en cuenta la inserción de 10 pb en el tRNA-Cys ya que se trata del primer reporte y se requiere su confirmación mediante estudios adicionales. El mitogenoma de *S. lewini* en el Golfo de México resultó ser el más pequeño informado para la especie (16 723 pb) y tiene el típico orden de genes característico de los vertebrados (Chen *et al.*, 2015). Los otros dos reportes, ambos con una longitud de 16 726 pb pertenecen a un individuo capturado en los mares de China (Chen *et al.*, 2015) y a organismos juveniles del

Pacífico mexicano (Rosales, 2018). El contenido de GC y AT fue muy similar al informado por Chen *et al.* (2015).

En términos generales, la diversidad genética informada para los mitogenomas de condriictios (Feutry *et al.*, (2014 y 2015), Rosales, 2018; presente estudio) es inferior a la registrada para peces óseos (e.g. atún aleta atún aleta amarilla *Thunnus albacares* (Castro, 2018) y *Gadus morhua* (Carr y Marshall, 2008)) (Tabla VII). Esto probablemente se deba a la baja tasa de sustitución que caracteriza al mitogenoma de los elasmobranquios (Martin *et al.*, 1992), lo cual se refleja en bajos índices de diversidad.

El número de sitios polimórficos fue inferior al reportado para la misma especie en el Pacífico mexicano (Rosales, 2018) y para *Pristis pristis* en Australia (Feutry *et al.*, 2015), pero muy superior al informado para *Glyphis glyphis* (Feutry *et al.*, 2014) (Tabla VII). Estas son las únicas tres especies de condriictios donde han empleado mitogenomas para análisis poblacionales, de ahí la dificultad de realizar una comparación de índices de diversidad dentro del grupo. No obstante, hay que reconocer que en estos valores pueden estar influyendo muchos factores como la historia evolutiva de cada población, el tamaño del área de estudio y la existencia de barreras al flujo genético.

Tabla VII. Comparación de los índices de diversidad para el genoma mitocondrial obtenidos en el presente estudio y los previamente informados en condriictios y peces óseos. Número de sitios polimórficos (S), Proporción de S (Pn), Número de haplotipos (h), Diversidad haplotípica (Hd) y Diversidad nucleotídica ( $\pi$ ).

	N	Longitud (pb)	S	h	Hd	$\pi$
<i>Thunnus albacares</i> (Castro, 2018)	82	16 537	581	82	1	0.002
<i>Gadus morhua</i> (Carr y Marshall, 2008)	32	15,655	298	-	1	-
<i>Glyphis glyphis</i> (Feutry <i>et al.</i> , 2014)	93	16 701	19	12	0.76	0.0001
<i>Pristis pristis</i> (Feutry <i>et al.</i> , 2015)	92	16 912	106	22	0.92	0.0011
<i>S. lewini</i> (Rosales, 2018)	198	16 726	115	73	0.93	0.0002
<i>S. lewini</i> (Presente estudio)	73	16 723-33	80	38	0.96	0.0005

El fragmento más variable fue la Región Control, lo cual difiere de lo reportado por Rosales (2018) y Feutry *et al.* (2014) donde la mayor variación se encontró en ND5 con 15 y 5 sitios polimórficos, respectivamente. El número de haplotipos obtenidos fue un valor intermedio a lo reportado para *S. lewini* en el Pacífico mexicano y para *G. glyphis* en Australia. Estas diferencias en cuanto número de sitios polimórficos y número de haplotipos entre las poblaciones del

Pacífico mexicano (N=198) y las del Golfo de México (N=73) podrían ser debidas al desigual tamaño de muestra. Mientras más individuos son analizados, mayor es la probabilidad de encontrar nuevos sitios polimórficos y por consiguiente nuevos haplotipos.

La diversidad nucleotídica fue muy baja, consistente con lo esperado dada la baja tasa de sustitución del mitogenoma de los elasmobranquios (Martin *et al.*, 1992) y la longitud del marcador utilizado (16 723 pb) (el 99.5 % del mitogenoma fueron sitios invariables). Por su parte, la diversidad haplotípica fue alta ( $Hd=0.96$ ) y ligeramente superior a la reportada para el Pacífico mexicano ( $Hd=0.93$ ), a pesar de que el área geográfica analizada en el Pacífico es mucho mayor. Este índice de diversidad puede verse afectado por el muestreo de individuos emparentados. A mayor tamaño de muestra, aumenta la probabilidad de encontrar nuevos haplotipos y con esto, aumentar la diversidad. Sin embargo, si se muestrean individuos cercanamente relacionados, a pesar de que aumente el tamaño de muestra, va a disminuir la diversidad haplotípica, a medida que aumenta la frecuencia en la que aparecen los mismos haplotipos. En el presente trabajo para este cálculo fueron eliminados los individuos cercanamente relacionados que presentaron la misma secuencia de bases, pero no fue así para los análisis del Pacífico mexicano. Por lo tanto, no podemos asegurar que la diversidad haplotípica del mitogenoma de la especie en el Pacífico es menor ya que esto puede ser resultado de problemas de muestreo.

