



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA  
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA  
BIOLOGÍA MARINA

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y FILOGEOGRAFÍA DEL  
TIBURÓN PILOTO, *Carcharhinus falciformis* EN EL OCÉANO PACÍFICO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA

**CAROLINA GALVÁN TIRADO**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: **DR. PÍNDARO DÍAZ JAIMES**  
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

COMITÉ TUTORAL: **DR. FELIPE GALVÁN MAGAÑA**  
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS  
**DR. FRANCISCO JAVIER GARCÍA DE LEÓN**  
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL NOROESTE  
**DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU**  
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA  
**DR. OSCAR SOSA NISHIZAKI**  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA

MÉXICO, D. F., AGOSTO, 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización del doctorado.

A mi director de tesis Píndaro Días Jaimes y al resto de mi comité tutorial: Felipe Galván Magaña, Francisco J. García de León, Daniel I. Piñero Dalmau y Oscar Sosa Nishizaki por el apoyo incondicional, dedicación y las invaluable aportaciones que contribuyeron a enriquecer y darle forma a la presente tesis.

Al M. en C. Julio A. Hernández González del Laboratorio Biología Molecular de Plantas y al M. en C. Hever Latisnere Barragán del Laboratorio de Biotecnología de Organismos Marinos del Cibnor por su invaluable ayuda en el desarrollo de la librería genómica de loci microsatélites.

Las muestras se obtuvieron gracias a la colaboración de varias personas a quienes agradezco profundamente: Dr. Robert Olson de la Comisión Interamericana del atún tropical, Dra. Ilena Zanella del Programa de restauración de tortugas marinas de Costa Rica; Biol. Colombo Estupiñán Montaña de Parques Nacionales Naturales de Ecuador; Dra. Vallerie Allain de la Secretaría de la Comunidad del Pacífico y Dra. Jennifer Ovenden del Laboratorio Molecular de Pesquerías de la Universidad de Queensland, Australia.

Aunque siga siendo un lobo solitario en muchos de mis caminos, hace tiempo que comprendí que este trabajo no lo habría logrado sola. Así que esto es en honor y agradecimiento a cuantos estuvieron involucrados de alguna forma en el largo y tortuoso camino del desarrollo y escritura de esta tesis... Especialmente a mi amada familia de sangre, mi incomparable familia paceña adoptiva, mis excelentes amigos y compañeros y aún a esas personas que por alguna razón ya no forman parte de mi vida pero que en su momento estuvieron conmigo, apoyándome y dejaron huella en mi memoria...

“A veces por los caminos y en los momentos más insospechados surge una mano, una voz, un amigo que te devuelve el ánimo, y, lo que es más importante, la esperanza...”

A todos ustedes que siempre me alentaron y no me dejaron desfallecer

**¡MUCHAS GRACIAS!**

*"The sea, once it casts its spell, holds on in its net of wonder forever."*

Jacques Yves Cousteau

## RESÚMEN

El tiburón piloto *Carcharhinus falciformis* se encuentra en aguas cálidas alrededor del mundo y es capturado frecuentemente en las pesquerías comerciales. Los niveles de diversidad genética, la estructura genética poblacional, filogeografía y demografía histórica fueron investigados a través de un fragmento de 732 pb de la región control del ADN mitocondrial (ADNmt) y cuatro loci microsatelitales para determinar la existencia de divergencia genética y el grado de conectividad entre las poblaciones de la especie en el Océano Pacífico. El análisis de la secuencia de la región control mostró la presencia de 14 haplotipos que resultaron en una diversidad haplotípica ( $0.48 \pm 0.03$ ) y nucleotídica ( $0.0009 \pm 0.00008$ ) baja en comparación con otras especies de tiburones. La baja variabilidad observada con la región control no se observó en el genoma nuclear dada por los microsatélites ( $H_o = 0.65$ ), posiblemente como resultado de algún evento histórico-demográfico en la especie relacionado con un evento de colonización reciente. El patrón de estructura genética observada con los análisis del AMOVA con ambos marcadores, describe historias distintas para cada marcador. Mientras que el ADNmt mostró la existencia de diferenciación entre la región Oriental y Occidental del Pacífico ocurrida hace aproximadamente 170,161 años, los microsatélites no registraron dicho patrón en las diferentes comparaciones entre los grupos formados. Sin embargo, los microsatélites mostraron una señal débil pero significativa de diferenciación con los análisis de  $F_{ST}$  pareados, respaldando las diferencias genéticas entre las regiones Oriental y Occidental del Pacífico observadas con la región control. El bajo número de microsatélites utilizado fue al parecer insuficiente para detectar la señal de divergencia y poder resolver con mayor certeza el patrón de estructura genética del tiburón piloto en el Océano Pacífico. La presencia de los tres haplotipos más comunes del tiburón piloto a través del Océano Pacífico sugiere una importante cantidad de flujo histórico de genes entre las regiones Oriental y Occidental. Asimismo, los resultados de migrantes recientes estimados con los loci microsatelitales muestran un patrón de direccionalidad del flujo de Occidente a Oriente. La demografía histórica de *C. falciformis* examinada a través de análisis de neutralidad, distribuciones de comparaciones pareadas y aproximación Bayesiana mostró una señal de expansión poblacional ocurrida hace aproximadamente 12,000-40,000 años. En conjunto los resultados tanto de las estimaciones de flujo genético histórico como de demografía histórica, mostraron que las poblaciones de *C. falciformis* se originaron en el Pacífico Occidental y se dispersaron hacia la región oriental utilizando la cadena de islas del Pacífico central como piedras de paso. Con base en los resultados, se sugiere evaluar a *C. falciformis* como dos poblaciones habitando en el Océano Pacífico, en los planes de manejo y conservación de la especie.

## ABSTRACT

The silky shark *Carcharhinus falciformis* is found throughout the world's warm oceans and is often targeted by commercial fisheries. The analysis of a 732 bp fragment of the mitochondrial DNA control region and four microsatellite loci, was used to assess the levels of genetic diversity among populations, the population genetic structure and phylogeography of 363 silky sharks was assessed to determine genetic divergence and connectivity extent throughout the Pacific Ocean. There were detected 14 haplotypes with a mean haplotype ( $0.48 \pm 0.03$ ) and nucleotide diversity ( $0.0009 \pm 0.00008$ ) being lower than in other shark species. The low genetic diversity observed with the control region was not coincident with the observed in the microsatellites ( $H_o = 0.65$ ), possibly as resulted of a recent colonization event of eastern Pacific populations. Therefore genetic structure pattern observed with AMOVA analyses in both markers indicated different histories. Whereas the control region showed a slight but significant difference signal between West and East region occurring approximately 170,161 years ago, no differences were observed for any comparisons between the groups tested with microsatellites. However, microsatellite data showed a weak but significant signal of population divergence from pairwise  $F_{ST}$  comparisons between the Western and Eastern Pacific regions, supporting the genetic differences observed with the control region. Nevertheless, the number of microsatellite loci used was low, which may prevent to detect a clear signal of divergence and to resolve with certainty the silky shark pattern of genetic structure in the Pacific Ocean. The three most common haplotypes were observed through the Pacific Ocean suggesting historical gene flow between Eastern and Western regions. Also, the results of recent migration estimated with microsatellite loci showed a pattern of gene flow from West to East. The population history of *C. falciformis* examined using neutrality tests, mismatch distributions and coalescence analyses based on Bayesian approximations, showed a population expansion signal occurred approximately 12,000-40,000 years ago. These results in combination with gene flow estimates and historical demography showed that *C. falciformis* populations were originated in the Western Pacific and dispersed to the Eastern region using the islands in the central Pacific as stepping stones. Based on our results and on the population exploitation levels, we suggest the implementation of a two-stock management strategy to sustain the long-term use of this resource.

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1. Biología de <i>Carcharhinus falciformis</i> .....	4
2.2. Estudios de genética de poblaciones y filogeografía en tiburones.....	6
2.3. Estudios de genética de poblaciones y filogeografía en <i>C. falciformis</i> .....	10
2.4. Área de estudio.....	11
3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	13
4. HIPÓTESIS.....	13
5. OBJETIVOS.....	14
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
6.1. Toma de muestras y análisis de laboratorio.....	15
6.2. Extracción y amplificación del ADN.....	15
6.2.1. Región control del ADNmt.....	15
6.2.2. Microsatélites.....	17
6.2.2.1. Amplificación cruzada de iniciadores microsatélites.....	17
6.2.2.2. Diseño de iniciadores microsatélites <i>de novo</i> para <i>C. falciformis</i> .....	19
6.3. Análisis de datos.....	20
6.3.1. Región control del ADNmt.....	20
6.3.1.1. Diversidad genética.....	21
6.3.1.2. Análisis de filogenia.....	22
6.3.1.3. Estructura poblacional.....	23
6.3.1.4. Filogeografía y demografía histórica.....	25
6.3.2. Microsatélites.....	27
6.3.2.1. Genotipificación y calidad de los datos de loci microsatélite.....	27
6.3.2.2. Diversidad genética.....	28
6.3.2.3 Estructura poblacional.....	29
7. RESULTADOS.....	30
7.1. Región control del ADNmt.....	30
7.1.1. Diversidad genética.....	30
7.1.2 Análisis de filogenia.....	31
7.1.3 Estructura poblacional.....	32
7.1.4. Filogeografía y demografía histórica.....	32

7.2. Microsatélites .....	34
7.2.1. Genotipificación y calidad de los datos de loci microsatélite .....	34
7.2.2. Diversidad genética.....	34
7.2.3. Estructura poblacional .....	35
8. DISCUSIÓN .....	37
8.1. Diversidad genética.....	37
8.2. Estructura poblacional .....	39
8.3. Filogeografía y demografía histórica .....	44
8.2. Implicaciones para el manejo pesquero y conservación de <i>Carcharhinus falciformis</i> .....	45
9. CONCLUSIONES.....	47
10. LITERATURA CITADA .....	48
11. TABLAS Y FIGURAS.....	62



## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Parámetros de la historia de vida reportados para <i>C. falciformis</i> en el Océano Pacífico.	62
<b>Tabla 2.</b> Número de muestras colectadas por año y por sitio de muestreo de <i>C. falciformis</i> .	63
<b>Tabla 3.</b> Iniciadores internos diseñados para la amplificación de un fragmento de la región control del mtADN en <i>C. falciformis</i> .	63
<b>Tabla 4.</b> Iniciadores de <i>C. limbatus</i> y <i>C. plumbeus</i> que fueron utilizados para la amplificación cruzada de microsatélites en <i>C. falciformis</i> y rangos alélicos esperados.	64
<b>Tabla 5.</b> Condiciones óptimas de amplificación cruzada de loci microsatélites en <i>C. falciformis</i> .	64
<b>Tabla 6.</b> Iniciadores para la amplificación de 25 loci de microsatélites específicos para <i>C. falciformis</i> .	65
<b>Tabla 7.</b> Sitios polimórficos y posición de los mismos en los haplotipos encontrados de <i>C. falciformis</i> .	66
<b>Tabla 8.</b> Diversidad genética del fragmento de la región control del ADNmt analizado en <i>C. falciformis</i> por sitio de muestreo.	67
<b>Tabla 9.</b> Número y frecuencia relativa de haplotipos por sitio de muestreo.	68
<b>Tabla 10.</b> Estimaciones de diferenciación genética de $F_{ST}$ para la región control (debajo de la diagonal) y para microsatélites (arriba de la diagonal) entre pares de localidades.	69
<b>Tabla 11.</b> Análisis espacial de varianza molecular (SAMOVA) de estructura genética poblacional para la región control y loci microsatélites.	70
<b>Tabla 12.</b> Análisis jerárquico de varianza molecular (AMOVA) de la región control del ADNmt y los microsatélites.	71
<b>Tabla 13.</b> Parámetros de demografía histórica por región para <i>C. falciformis</i> .	72
<b>Tabla 14.</b> Comparación del desequilibrio de ligamiento gamético por pares de loci microsatélite en <i>C. falciformis</i> .	72
<b>Tabla 15.</b> Valores de probabilidad resultantes de la prueba exacta de equilibrio Hardy-Weinberg y de exceso/déficit de heterocigotos, por locus y por localidad.	73
<b>Tabla 16.</b> Índices de diversidad genética estimada mediante cuatro loci de microsatélites en <i>C. falciformis</i> .	74
<b>Tabla 17.</b> Tasas de migración reciente entre pares de localidades.	75
<b>Tabla 18.</b> Diversidad genética reportada para otras especies de tiburones.	76

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Tiburón piloto <i>Carcharhinus falciformis</i> .....	77
<b>Figura 2.</b> Área geográfica de distribución potencial del tiburón piloto <i>C. falciformis</i> .....	77
<b>Figura 3.</b> Sistema de corrientes en el Océano Pacífico. ....	78
<b>Figura 4.</b> Localización geográfica de los sitios de muestreo.....	79
<b>Figura 5.</b> Imagen que muestra la extracción de ADN de la muestra con mayor calidad y concentración, así como su digestión y ligación exitosa del ADNg de <i>C. falciformis</i> .....	80
<b>Figura 6.</b> Gel de agarosa mostrando inserto con motivo GT de distinto tamaño indicando bandas con distintos tamaños de inserto.....	80
<b>Figura 7.</b> Gel de agarosa mostrando PCR de barrido para comprobar la presencia de loci microsatélites.....	81
<b>Figura 8.</b> Eletroferograma parcial de una secuencia de la región control en <i>C. falciformis</i> .....	81
<b>Figura 9.</b> Filogenia de los haplotipos de la región control de <i>C. falciformis</i> obtenido a través de (a) máxima parsimonia y (b) aproximación bayesiana.....	82
<b>Figura 10.</b> Gráfica que muestra el logaritmo natural de la distancia geográfica contra la distancia genética calculada a partir de los valores de $F_{ST}$ linearizados para a) la región control y b) loci microsatélites en un gradiente longitudinal y c) la región control y d) loci microsatélites comparando entre el norte y sur del océano Pacífico Oriental. ....	83
<b>Figura 11.</b> Red de haplotipos de <i>C. falciformis</i> .....	84
<b>Figura 12.</b> Distribución de frecuencia del número de diferencias entre pares de secuencias (mismatches) de <i>C. falciformis</i> por regiones.....	85
<b>Figura 13.</b> Probabilidad posterior del tiempo de divergencia (a) entre las regiones del Pacífico Oriental y Zona Oceánica, y (b) entre la Zona Oceánica y el Pacífico Occidental. ....	86
<b>Figura 14.</b> Probabilidad posterior (a) del tamaño efectivo de población por región y flujo génico entre par de regiones y (b) en ambas direcciones.....	87
<b>Figura 15.</b> Perfil demográfico bayesiano del tamaño efectivo poblacional por región.....	88
<b>Figura 16.</b> Análisis factorial de correspondencia de <i>C. falciformis</i> .....	89
<b>Figura 17.</b> Análisis de componentes principales de <i>C. falciformis</i> .....	89
<b>Figura 18.</b> Gráfica de la estructura poblacional obtenida con Distruct.....	90
<b>Figura 19.</b> Número de grupos genéticamente homogéneos a partir de la tasa de cambio de la función de verosimilitud o $\Delta K$ .....	90

## 1. INTRODUCCIÓN

Los procesos de estructuración de la diversidad genética a través del rango de distribución de las especies son complejos. El papel relativo de los diferentes factores que moldean el patrón de estructura genética varía para cada especie y es resultado de una amalgama de procesos históricos y contemporáneos, intrínsecos (biológicos/ecológicos) y extrínsecos (físicos/ambientales)(Kelly y Palumbi, 2010). En particular las poblaciones pueden variar en conectividad en paisajes heterogéneos o fragmentados, o estar influida por historias biogeográficas espacialmente diversas que determinan la variación genética actual (Excoffier et al., 2009). Para entender la influencia de estos factores, primero hay que ser capaz de describir y cuantificar la cantidad de variación genética en una población y el patrón de variación genética entre poblaciones (Hedrick, 2012), ya que posteriormente puede ser utilizada para reconstruir la historia evolutiva, examinar la situación contemporánea e implementar estrategias de gestión (Hedrick y Hurt, 2012).

En general, en el ambiente marino se ha reportado un bajo grado de diferenciación genética entre poblaciones de varias especies de peces (Florin y Höglund, 2007; Cano et al., 2008 y las referencias ahí citadas; Côté et al., 2013) y las excepciones han sido asociadas con comportamiento sedentario, distribución disjunta o filopatría (Palumbi, 1994). El bajo grado de diferenciación de peces marinos puede ser resultado de varios factores tales como altos niveles de flujo genético, tamaños de población grandes y/o polimorfismo ancestral atribuido a divergencia reciente de las poblaciones (Cano et al., 2008).

Uno de los componentes principales de la estructura poblacional es el flujo genético, ya que determina hasta qué punto cada población local de una especie es una unidad evolutiva independiente (Slatkin, 1994). El flujo génico homogeniza las poblaciones de una especie (Futuyama, 2009), por lo tanto si existe una gran cantidad de flujo génico entre poblaciones locales, entonces todas ellas evolucionan juntas, pero si hay poco flujo génico, cada población evoluciona en forma casi independiente (Slatkin, 1995).

Los perfiles genéticos individuales y la estructura genética de la población llevan firmas demográficas por que las características de la historia de vida y cambios demográficos de las poblaciones afecta la diversidad genética cuantificablemente (Wakeley, 2005), por lo tanto entender y predecir cómo cambia el tamaño de la población con el tiempo es clave ya que el patrón de variación geográfica de la población se verá influido por los cambios tanto históricos como contemporáneos del

tamaño de la población y el flujo de genes (Vucetich y Waite, 2003; Eckert et al., 2008). Una herramienta comúnmente utilizada para esclarecer patrones históricos y evolutivos entre poblaciones de una misma especie es la filogeografía, (Vázquez-Domínguez et al., 2009), que trata de interpretar el modo y la extensión en que los procesos históricos en la demografía pudieron dejar marcas evolutivas en la distribución geográfica actual de los caracteres genéticos (Avice, 2009; Domínguez-Domínguez y Vázquez-Domínguez, 2009).

La estructura genética en tiburones ha sido caracterizada desde inexistente (por ejemplo (Schrey y Heist, 2003; Castro et al., 2007), hasta estar bien definida a escalas geográficas finas (por ejemplo (Keeney y Heist, 2006; Jorgensen et al., 2010). Tentativamente, parece que la fuerte partición genética entre regiones puede estar asociada con especies costeras o demersales con baja capacidad de dispersión (Lewallen et al., 2007; Ahonen et al., 2009; Dudgeon et al., 2009), filopatría (Keeney y Heist, 2006; DiBattista et al., 2008; Portnoy et al., 2010; Gubili et al., 2011; Karl et al., 2011) o factores ambientales (Chabot y Allen, 2009; Veríssimo et al., 2010). En cambio, para algunas especies oceánicas no se han detectado niveles de diferenciación intraoceánica (Hoelzel et al., 2006; Castro et al., 2007; Schmidt et al., 2009), lo cual pudiera significar que las extensiones oceánicas no son una barrera que limite el flujo genético (Benavides et al., 2011).

El tiburón piloto, *Carcharhinus falciformis* es una especie pelágico-costera capturada con frecuencia tanto como especie objetivo y como captura incidental. De acuerdo con la UICN, mundialmente el tiburón piloto mantiene un estatus de especie casi amenazada y puede cumplir los criterios de una especie vulnerable en el centro-este y el Pacífico Sur-Oriental (Bonfil, 2008).

Se desconoce si existen poblaciones discretas del tiburón piloto a lo largo de su área de distribución dentro del Océano Pacífico. Sin embargo, se han observado diferencias en aspectos reproductivos y de edad y crecimiento entre las regiones oriental y occidental del Océano Pacífico (Joung et al., 2008) y aún dentro de la misma región. Estas observaciones, junto con los datos que indican los movimientos limitados de individuos marcados en el Pacífico Oriental (Kohin et al., 2006), sugieren la existencia de algún tipo de diferenciación genética en las poblaciones que parece corresponder a un gradiente longitudinal en el Océano Pacífico. Recientemente Galván-Tirado et al., (2013) publicaron el análisis del ADN mitocondrial incluida en este estudio, no obstante antes de este estudio la única información genética disponible es el trabajo de Castillo-Olguín, (2005) realizado únicamente para la costa mexicana del Pacífico.

Por tanto, dado que el tiburón piloto es una de las especies más explotadas y abundantes en el Océano Pacífico, resulta importante generar información que permita definir unidades de manejo, a

partir de la existencia de poblaciones distintas entre zonas geográficas donde es capturado. Para el presente trabajo se analizaron muestras del Océano Pacífico, con la finalidad de determinar la estructura genética y conocer si presenta algún patrón filogeográfico utilizando dos marcadores, la región control del ADNmt y cuatro loci microsatélites, que ayuden a establecer estrategias adecuadas dirigidas a la conservación de *C. falciformis*, permitiendo que cada población sea administrada de acuerdo con sus características específicas.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Biología de *Carcharhinus falciformis*

*Carcharhinus falciformis* (el nombre común en español es tiburón piloto, sedoso o aleta de cartón; silky shark en inglés y requin soyeux en francés) (Fig. 1), pertenece a la familia Carcharhinidae; es una de las más importantes por su gran diversidad de especies y presentan amplia distribución geográfica en aguas tropicales y templadas (Fig. 2). Siendo en aguas tropicales la familia dominante, tanto por la abundancia de sus poblaciones como por la amplia diversidad de especies que presenta.

A escala mundial se conoce parte de la biología de *C. falciformis*, debido a su frecuente presencia en las capturas de atunes, picudos y otras especies (Bane, 1966; Stevens, 1984; Bonfil et al., 1993). En el Océano Pacífico Central y Oriental, esta especie se encuentra en las Islas Carolinas, Hawaii, Phoenix y Line, extendiéndose a las Islas Cocos, Revillagigedo, Clipperton y Malpelo (Compagno, 1984). Recientemente, Oshitani et al., (2003), registraron a *Carcharhinus falciformis* a lo largo del Océano Pacífico Central. En la costa Oriental del Océano Pacífico, se encuentra desde la Península de Baja California hasta Perú (Compagno, 1984). En el Océano Pacífico Occidental ocurre en Tailandia, Filipinas, Nueva Caledonia, Nueva Zelanda, China y Taiwán. También en las islas Carolina y la línea de Islas hacia el este.

