

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## INTRODUCTION

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

## INTRODUCCIÓN

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

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

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

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

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

## MATERIAL AND METHODS

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

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

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

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

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

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

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

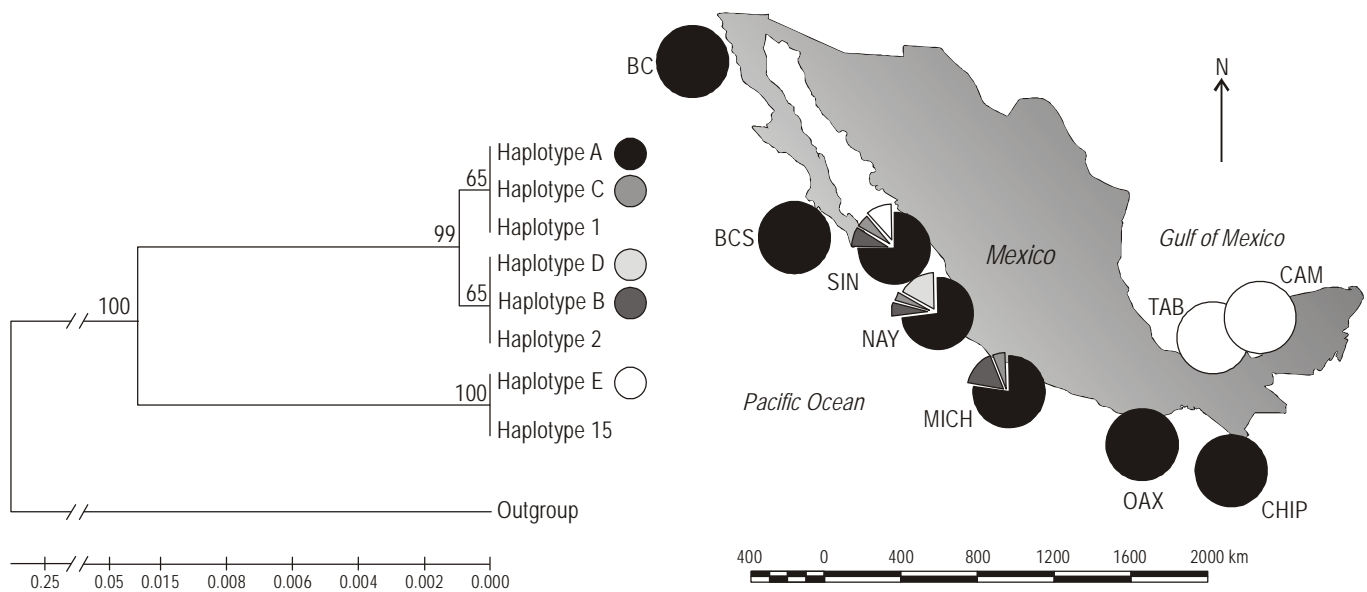
A 1000 bp fragment of the mtDNA control region was amplified from 149 individuals, using universal primers (Stoner *et al.* 2003). Polymerase chain reactions (PCR) were performed in a 15- $\mu$ L final volume, consisting of  $\sim$ 10 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup> DNA, amplification buffer (10 mM Tris-HCl,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

## MATERIALES Y MÉTODOS

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

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

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



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

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

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

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

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

### Data analysis

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

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

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

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

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

### Análisis de datos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## RESULTS

### Genetic diversity

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

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

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

### Population divergence

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

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

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

## RESULTADOS

### Diversidad genética

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

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

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

### Population expansion and gene flow

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

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

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

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

### Divergencia poblacional

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

**Table 1.** Genetic variability of mtDNA control region sequences. Accession numbers of haplotype sequences: JN543266–JN543270.  
**Tabla 1.** Variabilidad genética de la región control del ADNmt. Números de acceso de las secuencias de los haplotipos: JN543266–JN543270.