Por otra parte, al evaluar de manera independiente a cada fragmento del mitogenoma, la Región Control presentó la mayor diversidad. Esto se debe a que no todas las regiones del mtDNA tienen la misma tasa de sustitución, incluso existen porciones codificantes de proteínas que se mantienen muy conservadas, a diferencia de la Región Control que se caracteriza por presentar una elevada tasa de sustitución (Avice, 2004). Teniendo en cuenta solo esta región, la diversidad haplotípica registrada para el Golfo de México fue similar a la informada para la especie en el estudio de filogeografía global realizado por Duncan *et al.* (2006) ( $Hd=0.8$ ). A su vez, las diversidades haplotípica y nucleotídica obtenidas fueron mayores a las reportadas por Rosales (2018) para el Pacífico mexicano. Esta alta diversidad registrada en la Región Control de los individuos del Golfo de México probablemente se deba a la inusual variabilidad encontrada en el fragmento que va de la posición 38 a la 45, en donde se dieron seis transversiones y una deleción. Estos cambios no se presentaron en la población del Pacífico y resultan poco comunes en elasmobranquios.

En general, la menor diversidad genética encontrada en el presente estudio para el Golfo de México respecto al Pacífico, tanto con marcadores nucleares como con los mitogenomas puede deberse a factores mencionados anteriormente como el tamaño de muestra y las dimensiones

del área de muestreo. Sin embargo, también puede estar influyendo el origen y expansión de la especie. *Sphyrna lewini* surgió en el Indo-Pacífico con una posterior colonización del Pacífico Centro, Pacífico Este y finalmente el Océano Atlántico (Duncan *et al.*, 2006; Daly-Engel *et al.*, 2012), quedando aislada la población del Atlántico hace al menos 3.5 millones de años con la formación del Istmo de Panamá. Por lo tanto, si la población del Atlántico es la más reciente, es de esperar que sea la menos diversa.

Finalmente, las diferencias en cuanto a los índices de diversidad (nuclear y mitocondrial) detectadas en el presente estudio para el GM\_Sur y GM\_Norte, probablemente se deba al desigual tamaño de muestra. A mayor tamaño de muestra, se espera un aumento en algunos índices de diversidad como número de alelos, alelos privados, sitios polimórficos y haplotipos. Si el tamaño de muestra es menor, pero por azar la mayoría de los individuos muestreados presentan un haplotipo diferente, es de esperar que la diversidad haplotípica sea mayor y por tanto, existe una alta probabilidad de que al muestrear un nuevo individuo de esa población se encuentre un nuevo haplotipo. Sin embargo, la historia evolutiva de linajes diferentes también es un aspecto a considerar al explicar las diferencias observadas.

#### 4.2 ESTRUCTURA GENÉTICA

La delimitación y caracterización de las poblaciones puede llegar a ser muy compleja y verse sesgada por el uso exclusivo de *loci* heredados uniparental o biparentalmente (Daly-Engel *et al.*, 2012). Mientras los marcadores mitocondriales cuentan la historia evolutiva de los linajes maternos, los microsatélites (dada su elevada tasa de mutación) permiten estimar los patrones de conectividad recientes, causados por la dispersión de ambos sexos. Es por ello que en el presente trabajo se emplearon marcadores nucleares y mitocondriales para evaluar la estructura genética de *S. lewini* en el Golfo de México.

Para los microsatélites se encontró homogeneidad genética al analizar a todos los individuos así como al eliminar a los cercanamente relacionados, lo que demuestra que este resultado no se vio influenciado por un sesgo de muestreo de individuos emparentados (Anderson y Dunham 2008). Esta ausencia de diferenciación era de esperar dada la alta movilidad que exhibe la especie y la dispersión aleatoria descrita para los machos (Daly-Engel *et al.*, 2012). Resultados similares han sido obtenidos para otras especies de condriictios en el Golfo de México como *Negaprion brevirostris* (Ashe *et al.*, 2015) y *Carcharhinus leucas* (Sandoval-Laurrabaquio *et al.*, 2019; Karl *et al.*, 2011). Otro ejemplo es el estudio realizado en *Carcharhinus acronotus* donde

utilizaron 23 microsatélites y no detectaron diferencias genéticas entre individuos muestreados en Campeche, Texas y Louisiana (Portnoy *et al.*, 2014).

Por otra parte, al emplear el genoma mitocondrial completo tampoco hubo señal de diferenciación genética. Al analizar un marcador tan largo (16 723 pb), aumenta la probabilidad de encontrar sitios polimórficos y con esto la aparición de nuevos haplotipos. Por lo tanto, si el tamaño de muestra no es lo suficientemente grande, la probabilidad de que un haplotipo sea compartido por al menos dos individuos será muy baja y por consiguiente el valor de  $F_{ST}$  basado en la frecuencia de haplotipos se verá afectado. Un ejemplo donde utilizan todo el mitogenoma y no encuentran señal de diferenciación, a pesar de estar muestreando individuos (N=43) procedentes de mares muy alejados, es el del calamar gigante (Winkelmann *et al.*, 2013). Esto refuerza la importancia de tener un elevado tamaño de muestra al analizar un marcador tan largo.

Sin embargo, no siempre el empleo de todo el mitogenoma tiene las mismas consecuencias. Análisis realizados en *Sphyrna lewini* (Rosales, 2018), *Pristis pristis* (Feutry *et al.*, 2015), *Glyphis glyphis* (Feutry *et al.*, 2014-2017), *Chelonia mydas* (Shamblin *et al.*, 2012) y *Orcinus orca* (Morin *et al.*, 2010) han permitido esclarecer los patrones filogeográficos de estas especies, los cuales no habían sido detectados solo con el empleo de la Región Control. En estos estudios se utilizaron tamaños de muestra mayores a los analizados en el presente trabajo, lo que probablemente influyó en la señal de diferenciación encontrada (a mayor tamaño de muestra, aumenta la probabilidad de encontrar haplotipos compartidos). En el caso de *G. glyphis* solo NAD5 y 12S mostraron señales de diferenciación similares a las del mitogenoma (Feutry *et al.*, 2014), mientras que con el resto de los genes no se encontraron evidencias de estructura genética. Por su parte, en el estudio realizado en *Clupea harengus* los valores de  $F_{ST}$  fueron significativos al analizar el mitogenoma completo, D-loop y ocho genes independientes, presentando COX2 la mayor señal de diferenciación (Teacher *et al.*, 2012).