Se alimenta principalmente de peces, tanto pelágicos como costeros, así como de calamares y cangrejos pelágicos (Compagno, 1984). Bane, (1966) reportó que este tiburón se asocia y se alimenta de los atunes aleta amarilla (*Thunnus albacares*) y barriletes (*Katsuwonus pelamis*), comiendo también calamares y pulpos pelágicos.

Es una especie con tipo de reproducción vivípara placentar, y el número de embriones por camada varía entre las diferentes áreas geográficas que incluyen su distribución. En aguas del Banco de Campeche se reportó que las hembras tienen de 10 a 12 crías por camada, con una longitud al nacer de 76 cm LT (Bonfil et al., 1993). En el Océano Pacífico Oriental es generalmente de 2 a 14 (Fisher et al., 1995), aunque se han registrado de 1 a 16 (Oshitani et al., 2003). En aguas del Golfo de California se han registrado de 1 a 12 embriones por camada, los cuales miden al nacer entre 70 y 87 cm LT .

Estudios realizados en aguas del Golfo de México, muestran que esta especie tiene un periodo de gestación de 12 meses y las crías nacen cada 2 años (Branstetter, 1987; Bonfil et al., 1993). Asimismo, estos autores sugieren que la época de nacimientos es a principios de verano a una talla de 76 cm LT. La talla de madurez del tiburón piloto se ha estimado a los 193–200 cm LT (6–7 años) para

hembras y 186 cm LT (>4 años) para machos en el océano Pacífico Central (Oshitani et al., 2003), de 238–250 cm LT para hembras y 214 cm LT para machos en el Pacífico Sur (Stevens, 1984), de 210–220 cm LT (9.2–10.2 años), de 212.5 cm LT (9.3 años) para machos en el Océano Pacífico Occidental (Joung et al., 2008). Estas variaciones en la talla de madurez han sido relacionadas con un gradiente latitudinal (Tabla 1).

También se especula que estas diferencias se podrían deber a la falta de un ciclo reproductivo definido para ésta especie, es decir, que puede aparearse y dar nacimiento a las crías a lo largo del año, sin embargo, los estudios realizados en la especie no permite determinar si los grupos pertenecen a una misma población o varias poblaciones y el grado de flujo genético que exista entre ellas.

Los movimientos de ésta especie también son poco conocidos. Los individuos parecen moverse desde el ecuador hacia latitudes ligeramente más altas durante el verano en el Océano Pacífico Oriental (Strasburg, 1958) y este patrón de migración podría ocurrir en otras regiones a través del Océano Pacífico (Bonfil, 2008).

Algunos estudios sugieren que los recién nacidos tienen preferencias demersales y, junto con algunos de los primeros juveniles, ocupan áreas de crianza en aguas de la plataforma continental (Branstetter, 1987; Bonfil, 1997). Algunos juveniles se unen a los subadultos y adultos en los hábitats más oceánicos sobre el talud continental (Bonfil, 2008).

Por otra parte, esta especie está asociada con objetos flotantes naturales y los dispositivos agregadores de peces, que promueven la distribución a través de las zonas oceánicas (Watson et al., 2009). Sin embargo, no se sabe hasta qué punto estos movimientos se traducen en flujo genético eficaz entre las poblaciones. Estudios de marcado previos indican que los tiburones piloto se mueven en un amplio intervalo, aunque no se han reportado movimientos transoceánicos (movimientos a través de la misma cuenca) (Mejuto et al., 2005; Kohin et al., 2006).

La pesca de tiburón piloto se realiza en toda su zona de distribución y para su captura generalmente se emplean palangres de superficie, redes fijas de fondo y en algunos lugares también redes de enmalle de superficie (Compagno, 1984). Es una especie incidental capturada con red de cerco en el Océano Pacífico Oriental y representa el 25% de todos los tiburones capturados (Au, 1991); además, comprende del 2 al 30% de los tiburones capturados en las pesquerías de palangre en el Océano Pacífico (Matsunaga y Nakano, 1996).

Es uno de los tiburones más abundantes en las capturas de la pesquería artesanal, por lo que se considera como una especie objetivo por esa pesquería y es explotado de manera comercial tanto a nivel nacional como internacional (Bonfil, 1990). Su carne se vende fresca o seca-salada dentro de la

categoría “primera especial”, constituyendo parte importante en la dieta de diversos grupos de asentamientos humanos (Compagno, 1984; Bonfil, 1990).

Hay algunas pesquerías costeras multiespecíficas intensivas de tiburones que capturan grandes cantidades de ésta especie, principalmente en la costa del Pacífico de América Central y el Océano Índico (Bonfil y Abdallah, 2004; Bonfil, 2008). El tiburón piloto es también uno de los tiburones más comunes en la captura incidental de la pesquería de palangre del atún tropical y de la pesca de cerco en todo el Océano Pacífico (Román-Verdesoto y Orozco-Zöller, 2005; Watson et al., 2008).

Desde 2009 la Comisión Interamericana del Atún Tropical (CIAT) y la Comisión de Pesca del Océano Pacífico Central y Occidental (WCPFC, por sus siglas en inglés) han trabajado para acumular, procesar y analizar los datos del tiburón piloto. Se intentó una evaluación de la población cubriendo el periodo 1993-2010, con base en la información acumulada para este periodo; sin embargo, el conocimiento incompleto de la captura total en el OPO ha sido un problema. Aunque una evaluación formal del tiburón piloto no se ha podido completar, la información disponible ha sido suficiente para formar la base de las recomendaciones de ordenación precautorias de esta especie en el OPO (WCPFC, 2012; IATTC, 2013).

## **2.2. Estudios de genética de poblaciones y filogeografía en tiburones**

En los últimos años la descripción de estructura genética poblacional y de los patrones filogeográficos a escalas tanto regionales como globales, usando marcadores mitocondriales y nucleares, han ampliado la comprensión de los procesos históricos y contemporáneos que han influenciado los patrones de distribución de los tiburones. Los marcadores moleculares que han presentado mayor utilidad en éstos estudios han sido la región control y los microsatélites.

Los marcadores moleculares como la región control del ADN mitocondrial (ADNmt), así como marcadores altamente variables como los microsatélites, han sido una herramienta utilizada exitosamente para estimar niveles de diversidad genética y divergencia entre diferentes poblaciones de peces y tiburones (Heist et al., 1995; Haig, 1998). No obstante la utilidad que han mostrado estos marcadores en estudios de la estructura genética poblacional en especies de tiburones, varios estudios demuestran que es importante utilizar diferentes tipos de marcadores moleculares, ya que éstos pueden ser influenciados por distintos factores y/o diferentes grados de los mismos factores (como tipo de herencia y la tasa de sustitución nucleotídica), y por lo tanto emiten información distinta



(Charlesworth, 1998), lo que permite reconstruir la historia evolutiva de las especies con mayor precisión al complementar la información genética poblacional.

La región control forma parte del ADN mitocondrial (ADNmt) el cual se transmite por vía materna. Ésta característica es importante ya que proporciona una perspectiva sobre la conducta reproductora de las hembras (Bowen y Avise, 1995) y representa tan solo un cuarto del tamaño efectivo poblacional, por lo que se pueden detectar cambios en la demografía de una forma más sensible. Además al tratarse de una región no codificante es la que presenta una mayor variabilidad genética, lo que la convierte en una herramienta útil a la hora de resolver la estructura genética a nivel intraespecífico y en estudios filogeográficos (Lanteriy y Confalonieri, 2003).

Por su parte, los microsatélites o "short-sequence repeat tandem" (SSRT) son segmentos cortos de ADN de 1 a 6 pb, los cuales se repiten en tándem y de forma aleatoria en el genoma de los seres vivos (Litt and Luty, 1989; Hedrick and Miller, 1992; Zane et al., 2002). El elevado polimorfismo que presentan estos marcadores y la posibilidad de poder detectar ambos alelos, los hace útiles para identificaciones individuales, ya que es poco probable que dos individuos elegidos al azar, si son analizados para una serie de marcadores, compartan todos sus alelos (Aranguren *et al.*, 2005). Esto permite estimar los niveles de variabilidad genética dentro de las poblaciones y analizar las relaciones genéticas existentes entre las mismas, así como hacer estimaciones del tamaño efectivo poblacional y flujo genético ya que tienen el poder para lograr distinguir altas tasas de migración de la panmixia (Meekan et al., 2006; Selkoe y Toonen, 2006).

Una de las aplicaciones más amplias de los estudios filogeográficos y de genética de poblaciones ha sido determinar el grado de la estructura poblacional de las especies a lo largo de su área de distribución, así como reconocer grupos intraespecíficos (subespecies, poblaciones, etc.), estimar tiempos de divergencia y establecer las causas de la diversificación y distribución geográfica (Avise, 2000). También ayuda a detectar ciertas características del comportamiento de la especie, como filopatría al sitio natal o fidelidad al grupo social, ya que estos factores pueden determinar que la estructura poblacional sea fuerte, a pesar de la gran capacidad de dispersión. Otro tipo de factores que pudieran afectar la variación genética existente están relacionados con aspectos históricos como reducciones drásticas del tamaño poblacional o cuellos de botella (Rogers y Harpending, 1992), que pueden generar algunos patrones en los parámetros poblacionales factibles de ser modelados.

Debido a que los elasmobranchios presentan historias de vida diferentes a aquellas de los peces teleósteos (fertilización interna, sin fase larval pelágica, tamaño de la población reducida, crecimiento lento, tiempo generacional largo y alto potencial filopátrico) se espera que la diferenciación genética

poblacional ocurra a una escala espacial pequeña y estar influenciada por el comportamiento de las especies más que por barreras geográficas (Ovenden et al., 2009). Dentro de los estudios realizados con diversos marcadores moleculares se han observado principalmente tres procesos responsables de los patrones de diferenciación genética espacial de este grupo de organismos.

1. **Filopatría.** En algunas especies de tiburones como *Negaprion brevirostris*, *Carcharodon carcharias*, *Sphyrna lewini*, *Carcharhinus limbatus*, *C. plumbeus* y *C. leucas* se han reportado diferencias significativas entre poblaciones dentro de la misma cuenca oceánica, dada principalmente por comportamientos intrínsecos de las especies como filopatría.

Feldheim et al. (2001) utilizaron microsatélites de *Negaprion brevirostris* en el Atlántico Oeste, mostrando por primera vez la utilidad de estos marcadores para el estudio de la estructura genética de las poblaciones y los sistemas de apareamiento en condriocitos. Los resultados de este estudio y de estudios posteriores mostraron que esta especie presenta poca estructura genética, mientras que las hembras reproductivas muestran alta filopatría al área de nacimiento y una alta poliandria en las camadas (Feldheim et al., 2002, 2004; DiBattista et al., 2008).

En el tiburón blanco, *Carcharodon carcharias* se ha detectado una fuerte estructura genética entre Sudáfrica, el Atlántico y el Indo-Pacífico con la región control (Jorgensen et al., 2010; Gubili et al., 2011), pero Pardini et al. (2001) no encontraron evidencia de subdivisión genética con cinco loci microsatélites, proponiendo comportamiento filopátrico en hembras para explicar las discrepancias entre los dos marcadores.

Un estudio global del tiburón matillo, *Sphyrna lewini* basado en la región control mostró evidencia de tres linajes divergentes: uno entre África sureste y el Indo-Pacífico oeste y dos linajes del Pacífico Oriental y el Índico y el otro en el océano Atlántico y el Pacífico Oriental (Duncan et al. 2006).

La estructura genética y filogeografía a una escala global fue investigada con la región control y microsatélites, para el tiburón puntas negras *Carcharhinus limbatus* y el tiburón marrón *C. plumbeus*, ambas especies costeras. Estos estudios revelaron relaciones espaciales y temporales complejas entre poblaciones que sugieren filopatría por parte de las hembras inferidas con la región control, contrastando con una estructura genética en los microsatélites que sugiere flujo génico mediado por los machos (Keeney et al., 2003, 2005; Keeney y Heist, 2006; Portnoy et al., 2010).

Karl et al., (2011) utilizaron la región control y cinco loci microsatélites para investigar la estructura genética del tiburón toro *Carcharhinus leucas*. Los análisis indicaron estructura genética

significativa con la región control entre la región sur y norte del océano Atlántico. Sin embargo, los datos microsatélites no confirmaron esta estructura.

2. **Factores oceanográficos.** Otros autores observaron estructura poblacional debida a factores oceanográficos como la temperatura del agua, creando barreras termales al flujo genético como ha sido para las poblaciones de *Squalus acanthias* y *Galeorhinus galeus*.

Estudios moleculares mostraron fuerte divergencia para el tiburón *Squalus acanthias*, para tres regiones diferentes del ADNmt (región control; citocromo oxidasa I y el gen ND2) y ocho loci microsatélites, formando dos grupos genéticamente distintos: uno exclusivo del Pacífico Norte y otro incluyendo organismos del Pacífico Sur y el Atlántico. Las diferencias en la historia de vida y diversidad genética en *S. acanthias* son consistentes con la existencia de una barrera al flujo genético dada por las aguas cálidas y tropicales de las latitudes bajas (Veríssimo et al., 2010).

En un estudio global del tiburón musola, *Galeorhinus galeus*, se observó una subdivisión genética con la región control del ADNmt a través del océano Índico, sugiriendo que las aguas cálidas de esta cuenca restringen la dispersión de especies con distribución en aguas templadas, ilustrando la importancia de la corriente ecuatorial cálida como una barrera termal a la dispersión dentro de los océanos (Chabot y Allen, 2009).

3. **Capacidad de dispersión.** Algunas especies de tiburones, especialmente demersales y que presentan escasa vagilidad, han mostrado estructura genética basada en análisis de aislamiento por distancia como por ejemplo en *Squatina californica*, *Triakis semifasciata*, *Stegostoma fasciatum* y *Carcharias taurus*.

La escala más pequeña sobre la que se ha observado estructura genética poblacional ha sido para el tiburón angelito, *Squatina californica*. En un estudio utilizando aloenzimas se observó diferenciación significativa entre las islas de Canal de California, separadas por una distancia <100 km, consistente con la baja vagilidad de esta especie (Gaida, 1997).

Lewallen et al., (2007) analizaron la estructura genética de *Triakis semifasciata* a través de ADNmt y microsatélites. La región control del ADNmt reveló niveles de variación genética relativamente bajos, en contraste los microsatélites fueron altamente polimórficos, los cuales mostraron un patrón de aislamiento por distancia estadísticamente significativa a través del rango de distribución de la especie.

El tiburón zebra, *Stegostoma fasciatum* mostró subdivisión genética para ND4 y 13 loci microsatélites entre el norte de Australia y el sur de Asia (Dudgeon et al., 2009).

El tiburón sarda, *Carcharias taurus* mostró diferenciación poblacional entre seis regiones geográficas con región control y seis microsatélites con baja diversidad genética dentro de las poblaciones. Hubo evidencia de aislamiento de las poblaciones del Atlántico noroeste y Brasil y Sudáfrica. Esta estructura filogeográfica es típica de especies demersales que muestran movimiento limitado o movimientos migratorios fijos (Ahonen et al., 2009).

En cambio, para organismos oceánicos como el tiburón ballena y el tiburón peregrino no se han detectado niveles de diferenciación intraoceánica, debido probablemente a los altos niveles de migración que poseen estas especies.

El tiburón peregrino, *Cetorhinus maximus* no mostró estructura genética entre océanos, con sólo seis haplotipos mitocondriales de la región control a nivel global y baja diversidad genética, sugiriendo una expansión poblacional precedido de un evento de cuello de botella o un flujo genético de amplio rango mediado por las hembras (Hoelzel et al., 2006).

El tiburón ballena, *Rhincodon typus* no mostró estructura significativa con la región control en el Golfo de California (Ramirez-Macias et al., 2007), pero se observaron ligeras diferencias entre el Atlántico y el Indo-Pacífico con la región control y microsatélites (Castro et al., 2007; Schmidt et al., 2009).

### **2.3. Estudios de genética de poblaciones y filogeografía en *C. falciformis***

Para el tiburón piloto, los estudios de genética son escasos y dirigidos principalmente a identificar por métodos genéticos varias especies de tiburones (Shivji et al., 2002; Chan et al., 2003; Clarke et al., 2006). El único estudio específico que ha abordado aspectos poblacionales y genéticos de *Carcharhinus falciformis* es el de Castillo-Olguín, (2005), quien mediante la técnica de RAPD's (Randomly Amplified Polymorphic DNA) y SSCPs en el citocromo b del ADNmt, detectó niveles significativos de variación genética entre las muestras recolectadas a lo largo del Pacífico mexicano. Observó un patrón de divergencia con RAPD's que sugiere la presencia de una estructura genética compleja, sin embargo, no fue confirmada mediante el análisis de la región del citocromo b. Por tanto, es necesario comparar mediante el empleo de marcadores moleculares de mayor resolución, muestras de diferentes zonas geográficas en centro y Sudamérica, así como de la zona oceánica para poder definir con mayor grado de precisión, la presencia de estructura genética en una escala local y/o regional de esta especie en el Océano Pacífico.

## 2.4. Área de estudio

El Océano Pacífico constituye la más larga y profunda cuenca del mundo, ocupando más de la tercera parte de la superficie terrestre. Tiene una área superficial de  $181.34 \times 10^6 \text{ Km}^2$ , un volumen de  $714.41 \times 10^6 \text{ Km}^3$  y una profundidad media de 4,188 m y máxima de 11,022 m (Kennish, 2001).

La circulación superficial del Océano Pacífico (Fig. 3) consiste de un giro en sentido de las manecillas del reloj en la zona Norte y un giro contrario en la zona Sur. En la región al Norte del Ecuador se encuentran dos corrientes transoceánicas : la corriente Ecuatorial Norte y la denominada corriente del Pacífico Norte y sus correspondientes corrientes limitantes: Kuroshio y California; mientras que en el Pacífico Sur existe un sistema de corrientes análogo con la corriente Ecuatorial Sur, la corriente de Perú y la corriente Oriental Australiana (Kennish, 2001). Otra corriente denominada corriente submarina Ecuatorial se encuentra en el Ecuador en profundidades entre 100-200 metros (Walsh et al., 2008).

En cuanto a la termoclina en el Océano Pacífico, está llega a ser hasta cuatro veces más profunda en la zona Occidental que en la Oriental (Erickson 2003) lo que confiere una importante diferencia en cuanto al escenario físico para las poblaciones ícticas en las regiones mencionadas.

California y Perú son las regiones que presentan las surgencias con los valores más altos en concentración de nutrimentos comparada con los dos sistemas de surgencias de África debido a que están localizadas en el Pacífico, en donde la circulación termohalina ha permitido el incremento de la concentración de nutrimentos en aguas profundas en relación al Atlántico (Grantham et al., 2004). Esto ha permitido que el sistema de surgencias de la costa Peruana mantenga la más grande pesquería mundial (Chavez et al., 2008). Adicionalmente, tanto en el Pacífico como en el Atlántico se crean divergencias por el viento y las corrientes ecuatoriales en extensas áreas cerca al ecuador ocasionando la surgencia conocida como Regiones de Surgencia Ecuatoriales (Lavín et al., 2006)

La temperatura superficial del mar (TSM) en el Pacífico tropical durante condiciones normales es por lo general entre  $6^\circ$  y  $8^\circ \text{ C}$  más alta en el oeste que en el este. Esta disparidad se debe al hecho de que los vientos alisios soplan generalmente hacia el oeste, en la zona ecuatorial, generando surgencias de agua fría a lo largo del ecuador y de la costa de América del Sur (Flores-Morales et al., 2009).

En el Pacífico Oriental Tropical hay una región donde la donde la TSM es más caliente que  $28,5^\circ \text{ C}$  durante todo el año. Esta zona, conocida como la piscina caliente del Pacífico Oriental, se extiende en una franja que va de  $6^\circ \text{ N}$  a  $15^\circ \text{ N}$  y desde aproximadamente  $120^\circ$  hacia el este hasta la

costa mexicana (Flores-Morales et al., 2009). En la región Occidental se encuentra la piscina del Indo-Pacífico igualmente caracterizada por persistente TSM  $>28^{\circ}$  C (Wang y Mehta, 2008).

La barrera Oriental del Pacífico, situada entre la línea de islas en el Pacífico Central y el Atolón de Clipperton en el Pacífico Oriental es considerada la barrera más ancha del mundo, separando por aproximadamente 5000 Km de agua profunda a la zona Central y Oriental del Pacífico (Grigg y Hey, 1992). Esta barrera ha constituido un gran obstáculo en el ambiente marino para la dispersión de muchos organismos al no haber islas que sirvan como piedras de paso durante la migración (Grigg y Hey, 1992) Sin embargo, hay algunas excepciones en organismos que están representados en ambos lados de la barrera, llamadas especies "transpacíficas". Lessios et al., (1998), señalan que la presencia de estas especies en ambos lados de la barrera es resultado del transporte de larvas a lo largo de la barrera facilitado por el movimiento de la cadena de islas dentro del flujo de la contracorriente ecuatorial durante finales del Pleistoceno.

En contraste, otros autores señalan que esta distribución de las especies es el relicto de distribuciones continuas presentes en el mar del Tethys y que se separaron como producto del desarrollo de la barrera. Una de estas excepciones es el erizo *Echinothrix diadema*, que presenta un alto grado de identidad genética entre las poblaciones del Pacífico Oriental y Central atribuido a flujo genético extenso y reciente a través de ésta barrera principalmente durante los eventos de El Niño (Lessios et al., 1998). En otro estudio realizado con peces se reportó a dieciocho especies genéticamente similares a lo largo de la barrera asociado a una dispersión esporádica a través de ella (Lessios y Robertson, 2006). Los autores concluyen que más que la barrera del Pacífico Oriental sea inefectiva, es más bien un filtro esporádicamente permeable.