Location	Haplotype (Freq.)	$h$	$\pi$	$\theta K$	$\tau$	$T$	$\theta_0$	$\theta_1$	$\tau_e$	$T_e$	$\theta_N$	$M$	$D(P)$
SIN	A (0.750)	0.415	0.007	1.031	3.0	262,600	0.0017	0.502 (7700)	5.408	473,400	0.006 (92.0)	0.721	-0.961 (0.17)
	B (0.071)												
	C (0.071)												
	E (0.107)												
NAY	A (0.724)	0.440	0.002	1.016	0.0	??	0.0000	99999.0 (1.5 × 10 <sup>9</sup> )	4.655	407,500	0.001 (15.0)	0.916	-0.610 (0.288)
	B (0.069)												
	C (0.034)												
	D (0.172)												
MICH	A (0.764)	0.380	0.002	0.774	3.0	262,600	0.2173	0.442 (6800)	5.340	467,500	0.001 (15.0)	0.734	-0.777 (0.249)
	B (0.176)												
	C (0.058)												

$h$  = haplotype diversity.

$\pi$  = nucleotide diversities.

$\theta K$  = nucleotide diversity estimator.

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

$T$  = Current time since population expansion.

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

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

$\tau_e = \tau_{au} = 2\mu T_e$ , where  $\mu$  is equal to the mutation rate.

$T_e$  = Current time since spatial expansion.

$\theta_N$  = Effective size of females.

$M$  = Generation time.

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



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

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

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

\* Significant values.

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

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

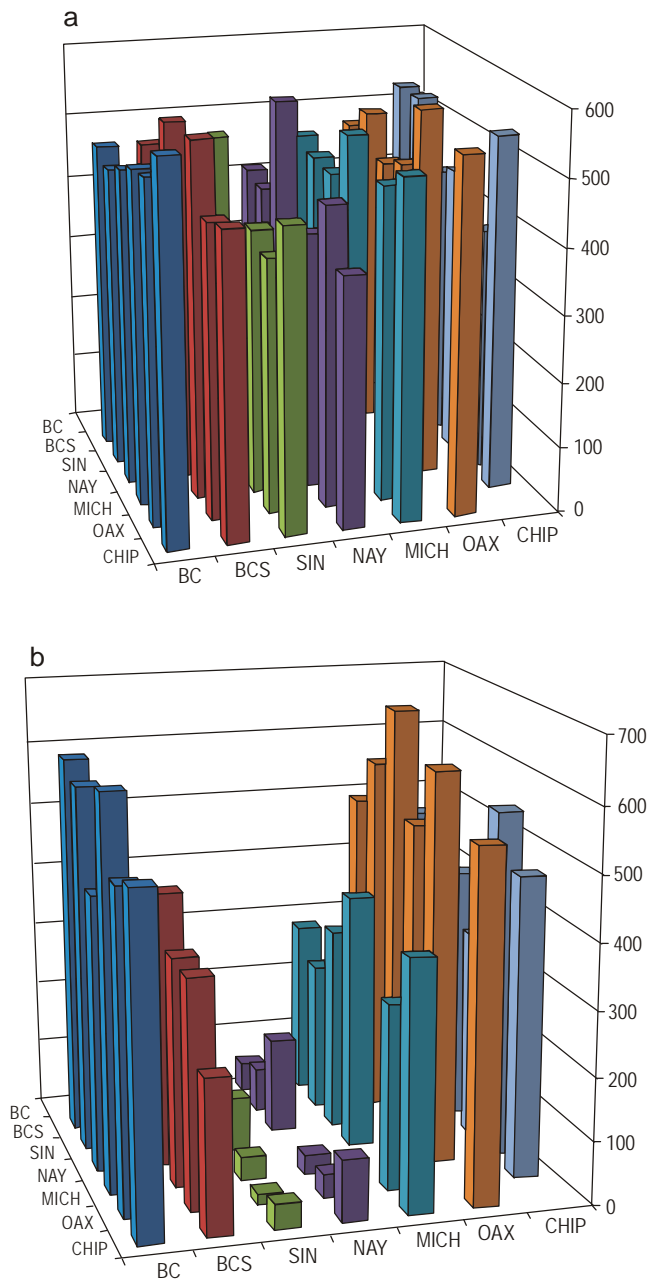
Location	BC 60	BCS 27	SIN 47	NAY 62	MICH 84	OAX 127	CHIP 56	CAM 66	TAB 49
<b>Mexican Pacific</b>									
BC 114		0.0	0.029	0.057	0.049	0.0	0.0	1.0*	1.0*
BCS 115	0.144* 0.047		0.102	0.132	0.147	0.0	0.0	1.0*	1.0*
SIN 105	0.454* 0.217	0.076* 0.064		0.013	-0.02	0.05	0.072	0.679*	0.717*
NAY 77	0.411* 0.491	0.088* 0.255	-0.010 0.036		0.003	0.078	0.1	0.693*	0.73*
MICH 105	0.297* 0.165	0.045 0.122	0.033 0.069	0.011 0.051		0.075	0.104	0.76*	0.803*
OAX 111	0.324* 0.707	0.029 0.722	0.029 0.722	0.048 0.858	0.067 0.554		0.0	1.0*	1.0*
CHIP 97	0.314* 0.098	0.045 -0.011	0.031 0.022	0.011 0.186	-0.022 0.105	0.083 0.716		1.0*	1.0*
<b>Gulf of Mexico</b>									
CAM 96	0.263* 0.384	0.026 0.174	0.022 0.010	0.0005 -0.016	-0.027 -0.018	0.033 0.815	-0.014 0.119		0.0
TAB 86	0.455* 0.310	0.109* 0.159	-0.0003 0.024	-0.007 0.003	0.027 0.022	0.082 0.755	0.014 0.116	0.036 -0.047	