En el presente estudio solo se detectaron diferencias genéticas al analizar la Región Control lo que probablemente se deba a que las regiones mitocondriales tienen una tasa de sustitución diferente y notablemente baja en algunos genes. Por tanto, al utilizarse todo el mitogenoma, la baja tasa de sustitución de algunas regiones puede diluir la señal de divergencia genética, la cual solo puede ser detectada por la variación contenida en algunas porciones con mayor tasa de sustitución.

Justamente, la Región Control es uno de los fragmentos con mayor tasa de sustitución, de ahí que esta ha sido ampliamente utilizada en estudios poblacionales a escalas pequeñas de tiempo evolutivo (cientos o miles de años) (Vázquez-Domínguez *et al.*, 2009). En *S. lewini* se estima que la tasa de sustitución de este fragmento es de 0.8% de divergencia entre linajes por millón de años (Duncan *et al.*, 2006), valor similar al propuesto para el género *Negaprion* (0.67% por millón de años) (Schultz *et al.*, 2008), resultados que apoyan la baja tasa de sustitución del mitogenoma de tiburones (Martin *et al.*, 1992). Entonces, si la tasa de sustitución de la región más variable del mtDNA es notablemente baja, es de esperar que otras porciones mucho más conservadas como los genes codificantes de proteínas de la cadena respiratoria, no muestren señal de diferenciación al analizar linajes recientes, geográficamente cercanos y separados hace unos pocos cientos o miles de años (se estima que la población del Atlántico de Estados Unidos tiene 75 000 años (Duncan *et al.*, 2006)). Algunos ejemplos de trabajos realizados en tiburones donde utilizan este marcador y detectan diferencias genéticas entre poblaciones geográficamente cercanas, son los realizados en *Negaprion brevirostris* (Ashe *et al.*, 2015) y *Carcharhinus leucas* (Tillett *et al.*, 2012).

Particularmente en el Golfo de México, existen pocos estudios en condriictios donde evalúen divergencia genética entre Sur y Norte. Utilizando la Región Control se encontraron diferencias en *Sphyrna tiburo* (Escatel-Luna *et al.*, 2015) y *Carcharhinus limbatus* (Keeney *et al.*, 2005). Sin embargo, en otras especies como *C. acronotus* (Portnoy *et al.*, 2014) y *C. leucas* (Sandoval-Laurrabaquio *com. pers.*) no se ha encontrado esta diferenciación. Esto probablemente se deba a que los requerimientos ecológicos, los patrones de dispersión (Rooker *et al.*, 2019) y las estrategias reproductivas varían en cada una de las especies.

#### 4.3 FILOPATRÍA DE *Sphyrna lewini*

*Sphyrna lewini* es una de las especies en las que ambos sexos exhiben estrategias reproductivas diferentes, donde las hembras invierten mucha más energía en la reproducción mediante el desarrollo de grandes óvulos, largos periodos de gestación y migraciones a las áreas de crianza (Daly-Engel *et al.*, 2012). Esto conduce a diferencias en el potencial de dispersión (Portnoy *et al.*, 2010), lo que puede generar la aparición de estructura genética.

La homogeneidad genética detectada con marcadores nucleares y la diferenciación genética encontrada con la Región Control de mtDNA en neonatos y juveniles muestreados en áreas de crianza del Golfo de México, sugieren la existencia de filopatría en las hembras. Este comportamiento no representa una interrupción del flujo genético, sino una segregación

diferencial de haplotipos a través de varias generaciones que da lugar a diferencias en la frecuencia en la que aparecen los haplotipos en las distintas áreas de crianza (Hueter *et al.*, 2005). El nivel de diferenciación entre linajes pertenecientes a cada área de crianza está determinado por el grado de arraigo de las hembras adultas de las especies que exhiben este comportamiento (Hueter *et al.*, 2005).

La filopatría ha sido documentada en varias especies de condrictios (e.g. Sandoval-Laurrabaquio *et al.*, 2019; Klein *et al.*, 2019; Kenney *et al.*, 2005), incluyendo *S. lewini* (Daly-Engel *et al.*, 2012). Sin embargo, es importante identificar la escala geográfica a la que se esté dando este comportamiento. En el caso de la filopatría natal, las hembras regresan exactamente a sus sitios de nacimiento (Chapman *et al.*, 2015), por lo que se esperan diferencias genéticas a escalas muy pequeñas. Por su parte, en la filopatría regional las hembras regresan a sus regiones de nacimiento (Chapman *et al.*, 2015), por lo que las diferencias genéticas se deben presentar a mayor escala. Asociado a esto está el tamaño y la vagilidad de la especie. En especies pequeñas y de vagilidad restringida como *Sphyrna tiburo* (longitud máxima de 150 cm) se espera un predominio de la filopatría natal, mientras que en especies grandes y altamente móviles como *Carcharhinus leucas* (longitud máxima de 340 cm), predomina la filopatría regional (Sandoval-Laurrabaquio *et al.*, 2018).