Para algunas especies de tiburones como *N. brevirostris*, esta barrera ha actuado como una barrera oceánica impasable (Schultz et al., 2008) y una fuerte barrera al flujo genético para *S. lewini* y *T. obesus* (Duncan et al., 2006; Whitney et al., 2011).

### 3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

Como resultado de la información anterior surgen las siguientes interrogantes:

¿Cuántas poblaciones genéticamente discretas de *Carcharhinus falciformis* habitan en el Océano Pacífico y cuál es el grado de flujo genético entre ellas?

¿Qué factores han influido en el patrón diversidad geográfica actual?

¿Hasta qué punto el patrón de diversidad actual del tiburón piloto puede ser explicado por procesos demográficos históricos o contemporáneos?

### 4. HIPÓTESIS

El tiburón piloto presenta diferencias en talla y edad de primera madurez entre las regiones Oriental y Occidental del Océano Pacífico por lo que se esperaría que estas características redundaran en una diferenciación genética a nivel regional del Océano Pacífico. Aunado a ello, aunque esta especie es considerada como altamente migratoria, no se conoce el alcance de sus movimientos a través del Océano Pacífico y no se tiene registros de movimientos transoceánicos por lo que se esperaría un flujo genético restringido a través de esta cuenca y que se viera reflejado en la presencia de un patrón filogeográfico.

Se ha sugerido que el tiburón piloto se dispersó a través del Océano Pacífico utilizando la cadena de islas como piedras de paso por lo que se esperaría recobrar evidencia demográfica que indique una señal de expansión en sentido oeste- este.

## 5. OBJETIVOS

General:

- Describir la diversidad, estructura genética y evaluar la distribución filogeográfica, así como reconstruir la historia demográfica de *Carcharhinus falciformis* en el Océano Pacífico con la finalidad de evaluar si es posible la definición de stocks o unidades de manejo apropiadas para un aprovechamiento adecuado y la consecuente conservación de la especie.

Específicos:

- Caracterizar la variabilidad genética de *C. falciformis* en el OP.
- Determinar si existe una estructura genética poblacional del tiburón piloto en el OP.
- Estimar flujo genético, en caso de estructuración genética de las poblaciones.
- Elucidar la distribución filogeográfica de la diversidad genética de la especie.
- Reconstruir la historia demográfica para conocer, de ser posible, los procesos que influenciaron el patrón de distribución actual de la especie.



## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1. Toma de muestras y análisis de laboratorio

Para el presente estudio, se recolectaron 362 muestras de músculo de tiburones piloto en el Océano Pacífico provenientes de 51 lances de pesca realizados por barcos atuneros, desde 22° Latitud Norte hasta 13° Latitud Sur y entre 81° y 156° Longitud Oeste (Tabla 2). El resto de las muestras fueron obtenidas de las capturas comerciales realizadas por las pesquerías artesanales en la zona costera: 40 muestras de la costa Occidental de Baja California Sur (Punta Belcher y Punta Lobos), dos del Golfo de California (Punta Arenas), 147 del Golfo de Tehuantepec (Puerto Escondido, San Agustín y Chipehua, Oaxaca y Puerto Madero, Chiapas), 18 de Costa Rica y 40 de Manta, Ecuador (Fig. 3).

En el Océano Pacífico Occidental se tomaron ocho muestras de las costas de Nueva Caledonia y 40 de Indonesia (Tabla 2). Las muestras de músculo fueron congeladas y posteriormente preservadas en etanol al 95% o en buffer DMSO y almacenadas a temperatura ambiente para su procesamiento y análisis. De las muestras obtenidas en el Océano Pacífico Oriental se registró el sexo, la longitud total y cuando fue posible también el estado de madurez de los organismos incluyendo hembras y machos juveniles (desde 80 cm de longitud total) y maduros (hasta 210 cm de longitud total).

El análisis de las muestras se realizó tanto en el Laboratorio de Genética de organismos acuáticos del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (UNAM) como en el Laboratorio de Genética para la Conservación del CIBNOR.

### 6.2. Extracción y amplificación del ADN

#### 6.2.1. Región control del ADNmt

A partir del tejido muscular recolectado, en el Laboratorio de Genética del ICMYL se obtuvo ADN genómico siguiendo el protocolo de extracción descrito por Laird et al., (1991).

Se utilizaron los iniciadores reportados por (Stoner et al., 2003): Elasmocr15642F: 5'-TTG GCT CCC AAA GCC-3' (posición 15619–15642 relativo a la secuencia de *Squalus*), y Elasmocr16638R: 5'-CCC TCG TTTTGWG GGG TTT TTC GAG-3' (nucleótidos 16638–16661) para amplificar la región control del ADN mitocondrial de *Carcharhinus falciformis* mediante PCR.

La mezcla de reactivos para la PCR se realizó con una concentración de 1x PCR buffer (10 mM Tris-HCl 50 mM KCl, pH 8.3), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de cada dNTP, 0.1 mM de cada iniciador, 1.25 unidades de Taq platinum DNA polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA) y 0.32 µL de ADN (50-100 ng) para obtener un volumen final de 15 µL por reacción.

Se realizaron varios ensayos de PCR con diferentes diluciones de ADN (stock, 1:10 y 1:20) y diferentes temperaturas de alineamiento de los iniciadores (56 y 58°C) para conocer las condiciones óptimas de concentración y temperaturas de amplificación. Una vez amplificados los fragmentos fueron visualizados en geles de agarosa al 1%. Las condiciones de cada corrimiento fueron de 90 voltios por 40 min. Después de transcurrido el tiempo de electroforesis los geles fueron teñidos con bromuro de etidio por aproximadamente 20 min.

La concentración óptima de ADN se seleccionó con base en los productos de PCR con los que se obtuvieran bandas claras, bien definidas y con el menor barrido posible. En el caso de la región control, la dilución 1:10 y 58°C de alineamiento, fueron las condiciones de PCR con las que se lograron mejores amplificaciones.

Las condiciones de amplificación por PCR consistieron de un ciclo de desnaturalización a 94 °C por 5 min; 35 ciclos consistiendo cada uno de 60 s de desnaturalización a 94 °C, 60 s de alineamiento a 58 °C y 3 min de extensión a 68 °C; y un ciclo final de extensión por 7 min a 72 °C.

Una vez definidas las condiciones óptimas de PCR, se eligieron 5 individuos de cada localidad de colecta de la zona costera para ser amplificados en volúmenes de 50 µL y purificados mediante el kit de purificación Quiagen. Los productos purificados también fueron corridos en geles de agarosa al 1% para verificar la amplificación y posteriormente enviados a secuenciar al Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología, UNAM.

Una vez obtenidas las secuencias se verificó que fueran claras y lo más limpias posible. Sin embargo, debido a que en las secuencias se observó muchas inespecificidades, se decidió diseñar iniciadores internos. Para ello, esas secuencias se limpiaron dentro de lo posible y se alinearon. El diseño de los iniciadores se realizó con Primer3 v. 0.4.0 (Rozen y Skaletsky, 2000) y se enviaron a sintetizar al Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Se diseñaron 3 iniciadores en dirección "reverse" (Tabla 3), ya que con el iniciador ElasmCR15642F el principio de las secuencias se obtenían con buenos resultados. Dichos iniciadores fueron probados con muestras de ADN de 2 organismos a diferentes temperaturas de alineamiento (58-60°C) y tres diluciones de ADN (stock, 1:10, 1:20) para observar si había amplificación y la calidad de la misma. Se obtuvieron mejores productos de PCR a una temperatura de

alineamiento de 58°C y una dilución 1:10. Se procedió a amplificar dichas muestras en volúmenes de 50 µL y los productos obtenidos, purificados mediante columnas de purificación QIAquick (Qiagen, Valencia, CA). Los productos purificados fueron probados en geles de agarosa al 1% y enviados a secuenciar al Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología, UNAM.

Las secuencias obtenidas con los tres iniciadores fueron de buena calidad, no obstante, se eligió trabajar con el iniciador Cfac806-R, ya que se obtenían fragmentos más largos. Se probó el iniciador con el resto de las muestras y de las que se obtuvo amplificación positiva se enviaron a secuenciar a la Compañía Macrogen (<http://dna.macrogen.com/eng/>).

### **6.2.2. Microsatélites**

Debido a que el ADN extraído anteriormente se degradó y era difícil o nula la amplificación de los loci con los iniciadores microsatélites, en el Laboratorio de Genética para la Conservación del CIBNOR, se obtuvo ADN genómico siguiendo el protocolo de (Aljanabi y Martinez, 1997).

Una vez finalizada la extracción se comprobó la calidad y cantidad de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% y revelados con bromuro de etidio. Asimismo se cuantificó la concentración de ADN con un biofotómetro Eppendorf, para lo cual se diluyó 2 µL del ADN a cuantificar en 98 µL de agua mili q (MQ). Con estos datos se realizaron diluciones con el fin de obtener concentraciones homogéneas en las muestras de aproximadamente 40-50 ng/µL de ADN total para su posterior uso en la PCR.

#### **6.2.2.1. Amplificación cruzada de iniciadores microsatélites**

Los iniciadores microsatélites desarrollados para una especie, frecuentemente funcionan en especies congénicas y, algunas veces, en miembros de géneros relacionados, aunque también se han reportado casos donde falla la amplificación (Schrey y Heist, 2002, 2003; Keeney y Heist, 2003; Dudgeon et al., 2006; Ovenden et al., 2006; Portnoy et al., 2006, 2007; Daly-engel et al., 2007; Nance et al., 2009). Para el tiburón piloto se utilizaron iniciadores diseñados para una especie congénica (*C. limbatus*) para probar el potencial de amplificación dado que no han sido reportados iniciadores de especie específicos.

A partir del ADN genómico aislado, se procedió a la amplificación por PCR de las regiones conteniendo microsátélites mediante la utilización de ocho iniciadores reportados por Keeney y Heist (2003) y tres reportados por Heist y Gold (1999) (Tabla 4).

Las reacciones de PCR se hicieron en volúmenes de 10  $\mu$ L. Los fragmentos amplificados fueron separados en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 6% los cuales se corrieron en una cámara de electroforesis vertical Fisher Science, con buffer TBE 0.5x, a 1800 voltios, 100mA, 80 watts durante 1.5-2 horas, intentando mantener una temperatura entre 50 y 55°C.

La visualización de los fragmentos se realizó mediante la técnica de tinción de plata descrita por Benbouza et al. (2006). Los geles fueron escaneados con un Scanner HP, para tener registro de éstos en imágenes y se genotipificó el tamaño de los alelos con ayuda del programa Gelanalyzer (<http://www.gelanalyzer.com/>).

Para probar de una manera rápida y sencilla la amplificación y polimorfismo de los iniciadores, se realizó un ensayo de PCR para el cual se eligieron tres muestras de diferente localidad y calidad de ADN. Cada muestra fue probada con cada iniciador a tres concentraciones diferentes de  $MgCl_2$  (1.5, 2 y 2.5 mM) y un gradiente de temperatura de 56 a 66° C.

La mezcla de reactivos para la PCR se realizó con una concentración final de 1 mM de buffer, 1.5, 2 y 2.5 mM de  $MgCl_2$ , 0.8 mM  $\mu$ L de dNTP's, 0.6 mM de cada iniciador, 0.03 U/ $\mu$ L de Taq, 1  $\mu$ L de ADN y la cantidad de  $H_2O$  MQ necesaria para obtener un volumen final de 10  $\mu$ L por reacción.

Las condiciones de PCR fueron las mismas para todas las reacciones: un ciclo a 94°C durante 5 min, 35 ciclos de desnaturización a 94°C durante 1 min, alineación a 56-60° C durante 1 min y amplificación a 65°C por 3 min, más un ciclo final de extensión a 72°C durante 7 min.

Los iniciadores que resultaron monomórficos fueron descartados del estudio por ser no informativos. Los que presentaron polimorfismo fueron probados con un mayor número de muestras a la concentración de  $MgCl_2$  y temperatura de alineamiento que presentó mejor amplificación de acuerdo con los resultados del ensayo anterior.

Solamente seis de los once pares de iniciadores probados mostraron ser polimórficos (Cli-7, Cli-106, Cli-107, Cli-112, Cli-119 y Cpl-6). Se realizaron diferentes ensayos con éstos iniciadores para conocer las mejores condiciones de amplificación. Se genotipificaron tres loci (Cli106, Cli107 y Cli119) de casi la totalidad de las muestras (Tabla 5) para el análisis de datos.

### 6.2.2.2. Diseño de iniciadores microsatélites *de novo* para *C. falciformis*

Debido a que no han sido reportados iniciadores microsatélites específicos para el tiburón piloto y a que muchos de los iniciadores que estaban siendo probados por amplificación cruzada, resultaron monomórficos o difíciles de amplificar, se decidió realizar el diseño de iniciadores microsatélites específicos para *C. falciformis*, paralelo a la amplificación cruzada de loci microsatélites que mostraron polimorfismo para tener un estudio más informativo.

Se realizaron dos librerías genómicas enriquecidas con base en el protocolo reportado por Glenn y Schable,(2005), con algunas modificaciones.

El ADN genómico (ADNg) fue extraído de dos muestras distintas siguiendo el protocolo de extracción de Aljanabi y Martinez (1997). La elección de la muestra para realizar la librería genómica se hizo de acuerdo a la que presentaba mayor concentración y calidad de ADN, para posteriormente llevarla a una concentración de 100 ng/ $\mu$ L. La muestra fue digerida con la enzima Rsa I durante dos horas a 37°C (Fig. 5). Posteriormente se realizó la ligación utilizando el ligador SuperSNX a 16°C durante 16 horas.

Al producto de la ligación se hibridaron dos sondas de dinucleótidos biotinilados (CT<sub>15</sub> y GT<sub>12</sub>) mediante PCR y el producto resultante fue mezclado con 50  $\mu$ L de perlas magnéticas (Dynabeads M-280 Invitrogen). Esta mezcla fue lavada dos veces con 400  $\mu$ L de solución estándar de citrato de sodio 1x (SSC), 0.1% dodecil sulfato de sodio (SDS) y cuatro veces con SSC 2x, 0.1% SDS, dos a temperatura ambiente y dos a 53°C incubando la mezcla en un baño maría. Los fragmentos enriquecidos fueron removidos de las perlas magnéticas por desnaturalización a 95°C durante cinco minutos y precipitados con 22  $\mu$ L de acetato de sodio 3M y 444  $\mu$ L de etanol al 95%.

El ADN enriquecido fue recuperado por PCR y el producto obtenido se utilizó para la clonación con el kit TOPO TA Cloning kit (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de una hora de incubación a 37° C en medio de cultivo nutritivo SOC, las células bacterianas (*E. coli*) fueron sembradas en placas de Petri con medio LB agar sólido con 2% de ampicilina y se dejaron en incubación por 24 hrs.

Se recuperaron 92 clonas bacterianas con inserto de la sonda GT y 97 clonas con inserto CT. Las colonias bacterianas fueron amplificadas utilizando los iniciadores universales M13 (-20) para verificar que la clona tuviese un inserto y poder seleccionar fragmentos de diferente longitud (Fig. 6). Adicionalmente se realizaron PCRs de barrido para comprobar que en el inserto hubiese un microsatélite de acuerdo con la metodología propuesta por Wang et al. (2007) (Fig. 7).

Se eligieron 112 clonas de fragmentos de distinto tamaño y se enviaron a secuenciar a la Compañía Macrogen (<http://dna.macrogen.com/eng/>). Las secuencias obtenidas se revisaron para verificar la calidad y presencia de microsatélites, se eliminaron los extremos que contenían fragmentos del vector y se utilizó el programa Sputnik (<http://espressosoftware.com/sputnik/>) para identificar los motivos microsatélite. El diseño de iniciadores se realizó con el programa Primer3 v. 0.4.0 (Rozen y Skaletsky, 2000).

De las 112 secuencias obtenidas con ambas genotecas, se diseñaron 25 pares de iniciadores para amplificar loci microsatélites que comprenden veinte dinucleótidos perfectos, cuatro imperfectos y un tetranucleótido perfecto (Tabla 6).

De estos veinticinco pares de iniciadores específicos, quince resultaron monomórficos y diez polimórficos. El locus C<sub>falc11</sub> se genotipificó para la mayoría de las muestras y se utilizó, junto con tres iniciadores de amplificación cruzada, para el análisis de datos poblacionales.

### **6.3. Análisis de datos**

En algunos casos, con la finalidad de obtener tamaños de muestra razonable e incrementar el poder estadístico de los análisis, los sitios de muestreo fueron agrupados. Con base a la cercanía de los sitios y falta de heterogeneidad genética en las estimaciones pareadas de  $F_{ST}$ ; se agruparon las muestras de Punta Arenas, Punta Belcher y Punta Lobos como el área de Baja California Sur; las muestras de Puerto Escondido, San Agustín, Chipehua y Puerto Madero se agruparon como Golfo de Tehuantepec y las muestras de la zona oceánica fueron agrupadas en dos: OAB y OC-G (Tabla 2).

#### **6.3.1. Región control del ADNmt**

En total se obtuvieron 353 secuencias obtenidas con los iniciadores internos diseñados para *C. falciformis* las cuales resultaron de muy buena calidad obteniendo una amplificación parcial de la región control de 732 pb, sin sitios ambiguos ni indefinidos (Fig. 8).

Las secuencias obtenidas fueron editadas mediante el programa Chromas Pro versión 1.49 beta (Technelysium, Brisbane, Australia; <http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html>) y BioEdit versión 6.0.5 (Hall, 1999) para obtener un archivo consenso del total de las secuencias. De 370 muestras enviadas a secuenciar, las que se utilizaron para el análisis fueron 353, ya que el resto no tenían la calidad necesaria para el análisis.

Los electroferogramas derivados de las secuencias obtenidas se limpiaron y editaron para posteriormente realizar una búsqueda comparativa mediante Blast (Basic Local Alignment Search Tool), en la base de datos disponible en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) con el fin de corroborar el origen del fragmento secuenciado y verificar la confiabilidad de la secuencia y su correspondencia con la región del ADNmt analizada (Altschul et al., 1990).

Con la búsqueda en la banca genómica se observó que las secuencias obtenidas de *C. falciformis* se ubican en un solo grupo con una conformación concentrada en elasmobranquios, mostrando alineamientos más significativos con especies del género *Carcharhinus* (*C. limbatus* y *C. plumbeus*) con un índice de similitud del 92%. El fragmento parcial de la región control secuenciado para tiburón piloto comienza en la base 33 y termina en la base 765, con respecto a las secuencias completas de *C. limbatus* y *C. plumbeus* (GenBank ID: AY766141.1 y GU724583.1, respectivamente)

Una vez editadas las secuencias, se realizó un alineamiento múltiple con el programa Mega 5 (Tamura et al., 2011) con la aplicación de ClustalW (Thompson et al., 1994).

El porcentaje de las frecuencias nucleotídicas para la población total fue de 20.2% de citosina (C), 13.8% de guanina (G), 30.5 de adenina (A) y 35.5% de timina (T).

### 6.3.1.1. Diversidad genética

Se estimó el número de haplotipos diferentes, diversidad haplotípica y nucleotídica con el programa Arlequin 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010) y DnaSP v5 (Librado y Rozas, 2009).

La diversidad haplotípica ( $h$ ) es la probabilidad de que dos haplotipos seleccionados al azar sean el mismo (Nei, 1987).

$$h = 1 - \sum_{i=1}^j p_i^2$$

Donde  $j$  es el número de haplotipos diferentes y  $p$  la frecuencia de los haplotipos

La diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) es la probabilidad de que dos nucleótidos homólogos seleccionados al azar de la muestra sean diferentes (Nei, 1987).

$$\hat{\pi}_n = \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j<i} p_i p_j \hat{d}_{ij}}{L}$$

Donde  $\hat{d}_{ij}$  es el número de mutaciones por nucleótido estimadas que han ocurrido desde la divergencia de los haplotipos  $i$  y  $j$ ,  $k$  es el número de haplotipos y  $p_i$  es la frecuencia del haplotipo  $i$ .  $L$  es el número de nucleótidos en la secuencia.

### 6.3.1.2. Análisis de filogenia

El modelo evolutivo de sustitución nucleotídica al que mejor se adaptan las secuencias obtenidas de la región control, se determinó bajo tres criterios de búsqueda el criterio de información Akaike (AIC), el criterio de información Akaike “corregido” (AICc, el cual incluye cada rama del árbol como un parámetro adicional) y el criterio de información Bayesiano (BIC). mediante el programa Modeltest3.7 (Posada y Crandall, 1998) y con el programa MrModeltest 2.3 (Nylander, 2004). El modelo seleccionado fue utilizado para inferir las relaciones filogenéticas entre secuencias.

Para la reconstrucción de árboles filogenéticos se analizaron los datos a través del principio de máxima parsimonia (maximum parsimony o MP) el cual involucra la identificación de la topología con la menor longitud total del árbol, es decir, que requiere el menor número de cambios evolutivos (transformaciones en estados de carácter) para explicar las diferencias observadas entre OTUs (Kluge y Farris, 1969; Farris, 1970). Este método está implementado en Mega5 (Tamura et al., 2011). La estrategia de búsqueda se realizó mediante el método heurístico de min-mini (Nei y Kumar, 2000). Los nodos de los árboles fueron evaluados por “bootstrapping” (Felsenstein, 1985) con 1,000 replicas. Se construyó un árbol consenso con el método de la regla de la mayoría (Wilkinson, 1996).