\* Significant values,  $P < 0.001$ .

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

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

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



**Figure 2.** Genetic flow. Values of immigrants between pairs of populations from (a) mtDNA data and (b) microsatellite data.

**Figura 2.** Flujo genético. Valores de inmigrantes entre pares de poblaciones de datos de (a) ADNmt y (b) microsatélites.

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

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

### Expansión poblacional y flujo génico

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

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

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

## DISCUSSION

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

### Population divergence

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

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

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

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

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

## DISCUSIÓN

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

### Divergencia poblacional

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

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

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

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

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

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

### Population expansion and gene flow

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### Expansión poblacional y flujo génico

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

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

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

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

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

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

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

## CONCLUSIONS

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

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

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

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

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

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

#### ACKNOWLEDGEMENTS

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

#### REFERENCES

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

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

#### CONCLUSIONES

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

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

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



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

## AGRADECIMIENTOS

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

- Kukita YK, Tahira T, Sommer SS, Hayashi K. 1997. SSCP Analysis of long DNA fragments in low pH gel. *Hum. Mutat.* 10: 400–407.
- Kumar S, Tamuna K, Nei M. 2004. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* 5: 150–163.
- Lecomte F, Grant WS, Dodson JJ, Rodríguez-Sánchez R, Bowen BW. 2004. Living with uncertainty: Genetic imprints of climate shifts in East Pacific anchovy (*Engraulis mordax*) and sardine (*Sardinops sagax*). *Mol. Ecol.* 13: 2169–2182.
- Liu JX, Gao TX, Zhuang ZM, Jin XS, Yokogawa K, Zhang YP. 2006. Late Pleistocene divergence and subsequent population expansion of two closely related fish species, Japanese anchovy (*Engraulis japonicus*) and Australian anchovy (*Engraulis australis*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 40: 712–723.
- Nance HA, Klimley P, Galván-Magaña F, Martínez-Ortiz J, Marko PB. 2011. Demographic processes underlying subtle patterns of population structure in the scallop hammerhead shark, *Sphyrna lewini*. *Plos One* 6: 21459–21459.
- Orita M, Iwahana H, Kanasawa H, Hayashi K, Sekita T. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2766–2770.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
- Rice WR. 1989. Analyzing tables of statistical test. *Evolution* 43: 223–225.
- Rohfritsch A, Borsa P. 2005. Genetic structure of Indian scads mackerel *Decapterus russelli*: Pleistocene vicariance and secondary contact in the central Indo-West Pacific seas. *Heredity* 95: 315–326.
- Rousset F. 2008. Genepop'007: A complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resour.* 8: 103–106.
- Ryman N, Palm S. 2006. POWSIM: A computer program for assessing statistical power when testing for genetic differentiation. *Mol. Ecol. Notes* 6: 600–602.
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2001. Guía para la identificación de las especies de tiburones de importancia comercial del océano Pacífico. Subsecretaría de Pesca, Instituto Nacional de la Pesca, México, pp. 1–4.

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

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