En el presente estudio, la homogeneidad genética detectada con marcadores mitocondriales entre las localidades pertenecientes a una misma región, y la diferenciación genética encontrada entre GM\_Sur y GM\_Norte sugieren que la especie exhibe un comportamiento filopátrico regional. De esta forma fueron identificados dos linajes, uno presentado por los individuos de áreas de crianza de Tamaulipas y el otro de Tabasco+Campeche. Este uso preferencial de una región u otra puede estar determinado por las características del GM\_Sur y el GM\_Norte, las cuales constituyen ecorregiones de provincias biogeográficas diferentes (provincia Tropical del Atlántico Noroccidental y provincia Carolineana, respectivamente) (Neigel, 2009) que no solo difieren en características ecológicas, sino que también han estado influenciadas por factores históricos diversos.

No obstante, consideramos que no debe descartarse la posible existencia de filopatría natal, la cual no pudo ser evaluada en el presente trabajo dado el bajo tamaño de muestra obtenido para algunas localidades. En este sentido, sugerimos realizar más estudios aumentando el tamaño de muestra y la escala geográfica a analizar e incorporando datos de marcaje para de esta forma poder extraer conclusiones más sólidas relacionadas con la existencia de un comportamiento filopátrico en la especie.

La información obtenida resulta esencial en el mantenimiento del acervo genético de la especie, puesto que, como se mencionó anteriormente, la filopatría conduce a la formación de linajes diferentes, los cuales tienen características únicas. Además, puede ser utilizada como herramienta en la identificación de áreas de crianza de la especie, a partir del conocimiento de la distribución y abundancia de haplotipos. Estos elementos deben ser tomados en cuenta para lograr un buen manejo pesquero de las poblaciones de *S. lewini*. La sobreexplotación de individuos pertenecientes a una región de crianza puede provocar la pérdida de diversidad genética por herencia materna y con esto afectarse el potencial reproductivo de la especie así como su capacidad de adaptación a condiciones ambientales cambiantes. Incluso, la pérdida de diversidad se ha identificado como uno de los riesgos más importantes para la persistencia de las especies que no solo afecta la dinámica poblacional, sino que también influye en la estructura de las comunidades (Verdú, 2009).

## 5. CONCLUSIONES

El mitogenoma de *Sphyrna lewini* en el Golfo de México es el más pequeño informado para la especie y tiene el típico orden de genes de los vertebrados.

La diversidad genética nuclear y mitocondrial de *S. lewini* en el Golfo de México es de las más bajas registradas para la especie.

La Región Control del mtDNA resultó ser el fragmento más informativo y el único que mostró señal de divergencia genética entre las ecorregiones GM\_Sur y GM\_Norte.

La homogeneidad genética detectada con marcadores nucleares y la diferenciación encontrada con la Región Control del mtDNA sugieren la existencia de un comportamiento filopátrico regional en las hembras de *S. lewini*, en donde probablemente, las costas de Tamaulipas representen una región de crianza no identificada hasta el momento.

No descartamos la posible existencia de filopatría natal por lo que es necesario aumentar el número de muestras para determinadas localidades y complementar la información genética con datos de marcaje.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, E.C. and K.K. Dunham. 2008. The influence of family groups on inferences made with the program Structure. *Molecular ecology resources* 8: 1219-1229.
- Ashe, J.L., K.A. Feldheim, A.T. Fields, E.A. Reyier, E.J. Brooks, M.T. O'Connell, ... and D.D. Chapman. 2015. Local population structure and context-dependent isolation by distance in a large coastal shark. *Marine Ecology Progress Series* 520: 203-216.
- Avise, J.C. 2004. Molecular markers, natural history, and evolution, 684 pp.
- Baker, C.S., D. Steel, J. Calambokidis, E. Falcone, U. González-Peral, J. Barlow ... and D. Mattila. 2013. Strong maternal fidelity and natal philopatry shape genetic structure in North Pacific humpback whales. *Marine Ecology Progress Series* 494: 291-306.
- Bandelt, H.J., P. Forster and A. Röhl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16: 37-48.
- Bass, N.C., J. Mourier, N.A. Knott, J. Day, T. Guttridge and C. Brown. 2017. Long-term migration patterns and bisexual philopatry in a benthic shark species. *Marine and Freshwater Research*, 68: 1414-1421.
- Baum, J., S. Clarke, A. Domingo, M. Ducrocq, A.F. Lamónaca, N. Gaibor, R. Graham, S. Jorgensen, J.E. Kotas, E. Medina... and C. M. Vooren. 2007. *Sphyrna lewini*. *The IUCN Red List of Threatened Species*.
- Baum, J.K., R.A. Myers, D.G. Kehler, B. Worm, S.J. Harley and P.A. Doherty. 2003. Collapse and conservation of shark populations in the Northwest Atlantic. *Science* 299: 389-392.
- Bernt, M., A. Donath, F. Jühling, F. Externbrink, C. Florentz, G. Fritzsich, J. Pütz, M. Middendorf, P.F. Stadler. 2013. MITOS: Improved de novo Metazoan Mitochondrial Genome Annotation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69: 313-319.
- Bowen, B.W., A.L. Bass, S.M. Chow, M. Bostrom, K.A. Bjorndal, A.B. Bolten,... and D. Shaver. 2004. Natal homing in juvenile loggerhead turtles (*Caretta caretta*). *Molecular Ecology*, 13: 3797-3808.
- Branstetter, S. 1987. Age, growth and reproductive biology of the silky shark, *Carcharhinus falciformis*, and the scalloped hammerhead, *Sphyrna lewini*, from the northwestern Gulf of Mexico. *Environmental Biology of Fishes* 19: 161-173.
- Castro, J.I. 2009. Observations on the reproductive cycles of some viviparous North American sharks. *Aqua* 15: 205-222.
- Castro, J.I. 1983. The Sharks of North American Waters. Texas A. and M. University Press, College Station, USA.
- Castro, P.A. 2018. Variabilidad genética del genoma mitocondrial del atún aleta amarilla *Thunnus albacares* y filogeografía global de sus poblaciones (tesis de pregrado). Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Carr, S.M. and H.D. Marshall. 2008. Intraspecific phylogeographic genomics from multiple complete mtDNA genomes in Atlantic cod (*Gadus morhua*): origins of the “codmother,” transatlantic vicariance and midglacial population expansion. *Genetics* 180: 381-389.