De forma adicional, se utilizó la inferencia Bayesiana (Yang y Rannala, 1997) que utiliza la distribución de la probabilidad posterior de que un árbol sea el correcto de acuerdo a los datos observados (Huelsenbeck y Crandall, 1997), y se obtiene combinando la probabilidad a priori con la verosimilitud mediante la fórmula de Bayes. El análisis se realizó utilizando el programa MrBayes 3.1.2 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003). Las probabilidades posteriores fueron calculadas usando cuatro cadenas de Markov de 9,000,000 generaciones cada una, guardando uno de cada 100 árboles. Los primeros 1,000 árboles en cada análisis fueron descartados para evitar la inclusión de árboles fuera del



rango de valores óptimos. Para el cálculo de la probabilidad posterior del resto de los árboles se construyó un árbol consenso con el método de la regla de la mayoría (Wilkinson, 1996).

Los árboles filogenéticos fueron enraizados usando especies cercanamente relacionadas a *C. falciformis*, las cuales comparten tres sinapomorfías [suborbitales con dos cabezas divididas, membrana nictitante y accesorio terminal no espinoso en la aleta pélvica (Shirai, 1996)] pero a diferencia de ellas sólo *C. falciformis* presenta un pliegue interdorsal. Dado la disponibilidad de secuencias en la banca genómica, se empleó otras especies como grupos externos; el tiburón puntas negras, *Carcharhinus limbatus* (Keeney y Heist, 2006; GenBank ID: AY766141.1) y el tiburón baleta, *Carcharhinus amboinensis* (Tillett et al., 2012; GenBank ID: HQ393587.1).

### 6.3.1.3. Estructura poblacional

Se realizó un análisis de diferenciación genética entre localidades a partir de los valores del índice de fijación de  $F_{ST}$  pareados mediante el programa Arlequín 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010). Para este análisis, se realizó una corrección de Bonferroni para ajustar el valor crítico de significancia como resultado de pruebas múltiples (Rice, 1989).

Para investigar el número de grupos geográficamente homogéneos y máximamente diferenciados de otros se utilizó el programa SAMOVA 1.0 haciendo pruebas de 3 grupos hasta 8 grupos genéticamente diferenciados con 10,000 permutaciones cada prueba y un nivel de significancia del 95% (Dupanloup et al., 2002). El Análisis Espacial de Varianza Molecular (SAMOVA, por sus siglas en inglés) emplea datos de la frecuencia de los alelos junto con las coordenadas geográficas de los sitios de colecta para identificar grupos de poblaciones que exhiben relaciones genéticas más cercanas, maximizando la proporción de la varianza genética total entre grupos (indicado por los valores más grandes de  $F_{CT}$ ).

Se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA, por sus siglas en inglés) mediante el programa computacional Arlequín 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010). El AMOVA se utilizó para examinar la variabilidad genética en diferentes niveles jerárquicos: entre grupos ( $F_{CT}$ ), entre las poblaciones dentro de los grupos ( $F_{SC}$ ), e individuos dentro de las poblaciones ( $F_{ST}$ ). Este análisis calcula los componentes de variancia genética y en el caso de la región control un análogo a la F-estadística jerárquica, la  $\Phi_{ST}$ . La significancia estadística fue determinada vía permutaciones no paramétricas (Excoffier et al., 1992) con 10,00 permutaciones.

Para esta prueba se utilizaron varios modelos de agrupación bajo distintos criterios, con la finalidad de maximizar la varianza entre los grupos y así revelar la estructura genética contenida en los datos. Se realizaron cuatro pruebas agrupando a las localidades con base en las diferencias observadas en las comparaciones entre pares de muestras mediante  $F_{ST}$ 's. Los modelos de agrupación probados se describen a continuación:

- A) Norte-Sur. Las localidades se agruparon en dos conjuntos el del norte (BCS, GT, CR, OAB y OC-G) y el del sur (EC, NC e IN).
- B) Oriente-Occidente. Las localidades se agruparon en dos regiones geográficas: Oriente (BCS, GT, CR, EC, OAB y OC-G) y Occidente (NC e IN).
- C) Las localidades se agruparon en tres regiones geográficas: Oriente (BCS, GT, CR, EC y OAB) Centro (OC-G) y Occidente (NC e IN).
- D) Las localidades se agruparon en cuatro regiones geográfica en sentido tanto latitudinal como longitudinal: Nororiental (BCS, GT, CR y OAB) Suroriental (EC), Norcentral (OC-G) y Suroccidental (NC e IN).

Se realizó un análisis de aislamiento por distancia, el cual está basado en el hecho de que los individuos de una población tendrán mayor probabilidad de reproducirse con individuos de poblaciones cercanas que con aquellos que se encuentran en poblaciones más distantes. Como resultado de esta tendencia se puede saber si las distancias genéticas corresponden con lo esperado por la distancia geográfica que separa a las poblaciones, así discriminar si las poblaciones más cercanas geográficamente son más parecidas genéticamente y si la diferenciación entre ellas aumenta con la distancia (modelo tradicional de aislamiento por distancia o IBD por sus siglas en inglés) o si el patrón observado es independiente de la distancia y por lo tanto podemos tener, tanto poblaciones cercanas muy diferentes, como también, poblaciones lejanas con y sin diferenciación genética entre ellas (modelo de flujo a larga distancia).

Para este análisis se probaron los mismos agrupamientos utilizados en el AMOVA buscando una señal de aislamiento a distintos niveles geográficos. El análisis se llevó a cabo con el programa Arlequín 3.5. Esta prueba considera las distancias geográficas en kilómetros y los valores de  $F_{ST}$  linearizados ( $F_{ST}/(1-F_{ST})$ ). Se utilizaron 10,000 permutaciones para calcular el valor estadístico bajo la hipótesis nula de independencia entre las dos variables.

#### 6.3.1.4. Filogeografía y demografía histórica

Para la región control se determinó el análisis espacial de los linajes génicos con el programa Network 4.5.1.0 (<http://www.fluxus-engineering.com>), y la red fue construida utilizando las regiones geográficas consideradas en el análisis de AMOVA.

Para comprobar si las mutaciones de las secuencias de la región control eran selectivamente neutras (Kimura, 1983), se realizó un análisis de neutralidad por medio de dos pruebas. La prueba  $D$  de Tajima (Tajima, 1989) y la prueba  $F_s$  de Fu (Fu, 1997). Se empleó el programa Arlequín 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010) y para calcular el nivel de significancia estadística se corrió cada estimador con 10,000 réplicas.

Con el propósito de detectar si se han presentado cambios en el tamaño poblacional (demográfica o espacial) a partir de las secuencias de la región control, se empleó el programa Arlequín 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010). El análisis de la distribución *mismatch* puede aportar información sobre la historia de las poblaciones, para lo cual se construye un histograma que describe la variación en la cantidad de diferencias nucleotídicas entre pares de haplotipos de los datos observados y los valores esperados bajo la hipótesis nula de tamaño constante en la población (Rogers y Harpending, 1992). Si el tamaño de la población se ha mantenido constante, el número de diferencias por pares de haplotipos describe una distribución multimodal. En cambio, si la población ha padecido alguna perturbación, la curva descrita se asemeja a una distribución unimodal, similar a una distribución de Poisson.

El modelo de expansión demográfica asume que una población estacionaria en equilibrio pasó en  $\tau$  generaciones de un tamaño efectivo poblacional  $N_0$  a un tamaño  $N_1$  después de una reducción significativa. Los parámetros de expansión demográfica,  $\tau$  (tiempo de expansión en generaciones),  $\theta_0$  (tamaño de la población antes de la expansión) y  $\theta_1$  (tamaño de la población después de la expansión) (Harpending, 1994) se obtuvieron con Arlequín3.5. Los valores de  $\tau$  se transformaron en tiempo real en años calculados desde la expansión, a través de la ecuación  $\tau = 2\mu T$ , donde  $T$  se mide en generaciones y  $\mu$  es la tasa de mutación por generación de la secuencia completa. El parámetro del tamaño efectivo de las hembras potenciales antes de la expansión se estimó mediante la fórmula  $\theta_0 = 2\mu N_0$ , y después de la expansión con la fórmula  $\theta_1 = 2\mu N_1$ , donde  $N$  es el tamaño efectivo poblacional de hembras para una población inicial  $N_0$ , que se asume crece a un valor  $N_1$  bajo el modelo de Rogers y Harpending, (1992).

Asimismo, se obtuvieron los parámetros de la expansión espacial ( $\tau$  y  $\theta_0$ ) bajo el modelo de continente de islas, el cual supone una población subdividida en un número infinito de

subpoblaciones, cada una de tamaño  $N$ , que intercambia una fracción  $m$  de migrantes por generación con el resto de las subpoblaciones. Este modelo asume que  $M = 2Nm$ , donde  $M$  es la tasa a la cual una población que coloniza nuevas áreas, intercambia migrantes con una población de origen de tamaño infinito y  $Nm =$  es el número de migrantes por generación.

El índice de Harpending, (1994) (índice de rasgamiento o de desorden,  $Hri$ ) y la suma de las desviaciones al cuadrado (SSD) se aplicaron para determinar si la distribución mismatch observada se extrae de una población en expansión (valores pequeños) o una estacionaria (valores grandes).

El método bayesiano basado en coalescencia implementado en IMA2 (Hey y Nielsen, 2004) fue usado para estimar los parámetros del modelo "aislamiento con migración". Con este modelo es posible distinguir entre aislamiento completo con divergencia y flujo génico (Nielsen y Wakeley, 2001), y es apropiado para poblaciones recientemente divergentes que comparten haplotipos o alelos debido a flujo génico. Para éstos análisis se consideraron los resultados de los  $F_{ST}$  y del AMOVA por lo que las estimaciones se realizaron para las tres regiones del Océano Pacífico (OPO, OZ y OPOc). Para obtener el nivel de flujo génico histórico entre regiones, fueron utilizadas las estimaciones de  $M$  que representa una medida de la contribución de la inmigración sobre la mutación en originar nuevas variantes y equivale a  $m/\mu$ , donde  $m$  es la tasa de migración por generación y  $\mu$  la tasa de mutación del marcador en evaluación. A partir del valor de  $M$  se calculó  $Nm$  (número de migrantes por generación) mediante la fórmula  $Nm = \theta M$ . Estos análisis únicamente se realizaron para la región control ya que por el bajo número de loci microsatélites utilizados, no se obtuvieron buenas convergencias con las corridas de este marcador.

La convergencia en las cadenas se evaluó monitoreando las líneas de tendencia de las estimaciones y verificando que los tamaños de muestra estimados (ESS, por sus siglas en inglés) alcanzaran valores más altos a 50. Se realizaron tres corridas independientes para obtener estimaciones robustas y congruentes.

Para inferir cambios demográficos históricos en la región control se utilizó el programa BEAST (Drummond y Rambaut, 2007), para obtener un perfil demográfico bayesiano (bayesian skyline plots). La reconstrucción de los perfiles se realizó con Tracer v.1.5 (Drummond y Rambaut, 2007).

Debido a que no se ha calculado una tasa de mutación específica de la región control de *C. falciformis*, se utilizó una tasa de mutación promedio de 0.62% de divergencia en la secuencia por cada millón de años, a partir de tasas estimadas para otras especies de tiburones incluyendo una tasa de 0.8% para el tiburón martillo, *Sphyrna lewini* (Duncan et al., 2006), 0,43% para el tiburón puntas negras, *Carcharhinus limbatus* (Keeney y Heist, 2006), 0.67% para los tiburones limón, *Negaprion brevirostris* y *N.*

*acutidens* (Schultz et al., 2008) y de 0.57% para el tiburón gata, *Ginglymostoma cirratum* (Karl et al., 2012). El tiempo generacional del tiburón piloto se ha estimado en 13 años (Chen y Yuan, 2006).

### **6.3.2. Microsatélites**

#### **6.3.2.1. Genotipificación y calidad de los datos de loci microsatélite**

Se utilizó el programa Gel Analyzer de Sequentix (<http://www.sequentix.de/>) para determinar las tallas alélicas de cada individuo, las cuales fueron capturadas en una base de datos de Excel® y posteriormente ésta fue convertida a los formatos correspondientes con ayuda del programa Convert (Glaubitz, 2004) y Formatomatic 0.8.1 (Manoukis, 2007). Para minimizar la tasa de error en la amplificación y la asignación de la talla de los alelos, se amplificaron muestras por duplicado para validar la talla alélica; asimismo en cada corrida de visualización de los fragmentos se incluyeron como referencia dos blancos positivos de muestras de talla conocida. En total se generó una base de datos con 363 individuos para cuatro loci.

Con la finalidad de analizar la calidad de los datos obtenidos de loci microsatélites, se estimó la frecuencia alelos nulos por locus y localidad (Selkoe y Toonen, 2006). Un alelo nulo es un fragmento de ADN que no logró amplificarse, ya sea por problemas en la PCR o por mutaciones sitio-específicas en la región de alineamiento para los iniciadores (Dakin y Avise, 2004), lo que provoca una sobreestimación de los genotipos homocigoto por la ausencia de amplificación; si ésta condición es muy persistente la heterocigocidad será subestimada (Carlsson, 2008). Se evaluó la presencia de alelos nulos a partir del índice de Brookfield 1 (Brookfield, 1996) en el programa MicroCheker 2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004) y también con el uso del algoritmo de Maximización de la Esperanza (EM) de Dempster et al., (1977) en el programa FreeNA (Chapuis y Estoup, 2007).

Se realizó un análisis de desequilibrio de ligamiento para garantizar la distribución independiente de los alelos de distintos loci con el programa Genepop 4.1.4 (Rousset, 2008).

Para determinar el mejor índice de diferenciación genética se empleo Spagedi (Hardy y Vekemans, 2002). Generalmente, la estructura genética entre localidades se evalúa a partir de las estimaciones de los índice de fijación  $F_{ST}$ ; sin embargo, este parámetro no siempre es el más adecuado cuando se utilizan marcadores con alta variación genética como los microsatélites, recomendándose para este caso un parámetro análogo conocido con  $R_{ST}$ , desarrollado por (Slatkin, 1995), el cual a diferencia del modelo mutacional de alelos infinitos utilizado para el cálculo de  $F_{ST}$ , asume el modelo

denominado por pasos, el cual es el modelo de mutación más aceptado para éstos marcadores moleculares.

Por tal motivo, con el programa Spagedi (Hardy y Vekemans, 2002) se efectuó una prueba de permutaciones alélicas desarrollada por Hardy et al., (2003) para comparar entre  $F_{ST}$  y  $R_{ST}$  y evaluar el desempeño de cada estimador de acuerdo a los datos obtenidos en este estudio. La prueba de permutaciones alélicas compara el valor observado de  $R_{ST}$  con el valor esperado cuando las diferencias en los tamaños alélicos no contribuyen a la diferenciación genética ( $pR_{ST}$ ). Bajo la hipótesis nula, el procedimiento no debe afectar las medidas de diferenciación como  $R_{ST}$ , pero si los tamaños alélicos contribuyen a la diferenciación genética,  $pR_{ST}$  dependerá sólo de la identidad y tendrá un valor menor a  $R_{ST}$  (Hardy y Vekemans, 2002).

Esta prueba mostró que el parámetro de diferenciación genética que mejor se ajusta para los datos utilizados en este trabajo, es el usualmente utilizado  $F_{ST}$ , al respaldar la hipótesis nula de que las diferencias en el tamaño de los alelos no contribuyen a la diferencia poblacional observada, con un valor de  $R_{ST}$  (0.002) menor al valor de  $F_{ST}$  (0.017,  $P = 0.415$ ), por lo que los análisis subsiguientes se realizaron con el estadístico  $F_{ST}$ .

### **6.3.2.2. Diversidad genética**

Se estimó el número de alelos por locus, frecuencia de los alelos, heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ) y la riqueza alélica con los programas Genalex 6.41 (Peakall y Smouse, 2006) y Fstat (Goudet, 1995).

Se determinó la existencia de ajuste al equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) para cada locus y por población utilizando el programa Genepop 4.1.4 (Rousset, 2008) mediante una prueba exacta de Fisher a partir del coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) empleando el algoritmo de Cadenas de Markov consistente de 10,000 cadenas, 5,000 lotes (batches) y 1,000 iteraciones por lote. El equilibrio de HW es el modelo más simple de la genética de poblaciones y predice las proporciones genotípicas esperadas en una población genéticamente estable en la que la reproducción de los individuos se produce al azar. Cuando una población no sigue las proporciones genotípicas de HW se puede suponer que ha sufrido alguna perturbación genética en tiempos recientes. El índice de fijación es una medida del desequilibrio que puede ser debido tanto a un exceso ( $H_o > H_e$ ) como a un déficit de heterocigotos ( $H_o < H_e$ ). Para comprobar si las muestras capturadas provienen de poblaciones en situación de equilibrio se utiliza el test de probabilidades exactas (Guo y Thompson, 1992) y para

comprobar si el desequilibrio se produce por un déficit o un exceso de heterocigotos se aplica el test  $U$  (Raymond y Rousset, 1995). Todos estos cálculos están incluidos en el paquete Genepop 4.1.4 (Rousset, 2008). Se efectuó una corrección de Bonferroni para ajustar el valor crítico de significancia (Rice, 1989).

### **6.3.2.3 Estructura poblacional**

La identificación de la estructura genética poblacional con los microsatélites se analizó mediante diversas aproximaciones. En primera instancia se realizó un Análisis Factorial de Correspondencia (AFC) empleado como un estudio exploratorio para estimar el número de poblaciones o agrupaciones. Este análisis consiste en una tabla de contingencia donde se contrastan datos entre los individuos y las modalidades de las variables, las cuales están representadas por las frecuencias alélicas de las poblaciones; así pues el AFC localiza de acuerdo a su juego de características genéticas, a cada individuo en un hiperespacio, lo que permite expresar la tendencia de un elemento dado, ya sea un individuo o un alelo, que totaliza la inercia explicada por un factor y la que se representa en una nube de puntos. Dicho análisis se realizó con el paquete estadístico Genetix 4.05 (Belkhir et al., 1996).

Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) para correlacionar los genotipos y las frecuencias alélicas entre todos los individuos en todas las poblaciones. Para ello, se utilizó el programa Pagen (<http://www2.unil.ch/popgen/softwares/pcagen.htm>) el cual utiliza los datos de genotipos multilocus para investigar la correlación de las frecuencias de alelos y genotipos entre todos los individuos muestreados.

Se utilizó el programa Structure 2.3.3 (Pritchard et al., 2000; Hubisz et al., 2009) para inferir el número de poblaciones y asignar cada localidad a un grupo específico. Este programa pone en práctica un método a base de modelo de agrupamiento para deducir la estructura de población usando datos genotípicos. Sus aplicaciones incluyen la deducción de la presencia de poblaciones o clusters distintos, para asignar individuos a las poblaciones, estudiar y estimar frecuencia de alelos de la población en situaciones donde están muchos individuos mezclados. Se estimó el estadístico ad hoc de Evanno  $\Delta K$  en línea ([http://taylor0.biology.ucla.edu/struct\\_harvest/](http://taylor0.biology.ucla.edu/struct_harvest/)), el cual está basado en la tasa de cambio del logaritmo de la probabilidad de los datos entre sucesivos valores de  $K$  (Evanno et al., 2005). Este estadístico permite detectar el número de clusters a partir de la información arrojada por el programa Structure. Éstos resultados fueron graficados empleando el programa Distruct 1.1 (Rosenberg, 2003), el cual muestra a cada individuo como una línea formando parte de un segmento

que se encuentra dividido en  $K$  colores que representa la probabilidad o coeficiente de que cada individuo pertenezca al cluster que se le asignó.

Se empleó el modelo de mezcla de poblaciones con 10,000 réplicas durante el periodo de pre-simulación, mientras que los valores de probabilidad fueron calculados después de 100,000 réplicas y  $K$  tomó valores de 1 a 10 con 10 iteraciones para cada valor de  $K$ .

Se realizó un análisis de aislamiento por distancia con el programa en línea *Isolde* el cual está incorporado en el programa *Genepop* en línea (<http://genepop.curtin.edu.au/>), siguiendo los mismos criterios que se utilizaron para la región control.

Para probar si la débil estructura observada con los análisis es producto del nivel de flujo genético entre las localidades, se utilizó el programas *BayesAss* para determinar el flujo génico poblacional reciente (Wilson y Rannala, 2003). *BayesAss* estima las tasas de migración recientes  $m$  entre poblaciones a partir de datos genotípicos utilizando un marco de inferencia Bayesiana y utilizando el desequilibrio gamético en los inmigrantes y sus descendientes, además ha demostrado no ser sensible a desviaciones al equilibrio de Hardy-Weinberg.

## **7. RESULTADOS**

### **7.1. Región control del ADNmt**

#### **7.1.1. Diversidad genética**

De un total de 353 secuencias, se encontraron 14 haplotipos distintos de la región control, la diferencia entre ellos fue debida a sitios con 13 transiciones y una transversión, sin presencia de deleciones/inserciones (Tabla 7). El número de sitios polimórficos en la muestra total fue de 10, con una media en la diversidad haplotípica de 0.48 y nucleotídica de 0.0009 (Tabla 8). La zona que presentó la mayor cantidad de haplotipos distintos fue el Golfo de Tehuantepec. En general, se observaron bajos niveles de diversidad haplotípica (0.312-0.750) y nucleotídica (0.0005-0.0019) en todas las localidades. Las diversidades más bajas se observaron en BCS y las más altas en NC, debido probablemente al bajo número de muestras analizadas. En Baja California Sur y en Costa Rica únicamente se registraron los tres haplotipos más comunes.

Los haplotipos más comunes fueron el haplotipo Cf-1 con una abundancia del 70%, el haplotipo Cf-2 con el 17%. y el haplotipo Cf-3 con el 5%, mismos que estuvieron presentes en todas las localidades de muestreo (Tabla 9). Se identificaron nueve haplotipos únicos; Cf-5, Cf-6, Cf-9 y Cf-



10, los que fueron exclusivos de las localidades de muestreo ubicadas en el Pacífico Oriental, mientras que los haplotipos Cf-11 y Cf-12 se encontraron únicamente en muestras de la Zona Oceánica y los haplotipos Cf-8, Cf-13 y Cf-14 exclusivos del Pacífico Occidental. El mayor número de haplotipos por sitio fue de 9 para GT.