CCA. 2017. Plan de acción de América del Norte para un comercio sustentable de especies de tiburón, Comisión para la Cooperación Ambiental, Montreal, 54 pp.

Chapman, D.D., D. Pinhal, and M.S. Shivji. 2009. Tracking the fin trade: genetic stock identification in western Atlantic scalloped hammerhead sharks *Sphyrna lewini*. *Endangered Species Research* 9: 221-228.

Chapman, D.D., K.A. Feldheim, Y.P. Papastamatiou and R.E. Hueter. 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.

Chen, X., D. Xiang, Y. Xu and X. Shi. 2015. Complete mitochondrial genome of the scalloped hammerhead *Sphyrna lewini* (Carcharhiniformes: Sphyrnidae). *Mitochondrial DNA* 26: 621-622.

Chesser, R.K. (1991): Gene diversity and female philopatry. *Genetics* 127: 437-447.

CITES. 2013. Notificación a las Partes núm. 2013/012: Enmiendas a los Apéndices I y II de la Convención, Secretaría de la CITES, Ginebra; disponible en: <https://cites.org/sites/default/files/esp/notif/2013/S-Notif-2013-012.pdf>

Clarke, S.C., M.K. McAllister, E.J. Milner-Gulland, G.P. Kirkwood, C.G.J. Michielsens, D.J. Agnew, E.K. Pikitch, H. Nakano and M.S. Shivji. 2006. Global Estimates of Shark Catches using Trade Records from Commercial Markets. *Ecology Letters* 9: 1115-1126.

Compagno, L.J. 2001. Sharks of the world: an annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. *Food & Agriculture Org* (Vol. 1).

CONAPESCA. 2019. Entra en vigor veda a la pesca de tiburones y rayas en los litorales nacionales. <https://www.gob.mx/conapesca>

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

Cuevas, G.A. 2018. Identificación de áreas de crianza para el tiburón martillo *Sphyrna lewini* (*Griffith y Smith, 1834*) en el sur del Golfo de México usando datos dependientes de la pesca (tesis de maestría). El Colegio de la Frontera Sur, Campeche, México.

Daly-Engel, T.S., K.D. Seraphin, K.N. Holland, J.P. Coffey, H.A. Nance, R.J. Toonen and B.W. Bowen. 2012. Global phylogeography with mixed-marker analysis reveals male-mediated dispersal in the endangered scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*). *PLoS One* 7(1).

Dudgeon, C.L., D.C. Blower, D. Broderick, J.L. Giles, B.J. Holmes, T. Kashiwagi ... and J.R. Ovenden. 2012. A review of the application of molecular genetics for fisheries management and conservation of sharks and rays. *Journal of fish biology* 80: 1789-1843.

- Duncan, K.M. and K.N. Holland. 2006. Habitat use, growth rates and dispersal patterns of juvenile scalloped hammerhead sharks *Sphyrna lewini* in a nursery habitat. *Marine Ecology Progress Series* 312: 211-221.
- Duncan, K.M., A.P. Martin, B.W. Bowen and H.G. De Couet. 2006. Global phylogeography of the scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*). *Molecular ecology* 15: 2239-2251.
- Escatel-Luna, E., D.H. Adams, M. Uribe-Alcocer, V. Islas-Villanueva and P. Díaz-Jaimes. 2015. Population genetic structure of the bonnethead shark, *Sphyrna tiburo*, from the Western North Atlantic Ocean based on mtDNA sequences. *Journal of Heredity* 106: 355-365.
- Excoffier, L. and H.E.L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resources* 10: 564-567.
- Falush, D., M. Stephens and J.K. Pritchard. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Mol Ecol Notes* 7: 574-578.
- FAO. 2016. Identification guide to common sharks and rays of the Caribbean, by Ramón Bonfil. FishFinder Programme. Rome, Italy.
- FAO. 2009. Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service 24/04/2009. <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-capture-production/query/es>.
- FAO (1999). International Plan of Action for the Conservation and Management of Sharks. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Feldheim, K.A., S.H. Gruber and M.V. Ashley. 2004. Reconstruction of parental microsatellite genotypes reveals female polyandry and philopatry in the lemon shark, *Negaprion brevirostris*. *Evolution* 58: 2332-2342.
- Feutry, P., O. Berry, P.M. Kyne, R.D. Pillans, R.M. Hillary, P.M. Grewe ... and M. Bravington. (2017). Inferring contemporary and historical genetic connectivity from juveniles. *Molecular ecology* 26: 444-456.
- Feutry, P., P.M. Kyne, R.D. Pillans, X. Chen, J.R. Marthick, D.LMorgan and P.M. Grewe. 2015. Whole mitogenome sequencing refines population structure of the Critically Endangered sawfish *Pristis pristis*. *Marine Ecology Progress Series* 533: 237-244.
- Feutry, P., P.M. Kyne, R.D. Pillans, X. Chen, G.J. Naylor and P.M. Grewe. 2014. Mitogenomics of the Speartooth Shark challenges ten years of control region sequencing. *BMC evolutionary biology* 14: 232.
- Fricke, R., W.N. Eschmeyer and R. van der Laan (eds) 2020. ESCHMEYER'S CATALOG OF FISHES: GENERA, SPECIES, REFERENCES. (<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>).
- Gilbert, C.R. 1967. A revision of the hammerhead sharks (family Sphyrnidae). *Proceedings of the United States National Museum*.
- González, E.G. 2003. Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia*, 59: 377-388.

- Goudet, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9. 3).
- Graur, D. and W.H. Li. 2000. Fundamentals of Molecular Evolution. Sinauer Associates, USA, pp. 1-481.
- Green, M.E., S.A. Appleyard, W. White, S. Tracey and J. Ovenden. 2017. Variability in multiple paternity rates for grey reef sharks (*Carcharhinus amblyrhynchos*) and scalloped hammerheads (*Sphyrna lewini*). *Scientific reports* 7: 1-8.
- Greenwood, P.J. 1980. Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. *Animal behaviour* 28: 1140-1162.
- Guttridge, T.L., M.P. Van Zinnicq Bergmann, C. Bolte, L.A. Howey, J.S. Finger, S.T. Kessel... and S.H. Gruber. 2017. Philopatry and regional connectivity of the great hammerhead shark, *Sphyrna mokarran* in the US and Bahamas. *Frontiers in Marine Science* 4: 3.
- Hazin, F., A. Fischer, and M. Broadhurst. 2001. Aspects of reproductive biology of the scalloped hammerhead shark, *Sphyrna lewini*, off northeastern Brazil. *Environmental Biology of Fishes* 61: 151-159.
- Heist, E.J. 2004. Genetics of sharks, skates, and rays. In *Biology of Sharks and their Relatives* (pp. 475-489). CRC Press.
- Heupel, M.R., J.K. Carlson and C.A. Simpfendorfer. 2007. Shark nursery areas: concepts, definition, characterization and assumptions. *Marine Ecology Progress Series* 337: 287-297.
- Holland, K.N., B.M. Wetherbee, J.D. Peterson and C.G. Lowe. 1993. Movements and distribution of hammerhead shark pups on their natal grounds. *Copeia* 495-502.
- Howey-Jordan, L.A., E.J. Brooks, D.L. Abercrombie, L.K. Jordan, A. Brooks, S. Williams...and D.D. Chapman. 2013. Complex movements, philopatry and expanded depth range of a severely threatened pelagic shark, the oceanic whitetip (*Carcharhinus longimanus*) in the western North Atlantic. *PLoS one* 8.
- Hueter, R.E. and J.P. Tyminski. 2007. Species-specific distribution and habitat characteristics of shark nurseries in Gulf of Mexico waters off peninsular Florida and Texas. In *American Fisheries Society Symposium* 50: 193.
- Hueter, R.E., M.R. Heupel, E.J. Heist and D.B. Keeney. 2005. Evidence of Philopatry in Sharks and Implications for the Management of Shark Fisheries. *Journal of northwest atlantic fishery Science* 35: 239-247.
- IUCN SSC Shark Specialist Group. 2018. *Sphyrna lewini*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2020-1
- Jones, O.R. and J. Wang. 2010. COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Molecular Ecology Resources* 10: 551 -555.
- Karl, S.A., A.L.F. Castro, J.A. Lopez, P. Charvet and G.H. Burgess. 2011. Phylogeography and conservation of the bull shark (*Carcharhinus leucas*) inferred from mitochondrial and microsatellite DNA. *Conservation Genetics* 12: 371-382.

- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., ... and Thierer, T. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28: 1647-1649.
- Keeney, D.B., M.R. Heupel, R.E. Hueter and E.J. Heist. 2005. Microsatellite and mitochondrial DNA analyses of the genetic structure of blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) nurseries in the northwestern Atlantic, Gulf of Mexico, and Caribbean Sea. *Molecular Ecology* 14: 1911-1923.
- Ketchum, J.T., A. Hearn, A.P. Klimley, C. Peñaherrera, E. Espinoza, S. Bessudo ... and R. Arauz. 2014. Inter-island movements of scalloped hammerhead sharks (*Sphyrna lewini*) and seasonal connectivity in a marine protected area of the eastern tropical Pacific. *Marine Biology* 161: 939-951.
- Klein, J.D., A.E. Bester-van der Merwe, M.L. Dicken, K.L. Mmonwa, and P.R. Teske. 2019. Reproductive philopatry in a coastal shark drives age-related population structure. *Marine biology* 166: 26.
- Klimley, A.P., S.B. Butler, D.R. Nelson and A.T. Stull. 1988. Diel movements of scalloped hammerhead sharks, *Sphyrna lewini* Griffith and Smith, to and from a seamount in the Gulf of California. *Journal of fish biology* 33: 751-761.
- Knip, D.M., M.R. Heupel and C.A. Simpfendorfer. 2010. Sharks in nearshore environments: models, importance, and consequences. *Marine Ecology Progress Series* 402: 1-11.
- Lee, P.L., P. Luschi and G.C. Hays. 2007. Detecting female precise natal philopatry in green turtles using assignment methods. *Molecular ecology* 16: 61-74.
- Li, Q., C. Park, T. Kobayashi and A. Kijima. 2003. Inheritance of microsatellite DNA markers in the Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. *Marine Biotechnology* 5: 331-338.
- Librado, P. and J. Rozas. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Llanes-Quevedo, A., M.A. González, R.C. Mena, C. Frankel and G.E. López. 2018. Microsatellite variability of the wood stork *Mycteria americana* (Aves, Ciconidae) in Cuba: implications for its conservation. *Animal Biodiversity and Conservation* 41: 357-364.
- Marie, A.D., C. Herbinger, P.M. Fullsack and C. Rico. 2019. First reconstruction of kinship in a scalloped hammerhead shark aggregation reveals the mating patterns and breeding sex ratio. *Frontiers in Marine Science* 6: 676.
- Marie, A.D., C. Miller, C. Cawich, S. Piovano and C. Rico. 2017. Fisheries-independent surveys identify critical habitats for young scalloped hammerhead sharks (*Sphyrna lewini*) in the Rewa Delta, Fiji. *Scientific reports* 7: 1-12.
- Martin, A.P, G.J.P. Naylor and S.R. Palumbi. 1992. Rates of mitochondrial DNA evolution in sharks are slow compared with mammals. *Nature* 357: 153-155.
- Mayr, E. 1963. *Animal Species and Evolution*. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Mass. 797 p.
- Moritz, C. 1994. Defining 'evolutionarily significant units' for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 9: 373-375.