### 7.1.2 Análisis de filogenia

Bajo los tres criterios de búsqueda utilizados para determinar el modelo evolutivo de sustitución nucleotídica, se seleccionó el modelo HKY + I como el más apropiado para las secuencias de *C. falciformis* (Hasegawa et al., 1985). Los parámetros del modelo corresponden a una frecuencia de las bases  $\text{freqA} = 0.3029$ ,  $\text{freqC} = 0.202$ ,  $\text{freqG} = 0.1427$  y  $\text{freqT} = 0.3524$ , proporción de transiciones y transversiones (TS/TV)=7.0142 y tasas de mutación iguales.

Se hizo una comparación entre las secuencias de la región control del ADN mitocondrial de *C. falciformis* con otras especies del género *Carcharhinus* con el fin de detectar si este género presenta un patrón de mutación similar y/o regiones análogas que contengan mayor variabilidad. Se obtuvieron secuencias consenso a partir de las secuencias ya disponibles en el GenBank (*C. plumbeus*, GU724583.1, *C. limbatus*, AY766146.1; *C. amboinensis*, HQ393587 y *C. obscurus*, HQ853281). En general, los sitios de mutación se distribuyen a lo largo del fragmento de la región control. No se detectaron puntos de alta frecuencia mutacional y los sitios de mutación puntual observados en *C. falciformis* no fueron compartidos con otras especies. Por otra parte, la cantidad de sitios polimórficos en *C. falciformis* (10) fueron inferiores a los de otras especies (22-39), lo que indirectamente sugiere que esta especie podría tener una tasa de mutación más lenta de este marcador molecular en comparación con otros tiburones.

El árbol de máxima parsimonia separa dos grupos con un soporte estadístico del 100%, no obstante las ramas de cada grupo presentan bajo soporte estadístico (<52%). Uno de los grupos, es el formado por los tres haplotipos más abundantes junto con los haplotipos que se encuentran sólo en el Pacífico Oriental y la Zona Oceánica. El otro grupo incluyó a los tres haplotipos únicos de IN (Cf-8, 13 y 14) y uno de GT (Cf-10) (Fig. 9). En el árbol de inferencia bayesiana el primer grupo tiene mejor soporte (89%), sin embargo, mostró una topología con ramas cortas y múltiples relaciones entre los haplotipos sin resolver, en concordancia con un arreglo típico de haplotipos en forma de estrella.

### 7.1.3 Estructura poblacional

Se detectó evidencia de un nivel bajo de estructura genética del tiburón piloto en el área de estudio con la región control, ya que de las estimaciones de  $F_{CT}$  que resultaron significativas ( $P < 0,05$ ) para comparaciones entre algunas localidades de las regiones Occidental y Oriental, no permanecieron significativos después de la corrección de Bonferroni. Dichas estimaciones se observaron entre BCS-OAB, BCS-IN, BCS-NC y GT-IN (Tabla 10).

El análisis de SAMOVA detectó el valor más alto de  $F_{CT}$  en cuatro grupos (0.009), sin embargo las estimaciones de  $F_{CT}$  no fueron estadísticamente significativas (Tabla 11).

El análisis jerárquico de la variación molecular (AMOVA) resultó en una estimación baja pero significativa cuando se hicieron comparaciones en un gradiente longitudinal, tanto en las agrupaciones Oriente-Occidente, Oriente-Centro-Occidente y Suroriente-Suroccidente-Nororiente-Norte Centro pero no así cuando se comparó el norte con el sur. Sin embargo, la comparación que mostró la máxima varianza fue al comparar las regiones Oriente y Occidente del Pacífico ( $F_{CT} = 0,034$ ,  $P = 0,032$ ).

Mientras que la variación en las frecuencias de haplotipos atribuida a la variación entre las poblaciones dentro de los grupos no fue significativa, así como el componente de la varianza dentro de las poblaciones. En los diferentes análisis de varianza molecular, los resultados sugieren que la mayor parte de la varianza genética en los grupos probados se encontró repartida entre los individuos, con valores entre 98 % de la varianza total (Tabla 12).

Se realizaron varias pruebas de aislamiento por distancia probando los modelos realizados con el AMOVA. Sin embargo, con ninguna de las pruebas realizadas se observó una correlación estadísticamente significativa entre las distancias genéticas y las distancias geográficas con ninguno de los marcadores utilizados (Fig. 10).

### 7.1.4. Filogeografía y demografía histórica

La red de haplotipos se define por un único haplotipo dominante y ampliamente distribuido (Cf-1) que incluye a individuos de las tres regiones consideradas. Está conectado por un paso mutacional con otros haplotipos menos abundantes, dos de ellos, incluyendo también los individuos de las tres regiones (Cf-2 y Cf-3), además de otros haplotipos únicos, principalmente en el Pacífico Oriental y la zona oceánica (Fig. 11). Hay un grupo de haplotipos presumiblemente derivados del

haplotipo Cf-4 que se separan del haplotipo ancestral Cf-1 por dos o máximo tres pasos mutacionales que incluye haplotipos únicos del Pacífico Occidental (Fig. 11).

Con respecto del análisis de neutralidad, tanto el estadístico  $D$  de Tajima como la  $F_s$  de Fu dieron valores negativos en todos los sitios, aunque las probabilidades asociadas no alcanzaron significancia estadística en la mayoría de los casos, a excepción del Pacífico Oriental. Sin embargo, los valores negativos y estadísticamente significativos de la  $F_s$  de Fu en casi todos los sitios y en la muestra total ( $F_s = -6.302$ ), son consistentes con la hipótesis de expansión poblacional (Tabla 13). Los valores negativos son señal de selección natural negativa o purificante; sin embargo, pueden presentarse cuando existe migración o expansiones en el tamaño poblacional, que pueden producir un exceso de alelos raros, lo que acumularía las mutaciones en las ramas externas de una genealogía (Fu y Li, 1993).

El análisis de "mismatch" bajo la hipótesis nula de tamaño poblacional constante comparando el número de diferencias por pares y la distribución de la frecuencia de sitios segregantes (Tajima, 1989), reveló que la distribución de los valores para los datos de *C. falciformis*, se ajustan a una distribución unimodal que correspondería a un modelo de reciente expansión poblacional (Slatkin, 1994; Rogers y Harpending, 1992) (Fig. 12), con excepción del Pacífico Occidental que muestra dos modas en el número de diferencias de la distribución (1-2 y 3-5 diferencias entre los haplotipos; Fig. 12c).

Las distribuciones mismatch fueron más eficaces en apoyar el modelo de expansión espacial que el modelo de expansión demográfica para el Pacífico Occidental, mientras que el Pacífico Oriental y zona oceánica mostraron un ajuste para ambos modelos (Fig. 12a y 12b). Del mismo modo, el índice  $H_{ri}$  indica un ajuste significativo a una distribución unimodal, lo que apoya la hipótesis de expansión poblacional (Harpending, 1994).

El tiempo estimado de la expansión de *C. falciformis*, considerando una tasa mutacional de 0.62% por millón de años y un tiempo generacional de 13 años, osciló entre 19,011 a 63,203 años (Tabla 13), y sugiere que las fluctuaciones se produjeron recientemente, durante los eventos interglaciares del Pleistoceno tardío. Las estimaciones del tamaño efectivo de la población antes de la expansión ( $\theta_0 = 0-0.018$ ) fueron coincidentes con la reducción drástica del tamaño de la población seguido por una rápida expansión poblacional, evidenciado por el incremento observado en las estimaciones del tamaño efectivo de la población después de la expansión de la población ( $\theta_1 = 51.58-9999$ ), excepto en la Zona Oceánica.

En general, los resultados de IMA2 sugieren una divergencia reciente entre las poblaciones. Los valores posteriores de  $t_0$ , evaluando el tiempo de divergencia entre el OPO y la Zona Oceánica estuvo muy cercano a cero (0.15), que corresponde a un tiempo de divergencia de 2,419 años. El tiempo de divergencia  $t_1$ , entre el OPO y el OPOc fue de 1.05, que corresponde a un tiempo de separación de 170,161 años (Fig. 13).

El tamaño efectivo poblacional estimado para el OPO (4,187) fue más pequeño que para la Zona Oceánica (12,562) y el OPOc (32,103; Fig. 14a). El flujo genético, estimado como la tasa de migración por generación, fue asimétrico siendo mayor el número de migrantes del OPOc hacia el OPO y ZO que en la dirección opuesta (Fig. 14b).

El perfil demográfico bayesiano para inferir fluctuaciones en el tamaño de la población a través del tiempo mostró una tendencia constante durante los últimos 400,000 años, con incremento reciente en el tamaño de la población del OPO en los últimos 30,000-40,000 años. Similar a lo observado para el OPOc para los últimos 20,000 años (Fig. 15).

## **7.2. Microsatélites**

### **7.2.1. Genotipificación y calidad de los datos de loci microsatélite**

En la genotipificación de los diferentes loci de microsatélites no se detectó presencia de alelos nulos con ninguno de los índices utilizados (Brookfield 1 y el algoritmo de Maximización de la Esperanza) por lo que se procedió con los análisis genéticos posteriores.

Los resultados de la prueba de desequilibrio de ligamiento indicaron que no existe ligamiento entre ninguno de los loci analizados después del ajuste secuencial de Bonferroni (Rice 1989),  $P < 0083$  (Tabla 14). Por lo que la información que aporta cada locus es independiente del resto de ellos.

### **7.2.2. Diversidad genética**

Los resultados de la prueba de ajuste al equilibrio HW mostraron que en determinadas localidades algunos de los loci se encuentran fuera del equilibrio. Las localidades con desviaciones significativas después de la corrección de Bonferroni, fueron GT, EC y OC-G en el locus Cli119. La prueba para un déficit de heterocigos fueron significativas para OAB en el locus Cli106 y para OC-G en el locus Cf11 (Tabla 15).

Todos los loci fueron polimórficos con un número de alelos que va de cinco a 28. El número efectivo de alelos por locus ( $N_a$ ) varió de tres (NC) y 23 (GT) con promedio de 8.7, mientras que el

número de alelos efectivos ( $N_e$ ) varió entre 1.3 (IN) y 11.1 (GT) con promedio de 4.6. La heterocigosidad observada ( $H_o$ ) registró valores entre 0.24 (IN) y 1.0 (NC) con promedio de 0.65, en tanto que la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) se encontró entre 0.26 (IN) y 0.91 (GT) con promedio de 0.67. La riqueza alélica ( $R$ ) varió de 2.16 (IN) a 9.8 (NC) con promedio de 5.12 (Tabla 16).

En general se observaron alelos privados para dos loci en 4 localidades. Para las localidades BCS y NC se presentó un solo alelo privado; sin embargo, OAB y GT se caracterizaron por presentar dos y cuatro alelos privados, respectivamente.

### 7.2.3. Estructura poblacional

En la Figura 16, se muestra un gráfico tridimensional correspondiente al AFC, donde el total de varianza explicada fue del 77.1% compuesto por los factores 1 (48.39%), 2 (15.55%) y 3 (13.14%). Este análisis permite detectar únicamente un grupo genéticamente distinto, que corresponde a la localidad OAB. Sin embargo, este análisis exploratorio no proporciona una fuente para la definición de unidades genéticas discretas ya que para el resto de las localidades se observa una mezcla de individuos.

El análisis de componentes principales (ACP) indicó a OAB como la localidad más diferenciada pero no muestra una clara agrupación entre localidades. Sin embargo, en el primer componente se observa cierta tendencia de agrupamiento entre CR y NC que geográficamente podrían corresponder a la parte sur del Océano Pacífico y por otro lado BCS e IN, localidades más al norte y occidente del Océano Pacífico, respectivamente. Asimismo se observa a EC separada del resto de las localidades. Los dos primeros ejes del ACP representaron el 64% de la variación total, a la cual el primer componente contribuyó en un 37.09 % y el segundo en un 26.95 % (Figura 17).

El análisis de SAMOVA detectó que todas las estimaciones de  $F_{CT}$ , con excepción de  $K=2$ , fueron estadísticamente significativas, al menos al nivel 0.05. El nivel más alto de significancia ( $< 0.01$ ), se dio a una  $K=5$ , que corresponde a la diferenciación más grande entre grupos  $F_{CT} = 0.031$ . Las simulaciones mostraron que el valor más alto de  $F_{CT}$  obtenido con SAMOVA es asociado con el valor correcto de número de poblaciones (Dupanloup et al., 2002), lo cual podría sugerir que existen al menos cuatro o cinco grupos genéticamente diferenciados en las localidades de muestreo de *C. falciformis* (Tabla 11).

Los resultados de la prueba de diferenciación genética mediante el cálculo de  $F_{ST}$  por pares de localidades para los loci de microsatélites analizados, mostró la existencia de diferencias genéticas

significativas entre ellas ( $F_{ST} = 0.017$ ,  $P = 0.000$ ). Lo anterior resultó consistente con los valores de  $F_{ST}$  por pares de localidades entre OC-G-IN, GT-IN y EC-IN los cuales permanecieron significativos después de la corrección de Bonferroni (Tabla 10).

El análisis de la varianza molecular con los microsátélites mostró que las diferencias se encuentran entre las poblaciones dentro de los grupos, con valores estadísticamente significativos en todas las agrupaciones probadas ( $F_{SC} = 0.007-0-030$ ,  $P < 0.05$ ). Asimismo, el mayor porcentaje de variación se encuentra al interior de las poblaciones con valores de  $F_{ST}$  bajos (0.017) pero altamente significativo ( $P < 0.001$ ) (Tabla 12). El valor más alto de la varianza entre los grupos se encuentra en el modelo Oriente-Occidente que coincide con lo observado con la región control, aunque no fue estadísticamente significativo.

De acuerdo con los valores promedio de la probabilidad LnP (D) y el método de Evanno et al. (2005), el valor de  $K$  estimado con el programa Structure, fue de dos grupos genéticos para los individuos de *C. falciformis*. Sin embargo, ninguno de éstos estadísticos ni la gráfica de clusters (Fig. 18) dan una tendencia definida de cuáles localidades pudiesen estar formando esas dos posibles poblaciones. Por ello, se realizaron simulaciones hasta  $K=7$ , aumentando el número de repeticiones de cada  $K$  hasta 15. La delta  $K$  de éstas pruebas, indica dos picos modales en 2 y 4 posibles grupos (Fig. 19). Cuando existe multimodalidad es indicativo de una subestructura subyacente en los datos, la cual podría ser resuelta jerarquizando las poblaciones. No obstante, en este caso los grupos parecen estar lo suficientemente mezclados como para verificar el número real de clusters.

Las tasas de migración reciente obtenidas con BayesAss muestran cierto patrón de direccionalidad del flujo génico del occidente hacia el oriente principalmente de IN y OC-G hacia localidades del OPO, en la dirección opuesta la migración parece que se da de GT a NC y de OC-G hacia IN, mientras que sólo algunas migraciones sur-norte se detectaron de EC a GT y de GT a BCS (Tabla 17).

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1. Diversidad genética

Los datos del tiburón piloto demostraron variación genética relativamente baja, con sólo 14 haplotipos identificados de la región control. En general, los elasmobranquios tienen tasas lentas de sustitución nucleotídica en relación con otros vertebrados, un hecho que se ha atribuido a sus historias de vida incluyendo lento crecimiento y lentas tasas metabólicas, tiempo generacional largo y bajo potencial reproductivo (Martin, 1999).

La región control ha sido empleada en una serie de estudios para investigar las relaciones genéticas de poblaciones de tiburones explotadas (Duncan et al., 2006; Dudgeon et al., 2009), sin embargo, los valores de diversidad haplotípica y nucleotídica reportados para otras especies de tiburón son más altos que los observados en este estudio para *C. falciformis*. Por ejemplo, la variabilidad genética del tiburón piloto fue significativamente menor que las especies congénicas *C. limbatus* (Keeney et al., 2005) y *C. plumbeus* (Portnoy et al., 2010), con valores de 0,805 y 0,959, respectivamente.

Otras especies de tiburones ampliamente distribuidas geográficamente presentan valores que van desde 0,725 hasta 0,920 (Duncan et al., 2006; Schultz et al., 2008; Ahonen et al., 2009; Chabot y Allen, 2009). Por otra parte, valores de diversidad haplotípica y de diversidad nucleotídica similarmente bajos, se han reportado para el tiburón limón, *Negaprion acutidens* (Schultz et al., 2008) y *Carcharias taurus* (Ahonen et al., 2009) (Tabla 18).

Fenómenos como el efecto fundador o cuello de botella seguido por una expansión demográfica de un pequeño grupo de individuos fundadores con un limitado pool genético, se han mencionado como hipótesis para explicar los bajos niveles de diversidad genética en estas especies de tiburones (Stow et al., 2006).

El tamaño del fragmento de la región control utilizado para el análisis del tiburón piloto fue de aproximadamente trescientas pares de bases menos que el promedio reportado para el fragmento completo de la región control para tiburones. Este hecho podría haber influido en el bajo número de haplotipos encontrados; sin embargo, el bajo número de sitios polimórficos observados a lo largo de las secuencias del tiburón piloto, indican que aunque se obtengan el fragmento completo de este marcador, el número de haplotipos se mantendría bajo en relación a otras especies.

Por otro lado, las estimaciones de las tendencias de abundancia relativa a partir de las capturas comerciales del tiburón piloto muestran una disminución de la abundancia de aproximadamente el 90% (principalmente en el OPO) (Watson et al., 2009). Por ejemplo, la pesca incidental del tiburón

piloto en la pesquería de cerco del Pacífico Oriental Tropical disminuyó un 60-80% entre 1994 y 2004 (Minami et al., 2007), y la captura incidental en el Pacífico Occidental y Central disminuyó en aproximadamente un 60% entre 1995 y 2006 (WCPFC, 2008). Esta tendencia en la reducción de las capturas anuales de tiburón piloto, podrían ser responsables de la relativamente baja diversidad genética que se ha observado en este estudio. Sin embargo, esta hipótesis podría ser cuestionable ya que cuando las poblaciones disminuyen rápidamente debido a la pérdida de hábitat, la contaminación o la sobreexplotación, la firma genética puede ser imperceptible en el corto plazo, e incluso especies en peligro de extinción podría mostrar niveles normales de variación genética (Frankham, 1995). Además, cualquier reducción en el tamaño de la población inducido por procesos antropogénicos tendría que haber sucedido durante las últimas décadas (Karl et al., 2011), por lo tanto las poblaciones del tiburón piloto podrían haber retenido los niveles de diversidad histórica dado que ésta especie madura lentamente y es longevo por lo que el espacio de tiempo es relativamente corto para que los procesos de endogamia hayan afectado la variación genética (Nei et al., 1975; Bowen et al., 2007). Por lo tanto, es poco probable que el patrón de baja diversidad genética en el tiburón piloto pudiera interpretarse como resultado de una reciente reducción en la diversidad por algún evento de cuello de botella o de erosión genética debido a la sobreexplotación.

La diversidad nucleotídica más baja que otras especies de tiburón y una tasa lenta de mutación en la región de control junto con el hecho que nueve de diez sustituciones hayan sido transiciones, sustentan la hipótesis de una falta de diversidad debida a procesos históricos más que eventos recientes en esta especie como ha sido sugerido para el tiburón nodriza gris (*Carcharias taurus*) (Ahonen et al., 2009). Alternativamente, un bajo grado de diferenciación genética entre las poblaciones de especies marinas se ha atribuido también a grandes tamaños efectivos de población, lo que se esperaría que limitara la diferenciación debido a la deriva genética (por ejemplo, Allendorf y Phelps, 1981; DeWoody y Avise, 2000).

Por el contrario, la diversidad observada en los microsátélites fue relativamente alta en el nivel de heterocigocidad (0.67), similar a lo reportado para otras especies de tiburones; aunque ligeramente se encuentra por encima de los valores de diversidad estimados para dos especies congénicas (*C. limbatus*, de 0.50 y *C. sorrah* de 0.54). Castillo-Olguín, (2005), observó niveles de heterocigocidad ligeramente más bajos (0.42) que los observados en este trabajo para el Pacífico mexicano probablemente debido a las diferencias en el polimorfismo de los marcadores utilizados (RAPD's).

Es interesante que la baja variabilidad observada con la región control no se refleja en el genoma nuclear dada por los microsátélites, patrón que coincide con lo reportado para *C. leucas* (Karl



et al., 2011). Estos autores formulan cinco hipótesis para explicar dichas diferencias: 1. distintos modos de herencia de los marcadores, 2. selección purificadora en el genoma mitocondrial o selección balanceadora en el nuclear, 3. cambios en el tamaño de la población, 4. problemas de muestreo y 5. comportamiento reproductivo específico del sexo (filopatría).

No obstante, los autores descartan las primeras cuatro hipótesis debido a las características de la historia de vida de los tiburones y específicas del tiburón toro que también podrían aplicar para el tiburón piloto y suponen que la explicación más probable de esos resultados es la filopatría de las hembras debido a que las subpoblaciones determinadas por las hembras tendrían menor tamaño efectivo poblacional para el ADNmt que una población panmíctica para el ADN nuclear, por lo tanto la variación genética del primero sería menor (Karl et al., 2011).

Sin embargo, con los datos no se registró una señal de filopatría para el tiburón piloto, por lo que una hipótesis alterna para explicar las diferencias en la variabilidad genética de ambos marcadores es como resultado de algún evento demográfico que haya presentado la especie, tal sería el caso de un efecto fundador (Avice, 2000). Un evento de colonización reciente puede conducir a la reducción de variabilidad genética dado que todos los individuos son descendientes de un pequeño grupo de hembras fundadoras (Hartl y Clark, 2007).

Una consecuencia de ésta hipótesis es que si la población del océano Pacífico Oriental fuese el resultado de una colonización reciente entonces esto puede haber implicado organismos del océano Pacífico Occidental usando la cadena de islas del Pacífico como ruta de migración (ver discusión más adelante). Considerando esta ruta de migración, se esperaría un gradiente de diversidad longitudinal del occidente hacia el oriente tal como lo muestran los datos de la presente tesis.