- Morin, P.A., F.I. Archer, A.D. Foote, J. Vilstrup, E.E. Allen, P. Wade ... and P. Bouffard. 2010. Complete mitochondrial genome phylogeographic analysis of killer whales (*Orcinus orca*) indicates multiple species. *Genome research* 20: 908-916.
- Mourier, J. and S. Planes. 2013. Direct genetic evidence for reproductive philopatry and associated fine-scale migrations in female blacktip reef sharks (*Carcharhinus melanopterus*) in French Polynesia. *Molecular Ecology* 22: 201-214.
- Nance, H.A., P. Klimley, F. Galván-Magaña, J. Martínez-Ortíz and P.B. Marko. 2011. Demographic processes underlying subtle patterns of population structure in the scalloped hammerhead shark, *Sphyrna lewini*. *PLoS one* 6.
- Nance, H.A., T.S. Daly-Engel and P.B. Marko. 2009. New microsatellite loci for the endangered scalloped hammerhead shark, *Sphyrna lewini*. *Molecular ecology resources* 9: 955-957.
- Neigel, J.E. 2009. Population genetics and biogeography of the Gulf of Mexico. *Gulf of Mexico: Origins, Waters and Biota* 1: 1353-1369.
- Ovenden, J.R., J.A. Morgan, R. Street, A. Tobin, C. Simpfendorfer, W. Macbeth and D. Welch. 2011. Negligible evidence for regional genetic population structure for two shark species *Rhizoprionodon acutus* (Rüppell, 1837) and *Sphyrna lewini* (Griffith & Smith, 1834) with contrasting biology. *Marine Biology* 158: 1497-1509.
- Päckert, M., G. Giacalone, M. Lo Valvo and C. Kehlmaier. 2019. Mitochondrial heteroplasmy in an avian hybrid form (Passer italiae: Aves, Passeriformes). *Mitochondrial DNA Part B* 4: 3809-3812.
- Pardini, A.T., C.S. Jones, L.R. Noble, B. Kreiser, H. Malcolm, B.D., Bruce, ... and C.A. Duffy. 2001. Sex-biased dispersal of great white sharks. *Nature* 412: 139.
- Parsons, G.R. and E.R. Hoffmayer. 2007. Identification and characterization of shark nursery grounds along the Mississippi and Alabama gulf coasts. In *American Fisheries Society Symposium* 50: 301.
- Peakall, R. and P.E. Smouse. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatic* 28: 2357-2365.
- Portnoy, D.S., C.M. Hollenbeck, C.N. Belcher, W.B. Driggers III, B.S. Frazier, J. Gelsleichter... and J.R. Gold. 2014. Contemporary population structure and post-glacial genetic demography in a migratory marine species, the blacknose shark, *Carcharhinus acronotus*. *Molecular Ecology*, 23: 5480-5495.
- Portnoy, D.S., J.R. McDowell, E.J. Heist, J.A. Musick and J.E. Graves. 2010. World phylogeography and male-mediated gene flow in the sandbar shark, *Carcharhinus plumbeus*. *Molecular Ecology*, 19: 1994-2010.
- Pritchard, J.K., M. Stephens and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Quintanilla, S., A. Gómez, C. Mariño-Ramírez, C. Sorzano, S. Bessudo, G. Soler... and S. Caballero. 2015. Conservation genetics of the scalloped hammerhead shark in the Pacific coast of Colombia. *Journal of Heredity* 106: 448-458.

- Rigby, C.L., N.K. Dulvy, R. Barreto, J. Carlson, D. Fernando, S. Fordham, M.P. Francis, K. Herman, R.W. Jabado, K.M. Liu, A. Marshall, N. Pacoureaux, E. Romanov, R.B. Sherley and H. Winker. 2019. *Sphyrna lewini*. *The IUCN Red List of Threatened Species*: e.T39385A2918526.
- Rooker, J.R., M.A. Dance, R.D. Wells, M.J. Ajemian, B.A. Block, M.R. Castleton ... and J.M. Hendon. 2019. Population connectivity of pelagic megafauna in the Cuba-Mexico-United States triangle. *Scientific reports* 9: 1-13.
- Rooker, J.R., D.H. Secor, G. De Metrio, R. Schloesser, B.A. Block and J.D. Neilson. 2008. Natal homing and connectivity in Atlantic bluefin tuna populations. *Science* 322: 742-744.
- Rosales, L.P. 2018. Diversidad genética del genoma mitocondrial de *Sphyrna lewini* (Carcharhiniformes: Sphyrnidae) en zonas de crianza del Pacífico mexicano (tesis de maestría). Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Rousset, F. 2008. Genepop 4.1 for Windows/Linux/Mac OS X.
- SAGARPA. 2001. Guía para la identificación de las especies de tiburones de importancia comercial del océano Pacífico. Subsecretaría de Pesca, Instituto Nacional de la Pesca, México, pp. 1-4.
- Salinas-de-León, P., E.M. Hoyos-Padilla, and F. Pochet. 2017. First observation on the mating behaviour of the endangered scalloped hammerhead shark *Sphyrna lewini* in the Tropical Eastern Pacific. *Environmental Biology of Fishes* 100: 1603-1608.
- Salomón-Aguilar, C.A., C.J. Villavicencio-Garayzar and H. Reyes-Bonilla. 2009. Zonas y temporadas de reproducción y crianza de tiburones en el Golfo de California: Estrategia para su conservación y manejo pesquero. *Ciencias marinas* 35: 369-388.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.
- Sandoval-Laurrabaquio, N., V. Islas-Villanueva, D.H. Adams, M. Uribe-Alcocer, J.R. Alvarado-Bremer and P. Díaz-Jaimes. 2019. Genetic evidence for regional philopatry of the Bull Shark (*Carcharhinus leucas*), to nursery areas in estuaries of the Gulf of México and western North Atlantic ocean. *Fisheries Research* 209: 67-74.
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature biotechnology* 18: 233-234.
- Schultz, J.K., K.A. Feldheim, S.H. Gruber, M.V. Ashley, T.M. McGovern and B.W. Bowen. 2008. Global phylogeography and seascape genetics of the lemon sharks (genus *Negaprion*). *Molecular Ecology* 17: 5336-5348.
- Selkoe, K.A. and R.J. Toonen. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology letters* 9: 615-629.
- Shamblin, B.M., K.A. Bjorndal, A.B. Bolten, Z.M. Hillis-Starr, I. Lundgren, E. Naro-Maciel and C.J. Nairn. 2012. Mitogenomic sequences better resolve stock structure of southern Greater Caribbean green turtle rookeries. *Molecular Ecology* 21: 2330-2340.
- Shepherd, T.D. and R.A. Myers. 2005. Direct and indirect fishery effects on small coastal elasmobranchs in the northern Gulf of Mexico. *Ecology Letters* 8: 1095-1104.

- Spaet, J.L., R.W. Jabado, A.C. Henderson, A.B. Moore and M.L. Berumen. 2015. Population genetics of four heavily exploited shark species around the Arabian Peninsula. *Ecology and evolution* 5: 2317-2332.
- Teacher, A.G., C. André, J. Merilä and C.W. Wheat. 2012. Whole mitochondrial genome scan for population structure and selection in the Atlantic herring. *BMC evolutionary biology* 12: 248.
- Thorrold, S.R., C. Latkoczy, P.K. Swart and C.M. Jones. 2001. Natal homing in a marine fish metapopulation. *Science* 291: 297-299.
- Tillett, B.J., M.G. Meekan, I.C. Field, D.C. Thorburn and J.R. Ovenden. 2012. Evidence for reproductive philopatry in the bull shark *Carcharhinus leucas*. *Journal of fish biology* 80: 2140-2158.
- Tsai, Y.J.J. and J. Mann. 2013. Dispersal, philopatry, and the role of fission-fusion dynamics in bottlenose dolphins. *Marine Mammal Science* 29: 261-279.
- Tautz, D. 1993. Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. In *DNA fingerprinting: State of the science* (pp. 21-28). Birkhäuser, Basel.
- Van Oosterhout, C., W.F. Hutchinson, D.P. Wills and P. Shipley. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535-538.
- Vázquez-Domínguez, E., S. Castañeda-Rico, T. Garrido-Garduño and T.A. Gutiérrez-García. 2009. Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. *Revista chilena de historia natural* 82: 277-297.
- Verdú, M. 2009. Genética de comunidades. *Ecosistemas* 18.
- Waples, R.S. 1995. Evolutionarily significant units and the conservation of biological diversity under the Endangered Species Act. *American Fisheries Society Symposium* 17: 8-27
- Weir, B.S. and C.C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*: 1358-1370.
- White, W.T, C. Bartron, I.C. Potter. 2008. Catch composition and reproductive biology of *Sphyrna lewini* (Griffith & Smith) (Carcharhiniformes, Sphyrnidae) in Indonesian waters. *Journal of Fish Biology* 72: 1675-1689.
- Wilkinson T., E. Wiken, J. Bezaury Creel, T. Hourigan, T. Agardy, H. Herrmann, L. Janishevski, C. Madden, L. Morgan y M. Padilla, Ecorregiones marinas de América del Norte, Comisión para la Cooperación Ambiental, Montreal, 2009, 200 pp.
- Winkelmann, I., P.F. Campos, J. Strugnell, Y. Cherel, P.J. Smith, T. Kubodera ... and M. Norman. 2013. Mitochondrial genome diversity and population structure of the giant squid *Architeuthis*: genetics sheds new light on one of the most enigmatic marine species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280: 20130273.
- Wolstenholme, D.R. 1992. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. In *International review of cytology* 141: 173-216.