## **8.2. Estructura poblacional**

Se observó evidencia genética de la existencia de por lo menos dos poblaciones diferentes de tiburón piloto y de una dispersión reciente de la especie en el Océano Pacífico. Los análisis de AMOVA con la región control indicaron una proporción significativa de la heterogeneidad de haplotipos entre la región Occidental y Oriental del Océano Pacífico ( $\Phi_{CT} = 0.019$ ,  $P = 0.008$ , Tabla 4). Este resultado es apoyado por las estimaciones significativas de  $\Phi_{ST}$  ( $P < 0.05$ ) entre pares de muestras de ambas regiones; si bien estas estimaciones fueron modestas y no fueron significativas después de la corrección de Bonferroni y aun cuando no hay una segregación espacial clara y robusta de haplotipos entre las regiones, la reconstrucción filogenética y la red de haplotipos mostraron

algunos indicios de la existencia de dos grupos de haplotipos, separando los haplotipos únicos del Pacífico Occidental de los del Pacífico Oriental y la Zona Oceánica, con excepción de los haplotipos Cf-6 y Cf-10.

Por otra parte, Bonfil, (2008) sugirió la existencia de diferentes poblaciones de *C. falciformis* en cada costa del Océano Pacífico, basado en las diferencias en los parámetros reproductivos. Para el Pacífico Occidental-central, se ha reportado una talla de madurez a los 202-218 cm de longitud total y para el Pacífico Oriental se sugiere que maduran a una talla menor, a tan sólo 180 cm de longitud total (ver Oshitani et al., 2003). Estas observaciones en combinación con los resultados obtenidos en éste trabajo indican y soportan la existencia de dos poblaciones de tiburón piloto, una en cada costa del Océano Pacífico.

No obstante, el patrón de estructura genética observada con los análisis del AMOVA en ambos marcadores cuenta historias distintas. Por un lado, con la región control se observó diferenciación entre la región oriental y occidental mostrando una ligera pero significativa señal de divergencia; sin embargo, con los microsatélites no se observó ese patrón ya que todas las comparaciones entre los grupos probados no resultaron significativas. Este patrón también fue observado por Castillo-Olguín, (2005), para el Pacífico mexicano utilizando los marcadores RAPD's y Citb.

Esto puede ser explicado por la hipótesis que las poblaciones actualmente estén conectadas por un flujo genético gradual entre la región occidental, central y oriental, por tanto la señal de divergencia observada en la región control sea un vestigio histórico de separación de las poblaciones, atribuido a la tasa mutacional baja del ADNmt. En el caso de los microsatélites no se observa esa señal debido a que el tamaño efectivo poblacional del ADN nuclear es cuatro veces el del ADNmt y la divergencia que se generó después de que las poblaciones del OPO se establecieron, es la que se observa en el ADNmt y no así en el nuclear como se ha observado en especies de peces marinos, donde la señal de la estructura genética de la población suele ser débil, debido a que las poblaciones se caracterizan por tamaños efectivos grandes y son evolutivamente jóvenes, además de que puede existir flujo genético importante combinado con una historia de dispersión reciente (André et al., 2010; Díaz-Jaimes et al., 2010).

Otro factor que puede contribuir a una señal baja de divergencia genética, es la ausencia de barreras visibles para la dispersión en el medio marino lo que reduce la heterogeneidad entre las poblaciones y por lo tanto, en ocasiones resulta difícil diferenciar entre las poblaciones recientemente divergentes. Es posible que el flujo genético ocurra sobre grandes áreas geográficas como lo han

demostrado estudios de marcaje, quizá haciendo al tiburón piloto más parecido a peces pelágicos que a tiburones costeros en términos de estructura poblacional.

Los tiburones piloto utilizan hábitats pelágicos fuera de la plataforma continental a edades muy tempranas, lo cual pudiera significar que las extensiones oceánicas no son una barrera que limite el flujo genético (Benavides et al., 2011). La presencia de los tres haplotipos más comunes del tiburón piloto a través del Océano Pacífico sugieren una importante cantidad de flujo histórico de genes entre las regiones Oriental y Occidental debido a la capacidad de dispersión de la especie, lo que permitiría la conectividad genética entre regiones (Grant y Bowen, 1998; Hoolihan et al., 2006).

Además, existe un aparente gradiente longitudinal en la diversidad genética, con los valores más bajos en el OPO y los más altos en el OPOc, lo que sugiere que éste último fue el centro de origen de dispersión de *C. falciformis* que posteriormente se dispersó hacia el este a través del Pacífico, un patrón que se reconoce en numerosos taxa marinos (Palumbi, 1997; Mora et al., 2003).

Esta hipótesis es sustentada por los análisis de aislamiento por distancia los cuales no presentaron señales significativas, lo que requeriría de poblaciones intermedias permitiendo la conectividad entre las regiones occidental y oriental separadas por cientos de kilómetros. La Barrera del Pacífico Oriental es un área oceánica extensa de 7000 km. Dicha barrera tiene un amplio espectro de efectos en los tiburones, desde separación completa en algunas especies costeras (Schultz et al., 2008), el aislamiento de una población monofilética en el pacífico oriental (Jorgensen et al., 2010), hasta un efecto nulo o poco notable en algunas especies pelágicas (Duncan et al., 2006a; Keeney y Heist, 2006). Se ha sugerido que si ocurrieran eventos de dispersión a través de dicha barrera, éstos pudiera ser facilitados al utilizar las especies la cadena de islas como “piedras de paso” (Duncan et al., 2006) lo que ha sido sugerido para la dispersión del tiburón piloto a través del océano Pacífico (Bonfil, 2008).

Otra posibilidad es que como en otros casos, la falta de detección de la estructura genética esté influenciada por bajo esfuerzo en el muestreo. Por ejemplo Keeney y Heist (2006) reportaron valores similares significativos de  $\Phi_{ST}$  para las comparaciones entre las muestras del Pacífico Oriental y Occidental de *C. limbatus*; sin embargo, los autores concluyeron que no había diferencias entre las regiones con el argumento que estos resultados se debieron probablemente al bajo número de muestras analizadas en la región del Indo-Pacífico. En el caso del presente trabajo, habría una sobrerrepresentación de las muestras del OPO que podrían sobreestimar los resultados.

En la mayoría de las especies de tiburones que han mostrado divergencia genética entre poblaciones, incluso en especies con alta capacidad de dispersión (ver Hueter et al., 2004), las

diferencias encontradas han sido asociadas a las características intrínsecas del comportamiento de la especie, como filopatría. Sin embargo, los resultados de la región control para el tiburón piloto muestran una señal de divergencia débil y sin un patrón geográfico definido, circunstancia que no respalda la existencia de filopatría en esta especie.

Los resultados del análisis de loci microsatélites mostraron una señal débil pero significativa de estructura poblacional con los análisis de  $F_{ST}$ , respaldando las diferencias genéticas entre las regiones Oriental y Occidental del Pacífico observadas con la región control; además tanto los análisis de SAMOVA y ACP realizados con microsatélites indican que hay diferencias significativas entre BCS y EC, GT y EC y NC e IN. Si tomamos en cuenta, que Structure muestra un pico en  $K=4$ , se puede inferir que hay una subestructura mucho más fina que la que sugiere la región control, pudiendo suponer que existe una diferenciación genética tanto longitudinal como latitudinal.

No se observó evidencia de flujo genético entre NC y las localidades del OPO, en contraste, se observó alto flujo de IN hacia el OPO lo cual podría explicarse por el patrón de corrientes del OP y que el tiburón piloto haya utilizado la contracorriente ecuatorial para dispersarse hacia el oriente. En cambio la corriente ecuatorial del sur le impediría hacer este recorrido y de ahí que NC sea genéticamente más parecida a IN y a su vez que IN presente mayor parecido genético con BCS y CR que también es sugerido por el análisis de SAMOVA y ACP. No obstante, habría que tomar esta hipótesis con precaución, ya que podría ser un artefacto debido al bajo número de muestras analizadas para NC y que podría obstaculizar definir si las frecuencias genotípicas o alélicas realmente son diferentes.

Es también posible que barreras termales o capacidades de locomoción diferenciales entre estados de madurez de los organismos, tengan un efecto en la dispersión e inhiban el flujo genético en esta especie.

En estudios de marcado en el OPO y el norte del Golfo de México, han observado que el tiburón piloto pasa el 99% del tiempo dentro de los primeros 50 m de la superficie del mar y 80-85% en aguas con temperatura entre 26-30 °C (Musyl et al., 2011). Asimismo, se ha reportado que el tiburón piloto se segrega por tallas siendo y los juveniles se mantienen en las zonas de alimentación, a menudo se encuentran asociados a objetos flotantes y/o FAD's (dispositivos agregadores de peces, por sus siglas en inglés) y no presentan desplazamientos amplios como los adultos (Compagno, 1984; Bonfil, 2008; Watson et al., 2009), comportamiento que presumiblemente cambia a través de la ontogenia volviéndose más vágiles conforme van madurando (Musyl et al., 2011).

Por lo tanto si los organismos juveniles no son capaces de atravesar la contracorriente ecuatorial, ésta podría ser una barrera que impida el libre tránsito de los individuos a través del ecuador y que pudiese ser el factor que cause la diferenciación genética observada entre EC y BCS observada con los microsátélites.

En un programa de marcado-recaptura, se observó a un tiburón piloto viajar cerca de 2,500 km desde Costa Rica a la boca del Golfo de California (Kohin et al., 2006). Otras hembras marcadas en la Reserva Marina de Galápagos, emigraron más de 2,200 km al norte de Clipperton (<http://migramar.org/hi/>), lo que sugiere alta movilidad de la especie a lo largo del Pacífico Oriental. Sin embargo, no se han reportado movimientos transoceánicos o transecuatoriales de ésta especie en el Océano Pacífico. Los datos de estado de madurez y/o longitud de los individuos analizados en este estudio fueron escasos por lo que no se pudieron hacer las comparaciones para corroborar una diferenciación genética debida a segregación por talla.

Los resultados de migrantes recientes estimados con los loci microsatelitales en este trabajo, muestran un patrón de direccionalidad del flujo de occidente a oriente y en menor medida de sur a norte principalmente del Golfo de Tehuantepec hacia Baja California Sur y de Ecuador hacia el Golfo de Tehuantepec. Con base en éstas y las observaciones mencionadas anteriormente, es posible que el tiburón piloto presente una estructura genética en una escala más fina, pero que no sea evidente si los individuos que se hayan muestreando estén en stocks mezclados, ya sea en áreas de alimentación o rutas de migración como han mostrados estudios en especies marinas altamente migratorias que presentan historias de vida complejas que pueden confundir la presencia de una estructura subyacente (Carlsson et al. 2004, Hueter et al. 2004).

En estudios previos se ha reportado que el tiburón piloto en el océano Pacífico Oriental se reproduce a lo largo del año sin una estacionalidad definida de apareamiento y alumbramiento por lo que es muy probable que las cohortes estén mezcladas. Dada la alta capacidad de dispersión de la especie puede suponerse que haya una mezcla genética de los grupos en el área de muestreo lo que pudiese estar enmascarando la estructura genética real de *C. falciformis*. Este resultado es también soportado por los análisis de aislamiento por distancia que no mostraron una relación significativa entre la distancia geográfica y la distancia genética.

Para el presente trabajo no se tienen representadas localidades del Pacífico Central y sólo dos localidades del Pacífico Occidental, aunado a ello, el número de muestras para Nueva Caledonia fue bajo, además el número de loci microsátélites utilizados fue también bajo, causas que pueden haber influido para encontrar una señal de divergencia poco clara y la imposibilidad de poder resolver con

mayor certeza el patrón de estructura genética del tiburón piloto en el Océano Pacífico. Waples et al., (2006) argumentan que si se utiliza un número adecuado de marcadores altamente variables, puede ser posible detectar diferenciaciones poblacionales cuando las tasas de migración son más altas que el nivel requerido para la independencia demográfica. Sin embargo, es importante resaltar que a pesar de que con los resultados obtenidos en el presente trabajo las diferencias a nivel tanto latitudinal como longitudinal no pudieron ser probadas de manera fehaciente, las ligeras diferencias observadas soportan la hipótesis de una estructura genética intraoceánica en ésta especie.

### **8.3. Filogeografía y demografía histórica**

Los resultados demográficos históricos señalan una ligera evidencia de expansión reciente de la población, ya sea espacial o demográfica. Estos resultados son apoyados por el análisis de mismatch, que mostró distribuciones unimodales y sin desviaciones de las expectativas en el marco del modelo de expansión súbita (Rogers y Harpending, 1992). Adicionalmente, la reconstrucción filogenética no pudo definir con claridad la agrupación de los haplotipos para cualquier región geográfica y la red de haplotipos mostró dos haplotipos ancestrales (Cf-1 y Cf-4) que se separaron y muestran una típica topología de estrella rodeada de haplotipos únicos del Pacífico Oriental y Occidental, lo que sugiere una expansión poblacional reciente (Lavery et al., 1996).

Además, ningún haplotipo se separa de los haplotipos más cercanos por más de un paso mutacional, lo cual indica que divergieron recientemente (Templeton, 2006). Por otra parte, los índices de evolución neutral ( $D$  de Tajima y  $F_s$  de Fu) fueron negativos y estadísticamente significativos en el OPO, que resulta consistente también con la evidencia de expansión poblacional (Tajima, 1989). A pesar de que se sabe relativamente poco sobre las migraciones y movimientos del tiburón piloto, es posible que estos tiburones utilicen las corrientes marinas cálidas para dispersarse a través del Océano Pacífico utilizando las cadenas de islas del Pacífico tropical y del sur como áreas de trampolín (Bonfil, 2008). Esta posibilidad es apoyada por los resultados del IMA2, que indican que la OPOc es la fuente de origen y de dispersión, ya que presentó el tiempo de divergencia más antiguo y mayores tasas de migración en términos de coalescencia, resultado que podría explicar la señal de expansión espacial observada en éste estudio. Este escenario también se ha sugerido para explicar la dispersión reciente de otras especies de tiburones en el Pacífico, como el tiburón martillo, *Sphyrna lewini* (Duncan et al., 2006) y el tiburón puntas negras *C. limbatus* (Keeney y Heist, 2006).

El tiempo de divergencia genética calculado para las poblaciones del tiburón piloto fue de 170,161 años, sin embargo, dada la ligera variación genética y la baja tasa de evolución molecular (posiblemente aún más lenta en esta especie) observado en el ADNmt de los tiburones puede no haber sido suficiente tiempo para acumular mutaciones y por lo tanto producir diferencias claras entre las poblaciones después de su separación (Martin et al., 1992).

Además, las tasas de migración estimadas con IMA2 sugieren que hay un flujo de genes pequeño pero continuo aún después de la expansión de la población, lo que también puede estar contribuyendo a retrasar la creación de frecuencias haplotípicas diferentes a través de la acumulación de mutaciones por procesos estocásticos y, como resultado, evitar un nivel más profundo de divergencia genética entre las poblaciones de tiburón piloto de las regiones OPO y OPOc. Las diferencias encontradas en la tasa de flujo génico entre ambos marcadores soporta la hipótesis de divergencia reciente ya que la tasa de flujo estimada con la región control es mayor a uno considerado como un valor umbral para la homogenización de las poblaciones, en cambio los valores de flujo obtenidas con microsatélites no alcanzan este valor. Este escenario implica también que una población ancestral de tiburón piloto en el Pacífico Occidental se extendió hacia el este, como ha sido el caso de otras poblaciones de tiburones pelágicos.

Es importante reiterar que la incapacidad para detectar una estructura poblacional clara usando  $F_{ST}$  y análisis de aislamiento por distancia refleja procesos de largo plazo contra la señal de migración detectable, lo que representa patrones de influencia reciente que están afectando la migración actual.

#### **8.4. Implicaciones para el manejo pesquero y conservación de *Carcharhinus falciformis***

Un reto importante para la inclusión de los datos genéticos en las estrategias de manejo pesquero es la mezcla de distintas poblaciones de especies migratorias en los caladeros específicos (Reiss et al., 2009). Una cuestión clave es la evaluación del nivel requerido de divergencia en las poblaciones para justificar una gestión separada (Waples et al., 2008). Estas evaluaciones podrían basarse en las características biológicas y de la historia de vida de la población de las especies, así como los objetivos de manejo y conservación (Palsbøll et al., 2007). Resultados estadísticamente significativos en la estructura de la población se han observado en nuestro estudio, pero los datos dejan de ser significativos después de la corrección de Bonferroni. Sin embargo, el significado estadístico y la importancia práctica o biológica son fenómenos distintos.

La hipótesis nula en cualquier estudio de la estructura del stock genético es que las frecuencias de genes no varía en la población, y el fallar al rechazar la hipótesis nula nunca debe tomarse como prueba de que la hipótesis nula es cierta (Dizon et al., 1995). Como consecuencia, los científicos y administradores pesqueros suelen trabajar sobre la base de la "mejor evidencia científica disponible", por lo que varias líneas de evidencia (incluyendo los valores de  $P$  y tamaños efectivos, así como las fuentes de asociadas incertidumbre y cualquier otra información relacionada) son consideradas en un contexto general antes de tomar una decisión de manejo (Waples et al., 2008).

Mientras que los datos del presente trabajo no proporcionan una señal clara de estructura genética poblacional en el tiburón piloto, parece más prudente evaluar y manejar a la especie como dos poblaciones separadas: una en el Pacífico Occidental y otra en el Pacífico Oriental con base a la ligera divergencia genética observada entre estas dos regiones. No sólo la concordancia de los datos genéticos y biológicos proporcionan más apoyo a la hipótesis de dos poblaciones de tiburón piloto presentes en el Océano Pacífico, sino más importante aún son las consecuencias para la especie que podría tener el escenario contrario.

Si la población tiene algún grado de estructuración genética y está sujeta a una alta presión pesquera, un plan de manejo aplicado a gran escala que trate a las dos poblaciones como una sola incrementará el riesgo de que una población local se extinga o que ocurra una sobreexplotación de la población más vulnerable (Sterner, 2007), a pesar de que la población total permanezca sin amenazas. Por lo tanto, la separación de las poblaciones evaluadas en dos unidades de manejo sería menos perjudicial que el escenario inverso, tal error resultaría en procedimientos de manejo que pudiesen derivar en consecuencias ecológicas negativas (Reiss et al., 2009).



## 9. CONCLUSIONES

El tiburón piloto presentó una baja diversidad en el ADN mitocondrial en comparación con otras especies de tiburones que podría deberse a factores históricos como tasa de evolución o características biológicas de la especie como tamaño efectivo poblacional pequeño.

Los resultados muestran que el tiburón piloto podría comprender por lo menos dos poblaciones genéticamente diferenciadas a nivel regional: una en el OPO y otra en el OPOc, lo que enfatiza la necesidad de coordinar el manejo de la especie entre diversos países.

La historia evolutiva de *C. falciformis*, se encuentra asociada a eventos de expansión poblacional con eventos de dispersión del oeste hacia el este.

El análisis filogeográfico no mostró un patrón claro en la distribución espacial de la diversidad genética, sin embargo se observaron indicios de separación de haplotipos únicos de la región control separados por un paso mutacional, lo que sugiere que la divergencia entre las poblaciones del OPO y el OPOc es reciente.

## 10. LITERATURA CITADA

- Ahonen, H., Harcourt, R.G., Stow, A.J., 2009. Nuclear and mitochondrial DNA reveals isolation of imperilled grey nurse shark populations (*Carcharias taurus*). *Molecular ecology* 18, 4409–4421.
- Aljanabi, S.M., Martinez, I., 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic acids research* 25, 4692–4693.
- Allendorf, F.W., Phelps, S.R., 1981. Use of allelic frequencies to describe population structure. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 38, 1507–1514.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* 215, 403–10.
- André, C., Larsson, L.C., Laikre, L., Bekkevold, D., Brigham, J., Carvalho, G.R., Dahlgren, T.G., Hutchinson, W.F., Mariani, S., Mudde, K., Ruzzante, D.E., Ryman, N., 2010. Detecting population structure in a high gene-flow species, Atlantic herring (*Clupea harengus*): direct, simultaneous evaluation of neutral vs putatively selected loci. *Heredity* 106, 1–11.
- Au, D., 1991. Polyspecific Nature of Tuna Schools: Shark, Dolphin, and Seabird Associates. *Fishery Bulletin* 89, 343–354.
- Avise, J.C., 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Avise, J.C., 2009. *Phylogeography: retrospect and prospect*. *Journal of Biogeography* 36, 3–15.
- Bane, G.W., 1966. Observations on the silky shark, *Carcharhinus falciformis*, in the Gulf of Guinea. *Copeia* 2, 354–356.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., Bonhomme, F., 1996. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Benavides, M.T., Horn, R.L., Feldheim, K.A., Shivji, M.S., Clarke, S.C., Wintner, S., Natanson, L., Draccini, M., Boomer, J.J., Gulak, S.J.B., Chapman, D.D., 2011. Global phylogeography of the dusky shark *Carcharhinus Obscurus*: implications for fisheries management and monitoring the shark fin trade. *Endangered Species Research* 14, 13–22.
- Benbouza, H., Jacquemin, J., Baudoin, J., Mergeai, G., 2006. Optimization of a reliable , fast , cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Pharmacia* 10, 77–81.
- Bonfil, R., 1990. Contribution to the fisheries biology of the silky shark *Carcharhinus falciformis* (Bibron 1839) from Yucatan, Mexico. (M.Sc. Thesis. University of Wales

- Bonfil, R., 1997. Status of shark resources in the southern Gulf of Mexico and Caribbean: implications for management. *Fisheries Research* 29, 101–117.
- Bonfil, R., 2008. The biology and ecology of the silky shark, *Carcharhinus falciformis*, in: Camhi, M.D., Pikitch, E.K., Babcock, E.A. (Eds.), *Sharks of the Open Ocean*. Blackwell Publishing, Oxford, UK., pp. 114–127.
- Bonfil, R., Abdallah, M., 2004. Field identification guide to the sharks and rays of the Red Sea and Gulf of Aden. *FAO Species Identification Guide for Fishery Purposes*. FAO, Rome.
- Bonfil, R., Mena, R., de Anda, D., 1993. Biological parameters of commercially exploited silky sharks, *Carcharhinus falciformis*, from the Campeche Bank, Mexico. *NOAA Tech. Rep. NMFS*.
- Bowen, B.W., Avise, J.C., 1995. Conservation genetics of marine turtles., in: Avise, J.C., Hamrick, J.L. (Eds.), *Conservation Genetics: Case Histories from Nature*. Chapman and Hall, NY., pp. 190–237.
- 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.
- Brookfield, J.F., 1996. Genetic evidence for repression of somatic P element movements in *Drosophila melanogaster* consistent with a role for the KP element. *Heredity* 76, 384–391.
- Cadena-Cárdenas, L., 2001. Biología reproductiva de *Carcharhinus falciformis* (Chondrichthyes: Carcharhiniformes: Carcharhinidae), en el Golfo de California. Tesis profesional. UABCS. 68 p. p.
- Cano, J.M., Shikano, T., Kuparinen, A., Merilä, J., 2008. Special review: Genetic differentiation, effective population size and gene flow in marine fishes: implications for stock management. *Genetics* 10, 1–10.
- Carlsson, J., 2008. Effects of microsatellite null alleles on assignment testing. *The Journal of heredity* 99, 616–23.
- Castillo-Olguín, E., 2005. Estructura genética poblacional de dos especies de tiburones (*Carcharhinus falciformis* y *Sphyrna lewini*) del Pacífico Mexicano. Tesis profesional. UABCS. 68 p. p.
- Castro, A.L.F., Stewart, B.S., Wilson, S.G., Hueter, R.E., Meekan, M.G., Motta, P.J., Bowen, B.W., Karl, S.A., 2007. Population genetic structure of Earth's largest fish, the whale shark (*Rhincodon typus*). *Molecular ecology* 16, 5183–92.
- Chabot, C.L., Allen, L.G., 2009. Global population structure of the tope (*Galeorhinus galeus*) inferred by mitochondrial control region sequence data. *Molecular ecology* 18, 545–52.
- Chan, R.W.K., Dixon, P.I., Pepperell, J.G., Reid, D.D., 2003. Application of DNA-based techniques for the identification of whaler sharks (*Carcharhinus* spp.) caught in protective beach meshing and New South Wales. *Fishery Bulletin* 101, 910–914.

- Chapuis, M.-P., Estoup, A., 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular biology and evolution* 24, 621–631.
- Charlesworth, B., 1998. Measures of divergence between populations and the effect of forces that reduce variability. *Molecular biology and evolution* 15, 538–43.
- Chavez, F.P., Bertrand, A., Guevara-Carrasco, R., Soler, P., Csirke, J., 2008. The northern Humboldt Current System: Brief history, present status and a view towards the future. *Progress in Oceanography* 79, 95–105.
- Chen, P., Yuan, W., 2006. Demographic analysis based on the growth parameter of sharks. *Fisheries Research* 78, 374–379.
- Clarke, S.C., Magnussen, J.E., Abercrombie, D.L., Mcallister, M.K., Shivji, M.S., 2006. Identification of Shark Species Composition and Proportion in the Hong Kong Shark Fin Market Based on Molecular Genetics and Trade Records. *Conservation Biology* 20, 201–211.
- Compagno, L.J. V., 1984. FAO Species Catalogue. Vol. 4. Sharks of the World. An annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. Part 2. Carcharhiniformes., Fao Fisheries Synopsis. FAO Fish. Synop. (125) Vol. 4, Pt.2.
- Côté, C.L., Gagnaire, P.-A., Bourret, V., Verreault, G., Castonguay, M., Bernatchez, L., 2013. Population genetics of the American eel (*Anguilla rostrata*):  $F_{ST} = 0$  and North Atlantic Oscillation effects on demographic fluctuations of a panmictic species. *Molecular ecology* 22, 1763–76.
- Dakin, E.E., Avise, J.C., 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93, 504–509.
- Daly-Engel, T.S., Grubbs, R.D., Bowen, B.W., Toonen, R.J., 2007. Frequency of multiple paternity in an unexploited tropical population of sandbar sharks (*Carcharhinus plumbeus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 64, 198–204.
- Dempster, A., Laird, N., Rubin, D., 1977. Maximum likelihood from incomplete data via the EM Algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 39, 1–38.
- DeWoody, J.A., Avise, J.C., 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology* 56, 461–473.
- Díaz-Jaimes, P., Uribe-Alcocer, M., Rocha-Olivares, A., García-de-León, F.J., Nortmoon, P., Durand, J.-D.D., 2010. Global phylogeography of the dolphinfish (*Coryphaena hippurus*): the influence of large effective population size and recent dispersal on the divergence of a marine pelagic cosmopolitan species. *Molecular phylogenetics and evolution* 57, 1209–1218.
- DiBattista, J.D., Feldheim, K.A., Gruber, S.H., Hendry, A.P., 2008. Are indirect genetic benefits associated with polyandry? Testing predictions in a natural population of lemon sharks. *Molecular ecology* 17, 783–795.

- Dizon, A.E., Taylor, L.B., O'corry-Crowe, G.M., 1995. Why statistical power is necessary to link analyses of molecular variation to decisions about population structure, in: Neilson, J.L., Powers, D.A. (Eds.), *Evolution and the Aquatic Ecosystem*. American Fisheries Society, Bethesda, MD, pp. 228–294.
- Domínguez-Domínguez, O., Vázquez-Domínguez, E., 2009. Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal Biodiversity and Conservation* 32, 59–70.
- Drummond, A.J., Rambaut, A., 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC evolutionary biology* 7, 214.
- Dudgeon, C.L., Broderick, D., Ovenden, J.R., 2009. IUCN classification zones concord with, but underestimate, the population genetic structure of the zebra shark *Stegostoma fasciatum* in the Indo-West Pacific. *Molecular ecology* 18, 248–61.
- Dudgeon, C.L., Feldheim, K.A., Schick, M., Ovenden, J.R., 2006. Polymorphic microsatellite loci for the zebra shark *Stegostoma fasciatum*. *Molecular Ecology Notes* 6, 1086–1088.
- Duncan, K.M., Martin, A.P., Bowen, B.W., DE Couet, H.G., 2006. Global phylogeography of the scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*). *Molecular ecology* 15, 2239–51.
- Dupanloup, I., Schneider, S., Excoffier, L., 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular ecology* 11, 2571–81.
- Eckert, C.G., Samis, K.E., Loughheed, S.C., 2008. Genetic variation across species' geographical ranges: the central–marginal hypothesis and beyond. *Molecular Ecology* 17, 1170–1188.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology* 14, 2611–2620.
- Excoffier, L., Foll, M., Petit, 2009. Genetic Consequences of Range Expansions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 40, 481–501.
- Excoffier, L., Lischer, H.E.L., 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources* 10, 564–567.
- Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M., 1992. Analysis of Molecular Variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479–491.
- Falush, D., Stephens, M., Pritchard, J.K., 2003. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. *Genetics* 164, 1567–1587.
- Farris, J.S., 1970. Methods for Computing Wagner Trees. *Systematic Biology* 19, 83–92.

- Feldheim, K.A., Gruber, S.H., Ashley, M., 2001. Population genetic structure of the lemon shark (*Negaprion brevirostris*) in the western Atlantic: DNA microsatellite variation. *Molecular ecology* 10, 295–303.
- Feldheim, K.A., Gruber, S.H., Ashley, M. V, 2002. The breeding biology of lemon sharks at a tropical nursery lagoon. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 269, 1655–61.
- Feldheim, K.A., Gruber, S.H., Ashley, M. V., 2004. Reconstruction of parental microsatellite genotypes reveals female polyandry and philopatry in the lemon shark, *Negaprion brevirostris*. *Evolution; international journal of organic evolution* 58, 2332–2342.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.
- Flores-Morales, A.L., Parés\_ Sierra, A., Marinone, S.G., 2009. Factors that modulate the seasonal variability of the sea surface temperature of the Eastern Tropical Pacific. *Geofísica Internacional* 48, 337–349.
- Florin, A.-B., Höglund, J., 2007. Absence of population structure of turbot (*Psetta maxima*) in the Baltic Sea. *Molecular ecology* 16, 115–26.
- Frankham, R., 1995. Conservation genetics. *Annual Review Genetics* 29, 305–327.
- Fu, Y.-X., 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147, 915–925.
- Futuyama, D., 2009. *Evolution*. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Galván-Tirado, C., 2007. Biología reproductiva del tiburón aleta de cartón *Carcharhinus falciformis* capturado en el Golfo de Tehuantepec. Tesis de Maestría, Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, UNAM.
- Galván-Tirado, C., Díaz-Jaimes, P., García-de León, F.J., Galván-Magaña, F., Uribe-Alcocer, M., 2013. Historical demography and genetic differentiation inferred from the mitochondrial DNA of the silky shark (*Carcharhinus falciformis*) in the Pacific Ocean. *Fisheries Research* 147, 36–46.
- Glaubitz, J.C., 2004. convert: A user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Molecular Ecology Notes* 4, 309–310.
- Glenn, T.C., Schable, N.A., 2005. Isolating microsatellite DNA loci. *Methods in Enzymology* 395, 202–222.
- Goudet, J., 1995. FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *Journal of Heredity* 86, 485–486.

- Grant, W.S., Bowen, B.W., 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity* 89, 415–426.
- Grantham, B.A., Chan, F., Nielsen, K.J., Fox, D.S., Barth, J.A., Huyer, A., Lubchenco, J., Menge, B.A., 2004. Upwelling-driven nearshore hypoxia signals ecosystem and oceanographic changes in the northeast Pacific. *Nature* 429, 749–754.
- Grigg, R.W., Hey, R., 1992. Paleoceanography of the tropical eastern pacific ocean. *Science* 255, 172–178.
- Gubili, C., Bilgin, R., Kalkan, E., Karhan, S.Ü., Jones, C.S., Sims, D.W., Kabasakal, H., Martin, A.P., Noble, L.R., 2011. Antipodean white sharks on a Mediterranean walkabout? Historical dispersal leads to genetic discontinuity and an endangered anomalous population. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 278, 1679–86.
- Guo, S.W., Thompson, E.A., 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48, 361–72.
- Haig, S., 1998. Molecular contributions to conservation. *Ecology* 79, 413–425.
- Hall, T., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95–98.
- Hardy, O.J., Charbonnel, N., Fréville, H., Heuertz, M., 2003. Microsatellite allele sizes: a simple test to assess their significance on genetic differentiation. *Genetics* 163, 1467–82.
- Hardy, O.J., Vekemans, X., 2002. Spagedi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* 2, 618–620.
- Harpending, H.C., 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human biology* 66, 591–600.
- Hartl, D., Clark, A., 2007. *Principles of population genetics*, 4th ed. MA: Sinauer associates., Sunderland.
- Hasegawa, M., Kishino, H., T., Y., 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of molecular evolution* 22, 160–174.
- Hedrick, P.W., 2012. Population genetics and ecology, in: Levin, S.A., Carpenter, S.R., Godfray, H.C.J., Kinzig, A.P., Loreau, M., Losos, J.B., Walker, B., Wilcove, D.S., Morris, C.G. (Eds.), *The Princeton Guide to Ecology*. Princeton University Press, p. 848.
- Hedrick, P.W., Hurt, C.R., 2012. Conservation genetics and evolution in an endangered species: research in Sonoran topminnows. *Evolutionary applications* 5, 806–19.

- Hedrick, P.W., Miller, P.S., 1992. Conservation genetics: techniques and fundamentals. *Ecological Applications* 21, 30–46.
- Heist, E.J., Graves, J.E., Musick, J.A., 1995. Population genetics of the sandbar shark (*Carcharhinus plumbeus*) in the Gulf of Mexico and mid-Atlantic Bight. *Copeia* 1995, 555–562.
- Hey, J., Nielsen, R., 2004. Multilocus methods for estimating population sizes, migration rates and divergence time, with applications to the divergence of *Drosophila pseudoobscura* and *D. persimilis*. *Genetics* 167, 747–60.
- Hoelzel, a R., Shivji, M.S., Magnussen, J., Francis, M.P., 2006. Low worldwide genetic diversity in the basking shark (*Cetorhinus maximus*). *Biology letters* 2, 639–42.
- Hoolihan, J.P., Anandh, P., Herwerden, L. Van, 2006. Mitochondrial DNA analyses of narrow-barred Spanish mackerel (*Scomberomorus commerson*) suggest a single genetic stock in the ROPME sea area (Arabian Gulf , Gulf of Oman, and Arabian Sea). *ICES Journal of Marine Science* 63, 1066–1074.
- Hoyos-Padilla, M., 2003. Biología Reproductiva del Tiburón Piloto *Carcharhinus falciformis* (Bibrón, 1839) de Baja California Sur. Tesis de maestría. Centro Interdisciplinarios de Ciencias Marinas.
- Hubisz, M.J., Falush, D., Stephens, M., Pritchard, J.K., 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular ecology resources* 9, 1322–32.
- Huelsenbeck, J.P., Crandall, K.A., 1997. Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28, 437–466.
- Hueter, R.E., Heupel, M.R., Heist, E.J., Keeney, D.B., 2004. Evidence of philopatry in sharks and implications for the management of shark fisheries. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science* 37, 239–247.
- IATTC, 2013. SAC-04 – May 2013: Meeting Report 6. La Jolla, California (USA) 29 April-3 May. 40 p.p.
- Jorgensen, S.J., Reeb, C.A., Chapple, T.K., Anderson, S., Perle, C., Van Sommeran, S.R., Fritz-Cope, C., Brown, A.C., Klimley, P., Block, B., 2010. Philopatry and migration of Pacific white sharks. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 277, 679–88.
- Joung, S.-J., Chen, C.-T., Lee, H.-H., Liu, K.-M., 2008. Age, growth, and reproduction of silky sharks, *Carcharhinus falciformis*, in northeastern Taiwan waters. *Fisheries Research* 90, 78–85.
- Karl, S.A., Castro, A.L.F., Garla, R.C., 2012. Population genetics of the nurse shark (*Ginglymostoma cirratum*) in the western Atlantic. *Marine Biology* 159, 489–498.
- Karl, S.A., Castro, A.L.F., Lopez, J.A., Charvet, P., Burgess, G.H., 2011. Phylogeography and conservation of the bull shark (*Carcharhinus leucas*) inferred from mitochondrial and microsatellite DNA. *Conservation Genetics* 12, 371–382.



- Keeney, D.B., Heist, E.J., 2003. Characterization of microsatellite loci isolated from the blacktip shark and their utility in requiem and hammerhead sharks. *Molecular Ecology Notes* 3, 501–504.
- Keeney, D.B., Heist, E.J., 2006. Worldwide phylogeography of the blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) inferred from mitochondrial DNA reveals isolation of western Atlantic populations coupled with recent Pacific dispersal. *Molecular ecology* 15, 3669–3679.
- Keeney, D.B., Heupel, M.R., Hueter, R.E., Heist, E.J., 2003. Genetic heterogeneity among blacktip shark, *Carcharhinus limbatus*, continental nurseries along the U.S. Atlantic and Gulf of Mexico. *Marine Biology* 143, 1039–1046.
- Keeney, D.B., Heupel, M.R., Hueter, R.E., Heist, E.J., 2005. Microsatellite and mitochondrial DNA analyses of the genetic structure of blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) nurseries in the northwestern Atlantic, Gulf of Mexico, and Caribbean Sea. *Molecular ecology* 14, 1911–23.
- Kelly, R.P., Palumbi, S.R., 2010. Genetic structure among 50 species of the northeastern Pacific rocky intertidal community. *PloS one* 5, 1–13.
- Kennish, M.J., 2001. *Practical Handbook of marine science*, 3rd ed. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Kimura, M., 1983. *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Kluge, A.G., Farris, J.S., 1969. Quantitative Phyletics and the Evolution of Anurans. *Systematic Biology* 18, 1–32.
- Kohin, S., Arauz, R., Holts, D., Vetter, R., 2006. Behavior and habitat preferences of silky sharks (*Carcharhinus falciformis*) and a big eye thresher shark (*Alopias superciliosus*) tagged in the Eastern Tropical Pacific, in: Rojas and Zanela (Ed.), *Memoria 1er Seminario-taller Del Estado Del Conocimiento de La Condriofauna de Costa Rica*. Instituto Nacional de Biodiversidad INBIO., Santo Domingo de Heredia, Costa Rica., pp. 4–6.
- Laird, P.W., Zijderveld, A., Linders, K., Rudnicki, M.A., Jaenisch, R., Berns, A., 1991. Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic acids research* 19, 4293.
- Lanteriy, V.A., Confalonieri, A.A., 2003. Filogeografía: objetivos, métodos y ejemplos, in: Morrone, J.J., Llorente, B.J. (Eds.), *Una Perspectiva Latinoamericana de La Biogeografía*. Las Presas de Ciencias, UNAM, México, D.F.
- Lavery, S., Moritz, C., Fielder, D.R., 1996. Genetic patterns suggest exponential population growth in a declining species. *Molecular biology and evolution* 13, 1106–1113.
- Lavín, M.F., Fiedler, P.C., Amador, J.A., Ballance, L.T., Färber-Lorda, J., Mestas-Nuñez, A.M., 2006. A review of eastern tropical Pacific oceanography: Summary. *Progress in Oceanography* 69, 391–398.

- Lessios, H.A., Kessing, B.D., Robertson, D.R., 1998. Massive gene flow across the world's most potent marine biogeographic barrier. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 265, 583–588.
- Lessios, H.A., Robertson, D.R., 2006. Crossing the impassable: genetic connections in 20 reef fishes across the eastern Pacific barrier. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 273, 2201–8.
- Lewallen, E. a., Anderson, T.W., Bohonak, A.J., 2007. Genetic structure of leopard shark (*Triakis semifasciata*) populations in California waters. *Marine Biology* 152, 599–609.
- Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451–1452.
- Litt, M., Luty, J.A., 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American journal of human genetics* 44, 397–401.
- Manoukis, N.C., 2007. FORMATOMATIC: a program for converting diploid allelic data between common formats for population genetic analysis. *Molecular ecology notes* 7, 592–593.
- Martin, A.P., 1999. Substitution rates of organelle and nuclear genes in sharks: implicating metabolic rate (again). *Molecular biology and evolution* 16, 996–1002.
- Martin, A.P., Naylor, G.J.P., Palumbi, S.R., 1992. Rates of mitochondrial DNA evolution in sharks are slow compared with mammals. *Nature* 357, 153–155.
- Martínez-Ortiz, J., García-Domínguez, M., Cevallos-García, A., Ávila-Zambrano, E., Daza-Bermeo, C., Zambrano-Zambrano, R., M., M.-M., 2011. Estudio de caso: aspectos biológicos pesqueros del tiburón mico o tollo *Carcharhinus falciformis* (Müller y Henle, 1839) en el Ecuador, PAT- EC Grupo Tiburón, Subsecretaría de Recursos Pesqueros (SRP).
- Matsunaga, H., Nakano, H., 1996. CPUE trend and species composition of pelagic shark caught by Japanese research and training vessels in the Pacific Ocean.
- Meekan, M.G., Bradshaw, C.J.A., Press, M., Mclean, C., Richards, A., Quasnicka, S., Taylor, J.G., 2006. Population size and structure of whale sharks *Rhincodon typus* at Ningaloo Reef, Western Australia. *Marine Ecology Progress Series* 319, 275–285.
- Mejuto, J., García-Cortés, B., Ramos-Cartelle, A., 2005. Tagging-recapture activities of large pelagic sharks carried out by Spain or in collaboration with the tagging programs of other countries. *Col.Vol.Sci.Pap.ICCAT* 58, 974–1000.
- Minami, M., Lennert-Cody, C.E., Gao, W., Román-Verdesoto, M., 2007. Modeling shark bycatch: The zero-inflated negative binomial regression model with smoothing. *Fisheries Research* 84, 210–221.

- Mora, C., Chittaro, P.M., Sale, P.F., Kritzer, J.P., Ludsin, S.A., 2003. Patterns and processes in reef fish diversity. *Nature* 421, 933–936.
- Musyl, M.M., Curran, D.S., Fragoso, N.M., McNaughton, L.M., Nielsen, A., Kikkawa, B.S., Moyes, C., 2011. Postrelease survival, vertical and horizontal movements, and thermal habitats of five species of pelagic sharks in the central Pacific Ocean. *Fishery Bulletin* 109, 341–368.
- Nance, H.A., Daly-Engel, T.S., Marko, P.B., 2009. New microsatellite loci for the endangered scalloped hammerhead shark, *Sphyrna lewini*. *Molecular ecology resources* 9, 955–7.
- Nance, H.A., Klimley, P., Galván-Magaña, F., Martínez-Ortiz, J., Marko, P.B., 2011. Demographic Processes Underlying Subtle Patterns of Population Structure in the Scalloped Hammerhead Shark, *Sphyrna lewini*. *PloS one* 6, e21459.
- Nei, M., Kumar, S., 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. New York.
- Nielsen, R., Wakeley, J., 2001. Distinguishing migration from isolation: A Markov chain Monte Carlo approach. *Genetics* 158, 885–896.
- Nylander, J.A.A., 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Center Uppsala University, Uppsala Sweden.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P., 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4, 535–538.
- Oshitani, S., Nakano, H., Tanaka, S., 2003. Age and growth of the silky shark *Carcharhinus falciformis* from the Pacific Ocean. *Fisheries Science* 69, 456–464.
- Ovenden, J.R., Kashiwagi, T., Broderick, D., Giles, J., Salini, J., 2009. The extent of population genetic subdivision differs among four co-distributed shark species in the Indo-Australian archipelago. *BMC evolutionary biology* 9, 40.
- Ovenden, J.R., Street, R., Broderick, D., 2006. New microsatellite loci for Carcharhinid sharks (*Carcharhinus tilstoni* and *C. sorrah*) and their cross-amplification in other shark species. *Molecular Ecology Notes* 6, 415–418.
- Palsbøll, P.J., Bérubé, M., Allendorf, F.W., 2007. Identification of management units using population genetic data. *Trends in ecology & evolution* 22, 11–6.
- Palumbi, S.R., 1994. Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 25, 547–572.
- Palumbi, S.R., 1997. Molecular biogeography of the Pacific. *Coral Reefs* 47–52.

- Pardini, A.T., Jones, C.S., Noble, L.R., Kreiser, B., Malcolm, H., Bruce, B.D., Stevens, J.D., Cliff, G., Scholl, M.C., Francis, M.P., Duffy, C., Martin, A.P., 2001. Sex-biased dispersal of great white sharks. *Nature* 412, 139–40.
- Peakall, R., Smouse, P.E., 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6, 288–295.
- Portnoy, D.S., McDowell, J.R., Heist, E.J., Musick, J.A., Graves, J.E., 2010. World phylogeography and male-mediated gene flow in the sandbar shark, *Carcharhinus plumbeus*. *Molecular ecology* 19, 1994–2010.
- Portnoy, D.S., McDowell, J.R., Thompson, K., Musick, J.A., Graves, J.E., 2006. Isolation and characterization of five dinucleotide microsatellite loci in the sandbar shark, *Carcharhinus plumbeus*. *Molecular Ecology Notes* 6, 431–433.
- Portnoy, D.S., Piercy, A.N., Musick, J.A., Burgess, G.H., Graves, J.E., 2007. Genetic polyandry and sexual conflict in the sandbar shark, *Carcharhinus plumbeus*, in the western North Atlantic and Gulf of Mexico. *Molecular ecology* 16, 187–97.
- Posada, D., Crandall, K.A., 1998. Bioinformatics applications note modeltest: testing the model of DNA substitution. *Evolution* 14, 817–818.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–59.
- Raymond, M., Rousset, F., 1995. GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86, 248–249.
- Reiss, H., Hoarau, G., Dickey-Collas, M., Wolff, W.J., 2009. Genetic population structure of marine fish: mismatch between biological and fisheries management units. *Fish & Fisheries* 10, 361–395.
- Rice, W., 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43, 223–225.
- Rogers, A.R., Harpending, H.C., 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular ecology* 9, 552–569.
- Román-Verdesoto, M., Orozco-Zöller, M., 2005. Bycatches of sharks in the tuna purse-seine fishery of the eastern Pacific Ocean reported by observers of the Inter-American Tropical Tuna Commission, 1993-2004. Data report 11. La Jolla, CA.
- Ronquillo-Benítez, C., 1999. Aspectos biológicos y pesqueros del tiburón Aleta de Cartón, *Carcharhinus falciformis* (Bibrón 1939) de las aguas del Golfo de Tehuantepec, Chiapas, México. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM:
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574.

- Rosenberg, N.A., 2003. Distruct: a Program for the Graphical Display of Population Structure. *Molecular Ecology Notes* 4, 137–138.
- Rozen, S., Skaletsky, H., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 132, 365–86.
- Ruiz, C., 1998. Contribución al conocimiento de la pesquería y biología del tiburón blanco *Carcharhinus falciformis* de las costas del Pacífico de Guatemala. Tesis de Licenciatura en Acuicultura. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala. Centro de Estudios del Mar y Acuicultura. 71 pp.
- Schmidt, J. V, Schmidt, C.L., Ozer, F., Ernst, R.E., Feldheim, K.A., Ashley, M. V, Levine, M., 2009. Low genetic differentiation across three major ocean populations of the whale shark, *Rhincodon typus*. *PloS one* 4, e4988.
- Schrey, A.W., Heist, E.J., 2002. Microsatellite markers for the shortfin mako and cross-species amplification in lamniformes. *Screening* 459–461.
- Schrey, A.W., Heist, E.J., 2003. Microsatellite analysis of population structure in the shortfin mako (*Isurus oxyrinchus*). *Aquaculture* 675, 670–675.
- Schultz, J.K., Feldheim, K.A., Gruber, S.H., Ashley, M. V., McGovern, T.M., Bowen, B.W., 2008. Global phylogeography and seascape genetics of the lemon sharks (genus *Negaprion*). *Molecular ecology* 17, 5336–5348.
- Selkoe, K. a, Toonen, R.J., 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology letters* 9, 615–629.
- Shirai, S., 1996. Phylogenetic interrelationships of neoselachians (Chondrichthyes: Euselachii), in: Stiassny, M.L.J., Parenti, L.R., Johnson, G.D. (Eds.), *Interrelationships of Fishes*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 9–34.
- Shivji, M., Clarke, S., Pank, M., Natanson, L., Kohler, N., Stanhope, M., 2002. Genetic Identification of Pelagic Shark Body Parts for Conservation and Trade Monitoring. *Conservation Biology* 16, 1036–1047.
- Slatkin, M., 1994. Gene flow and population structure., in: Princeton, L.R. (Ed.), *Ecological Genetics*.
- Slatkin, M., 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139, 457–62.
- Sterner, T., 2007. Unobserved diversity, depletion and irreversibility. The importance of subpopulations for management of cod stocks. *Ecological Economics* 61, 566–574.
- Stevens, J.D., 1984. Biological observations on sharks caught by sport fisherman of New South Wales. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 35, 573–590.

- Stoner, D.S., Grady, J.M., Priede, K.A., Quattro, J.M., 2003. Amplification primers for the mitochondrial control region and sixth intron of the nuclear-encoded lactate dehydrogenase A gene in elasmobranch fishes. *Conservation Genetics* 4, 805–808.
- Stow, A.J., Zenger, K.R., Briscoe, D.A., Gillings, M., Peddemors, V.M., Otway, N., Harcourt, R.G., 2006. Isolation and genetic diversity of endangered grey nurse shark (*Carcharias taurus*) populations. *Biology letters* 2, 308–311.
- Strasburg, D., 1958. Distribution, abundance, and habits of pelagic sharks in the central Pacific Ocean. *Fishery Bulletin* 58, 335–361.
- Tajima, F., 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123, 585–595.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution* 28, 2731–2739.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research* 22, 4673–4680.
- Tillett, B.J., Meekan, M.G., Broderick, D., Field, I.C., Cliff, G., Ovenden, J.R., 2012. Pleistocene isolation, secondary introgression and restricted contemporary gene flow in the pig-eye shark, *Carcharhinus amboinensis* across northern Australia. *Conservation Genetics* 13, 99–115.
- Vázquez-Domínguez, E., Castañeda-Rico, S., Garrido-Garduño, T., Gutiérrez-García, T.A., 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.
- Verissimo, a, McDowell, J.R., Graves, J.E., 2010. Global population structure of the spiny dogfish *Squalus acanthias*, a temperate shark with an antitropical distribution. *Molecular ecology* 19, 1651–62.
- Vucetich, J.A., Waite, T.A., 2003. Spatial patterns of demography and genetic processes across the species ' range: Null hypotheses for landscape conservation genetics. *Conservation Genetics* 4, 639–645.
- Wakeley, J., 2005. The limits of theoretical population genetics. *Genetics* 169, 1–7.
- Wang, H., Mehta, V.M., 2008. Decadal variability of the Indo-Pacific warm pool and its association with atmospheric and oceanic variability in the NCEP–NCAR and SODA Reanalyses. *Journal of Climate* 21, 5545–5565.

- Wang, X.W., Trigiano, R.N., Windham, M.T., Devries, R.E., Scheffler, B.E., Rinehart, T. A., Spiers, J.M., 2007. A simple PCR procedure for discovering microsatellites from small insert libraries. *Molecular Ecology Notes* 7, 558–561.
- Waples, R.S., Gaggiotti, O., 2006. What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular ecology* 15, 1419–1439.
- Waples, R.S., Punt, A.E., Cope, J.M., 2008. Integrating genetic data into management of marine resources: how can we do it better? *Fish & Fisheries* 9, 423–449.
- Watson, J.T., Essington, T.E., Lennert-Cody, C.E., Hall, M.A., 2009. Trade-offs in the design of fishery closures: management of silky shark bycatch in the eastern Pacific Ocean tuna fishery. *Conservation biology* 23, 626–35.
- WCPFC, 2008. Estimates of annual catches in the WCPFC statistical area, Area. WCPFCSC4-2008/ST-IP-1, Port Moresby, Papua New Guinea.
- WCPFC, 2012. Progress on the updated silky shark stock assessment in the WCPO (WCPFC9-2012-IP-13). Commission ninth regular session. Manila, Philippines 2-6 December 2012
- Whitney, N.M., Robbins, W.D., Schultz, J.K., Bowen, B.W., Holland, K.N., 2011. Oceanic dispersal in a sedentary reef shark (*Triacnodon obesus*): genetic evidence for extensive connectivity without a pelagic larval stage. *Journal of Biogeography* 39, 1144–1156.
- Wilkinson, M., 1996. Majority-Rule reduced consensus trees and their use in bootstrapping. *Molecular biology and evolution* 13, 437–44.
- Wilson, G.A., Rannala, B., 2003. Bayesian Inference of Recent Migration Rates Using Multilocus Genotypes. *Genetics* 163, 1177–1191.
- Yang, Z., Rannala, B., 1997. Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: a Markov Chain Monte Carlo Method. *Molecular Biology and Evolution* 14, 717–724.
- Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T., 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular ecology* 11, 1–16.
- Zhu, J., Dai, X., Xu, L., 2011. Reproductive information of silky shark (*Carcharhinus falciformis*) in the central and eastern Pacific Ocean. Inter-american tropical tuna commission. 2nd technical meeting on sharks. La Jolla, California, USA.

## 11. TABLAS Y FIGURAS

**Tabla 1.** Parámetros de la historia de vida reportados para *C. falciformis* en el Océano Pacífico.

REGIÓN	LT Madurez (cm)		Edad Madurez (años)		AUTOR
	H	M	H	M	
Oriental					
Guatemala	176	178			(Ruiz, 1998)
Golfo de Tehuantepec	140	180			(Ronquillo-Benítez, 1999)
	190	180			(Galván-Tirado, 2007)
Golfo de California	178	178			(Cadena-Cárdenas, 2001)
Ecuador	205	184			(Martínez-Ortiz et al., 2011)
Costa occidental de B.C.S	180	180	7-8		(Hoyos-Padilla, 2003)
Central					
	213-218	-			(Strasburg, 1958)
	193-200	180-187	6-7	5-6	(Oshitani et al., 2003)
	155 LF	146 LF			(Zhu et al., 2011)
Occidental					
Este de Australia	202-208	214			(Stevens, 1984)
Norte de Australia	215	210			(Stevens y McLoughlin, 1991)
	210-220	175-205	9.2-10.2	9.3	(Joung et al., 2008)



**Tabla 2.** Número de muestras colectadas por año y por sitio de muestreo de *C. falciformis*. La ubicación de la muestra fue obtenida de las coordenadas geográficas del sitio de muestreo en la zona costera y por medio de geoposicionamiento satelital en la zona oceánica.

Región	Sitio	Codigo	Año	No. de muestras	Latitud	Longitud
<b>Océano Pacífico Oriental</b>		<b>OPO</b>		<b>242</b>		
	Baja California Sur	BCS		40		
	Punta Arenas	PA	2002	2	24.05	-109.82
	Punta Belcher	PB	2002	20	24.59	-112.07
	Punta Lobos	PL	2001	18	23.42	-110.26
	Golfo de Tehuantepec	GT		147		
	Puerto Escondido	PE	2002	29	15.83	-97.08
	San Agustínillo	SA	2005	23	15.65	-96.54
	Chipehua	CH	2004	19	16.03	-95.36
	Puerto Madero	PM	2005	76	14.71	-92.43
	Costa Rica	CR	2008	18	9.26	-84.25
	Ecuador	EC	2008	37	-0.91	-80.7
<b>Zona Oceánica</b>		<b>ZO</b>		<b>66</b>		
	Grupo OAB	OAB		10		
	Sitio A	A	2005	3	8.42	-99.17
	Sitio B	B	2003	7	4.42	-103.38
	Grupo OC-G	OC-G		56		
	Sitio C	C	2004	14	6.53	-123.88
	Sitio D	D	2004	10	5.16	-125.31
	Sitio E	E	2004	18	4.26	-126.28
	Sitio F	F	2004	10	4.19	-131.03
	Sitio G	G	2004	4	3.04	-129.2
<b>Océano Pacífico Occidental</b>		<b>OPOc</b>		<b>45</b>		
	Nueva Caledonia	NC	2004	8	-20.90	165.61
	Indonesia	IN	2001-05	37	-5.0	112.5

**Tabla 3.** Iniciadores internos diseñados para la amplificación de un fragmento de la región control del mtADN en *C. falciformis*.

Locus	Secuencias del iniciador (5'-3')	Tm
Cfalc584-R	GGGGAATAGCGATTTGCTTC	58
Cfalc797-R	TTTCCGAGAGGGTTAATCACA	58
Cfalc806-R	GGAGGTTTCTTTCCGAGAGG	58

**Tabla 4.** Iniciadores de *C. limbatus* y *C. plumbeus* que fueron utilizados para la amplificación cruzada de microsatélites en *C. falciformis* y rangos alélicos esperados.

Locus	Secuencias del iniciador	Rango (pb)
Cli-7	F: TAGCACACAGCCCCATCACT R: TGTGGTGTGAGCCTCATTC	188-258
Cli-12	F: TCCCAGTCACATTTACACATGC R: GGAAGACCATTGAACCCAATC	184-194
Cli-100	F: TAATCGTGCTGGGTGCGGTTCC R: CAGATAACACATACTTGACGGAGC	210-214
Cli-103	F: GCTTCATTCCATGAGAG R: TTTCTCTGTCCTGGTGTTTC	118-124
Cli-106	F: GATTCTACAACCGCAACATTG R: GCTCCCCTAACTATTCCACGC	179
Cli-107	F: GGATTCACAACACAGGGAAC R: CTCATTCTTAGTTGCTCTCG	105-113
Cli-112	F: AGAGAGGGAGGAAGGTGGGC R: TCACGGTTTCTTTCAACTCTCCC	81-87
Cli-119	F: GACCTGAAACAGCAATGGG R: TGTTCTTGAGTCGGTCGG	189-203
Cpl-6	F: ACCAGCAGGCATCTCAAACA R: CTTTAGCTCCCGCATCAGAG	151-153
Cpl-38	F: TCCAAGCTGGGAATTGAAC R: CTGCCGAAAGAGTTGAAGG	299-301
Cpl-39	F: TACCTGCCACAAAACCTGAC R: GCCTT" TACAGATGCCAGTGA	277-283

**Tabla 5.** Condiciones óptimas de amplificación cruzada de loci microsatélites en *C. falciformis*. Los loci marcados con \* fueron utilizados para el análisis de los datos.

Locus	Tm	MgCl2	Tamaño (pb)
Cli7	60	2	188-258
Cli106 *	62	2	179
Cli107 *	62	1.5	105-113
Cli112	58	1.5	81-87
Cli119 *	60	2	189-203
Cpl6	56	2	151-153

**Tabla 6.** Iniciadores para la amplificación de 25 loci de microsatélites específicos para *C. falciformis*. El locus marcado con \* fue utilizado para el análisis de los datos.

Locus	Motivo repetido	Iniciadores (5'--3')	Ta(°C)	Talla (pb)
Cfal1	(CA)5	F-ACCCAGTCTATGGTATCCAA R-CGTTTCATCTGTTTGTGAGAG	54	250
Cfal2	(TG)11	F-CTGAATGGGAAGGAGTTTT R-CTTGCTAGCAGAAGCACAT	54	153
Cfal3	(TC)12	F-CTAAGGCCCTTGCTAGGAGAA R-GGAGTGTGGGGTGGTTAC	56	107
Cfal4	(GT)21(GA)6	F-CCTACTCCTGCTCCTACTTC R-TTTCTCCCCATCTCTCTA	54	186
Cfal5	(CAGA)7(GGCA)5	F-TAGCAGAAGCACATTCACAT R-ACGTTGACACCTTGGAAATAC	54	130
Cfal6	(CA)10GA(CA)3	F-AATCCCCAATTAGGTTTCATA R-TAGCAGAAGCACAATCTGTT	54	150
Cfal7	(GA)20	F-GTTTTGACAGAACACAGTGC R-GAATACGCCCTCCTAAGAC	54	230
Cfal8	(GA)25	F-GGGTCAGAATCCTTACTTCA R-ACTCCTCTATCCACGCTAAC	54	105
Cfal9	(GA)8	F-TGTCAGAAGTCAGGCTTACA R-ACACCTTGAAATATCCATCC	54	131
Cfal10	(CT)8	F-GAACCATTCAAGTCGACAC R-CTCAAGTGTCAGAAGTCAGG	53	152
Cfal11 *	(AG)8	F-GAAGGCCTCGGTAAGTTT R-GATTGGCGGTAATCTCTG	54	101
Cfal12	(CA)9GA(CA)6	F-AGCAGAAGCACAAATAGGTG R-CCTTGCTAGCAGAAGCTG	54	100
Cfal13	(CA)20	F-CTAAACTGCACATCTTTGGA R-TACACGGAGTCAATTCTGTC	53	156
Cfal14	(CT)11	F-CACTGACAGGCATCCATT R-CTAGCAGAAGCGTTTCATAA	54	120
Cfalc38	(AG)20AC(AG)10AC(AG)5	F-ACAGAACACAGTGCCACAGC R-GCTGGAATTCGCCCTTCTA	60	228
Cfalc39	(TC)25	F-CAATCCGAATAGCACCCACT R-TCCCCATCCTCAATCTTCTG	60	176
Cfalc50	(CA)11	F-GCCATGACATGAATCGACTG R-GCCTTGCTAGCAGAAGCATT	60	185
Cfalc64	(GT)20	F-GTTAGCACTGCTGCCTCACA R-AATTTACCATGGCCAATCCA	60	205
Cfalc110	(GT)5	F-ATACAGAAAGCTGGCGGATG R-CCTTGCTAGCAGAAGCACCT	60	160
Cfalc123	(AC)25	F-AGCAGCAGCACAGGTAGGAA R-CAAATGGCACAGCTTACACG	60	206
Cfalc124	(TG)5	F-AGTCTAAAATGCAGTTTGTCTAAA R-AAAAGAAAGGGGGACGTTGT	59	216
Cfalc130	(TC)13	F-CCCCTTTCCCATTGTTTCTT R-GCTAGCAGAAGCCTCCTTGA	60	245
Cfalc147	(CA)25	F-CGCAGTTACGTTTACACACACA R-CGTGTGCCTCTATGTGCATC	60	206
Cfalc162	(GT)8	F-CTCTGAATGCTTGGGGGTAA R-TATCTGCCCGTGTCCAT	60	150
Cfalc177	(CA)6	F-CATTATATACCCCGCACACAC R-GCCTTGCTAGCAGAAGCCTA	59	185

**Tabla 7.** Sitios polimórficos y posición de los mismos en los haplotipos encontrados de *C. falciformis*. Para el haplotipo Cf-1 se indica el nucleótido para cada posición, sólo los nucleótidos diferentes del Cf-1 se muestran para el resto de los haplotipos. Los nucleótidos idénticos al Cf-1 son indicados con puntos (.).

Haplotipo	Posición nucleotídica									
	155	176	190	248	267	330	363	446	507	526
Cf-1	A	C	A	G	T	C	T	G	T	T
Cf-2	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.
Cf-3	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.
Cf-4	.	.	.	.	C	.	.	.	.	G
Cf-5	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.
Cf-6	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
Cf-7	.	.	G	.	C	.	.	.	.	G
Cf-8	.	T	.	.	C	.	.	.	.	G
Cf-9	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.
Cf-10	G	T	.	.	C	.	.	.	.	G
Cf-11	.	.	.	.	.	.	C	A	.	.
Cf-12	.	.	.	.	.	T	.	.	C	.
Cf-13	G	.	.	.	C	.	.	.	.	G
Cf-14	G	.	G	.	C	.	.	.	.	G

**Tabla 8.** Diversidad genética del fragmento de la región control del ADNmt analizado en *C. falciformis* por sitio de muestreo: N = número de muestras, H = número de haplotipos, S = número de sitios polimórficos, h= diversidad haplotípica,  $\pi$  = diversidad nucleotídica, S.D. = desviación estándar.

Localidad	N	H	S	h $\pm$ SD	$\pi \pm$ SD
OPO	242	9	10	0.439 $\pm$ 0.04	0.0008 $\pm$ 0.0007
BCS	40	3	2	0.312 $\pm$ 0.09	0.0005 $\pm$ 0.0005
GT	147	8	9	0.441 $\pm$ 0.04	0.0008 $\pm$ 0.0007
CR	18	3	2	0.451 $\pm$ 0.1	0.0007 $\pm$ 0.0001
EC	37	6	6	0.565 $\pm$ 0.08	0.0012 $\pm$ 0.0002
ZO	66	7	7	0.529 $\pm$ 0.060	0.0011 $\pm$ 0.0002
OAB	10	2	1	0.533 $\pm$ 0.095	0.0007 $\pm$ 0.0007
OC-G	56	7	7	0.529 $\pm$ 0.086	0.0011 $\pm$ 0.0009
OPOc	45	7	7	0.610 $\pm$ 0.07	0.002 $\pm$ 0.001
NC	8	4	4	0.750 $\pm$ 0.139	0.0019 $\pm$ 0.0015
IN	37	7	7	0.586 $\pm$ 0.083	0.0016 $\pm$ 0.0012
Total	353	14	10	0.480 $\pm$ 0.03	0.0009 $\pm$ 0.00008

**Tabla 9.** Número y frecuencia relativa de haplotipos por sitio de muestreo.

Sitio	Haplotipo													
	Cf-1	Cf-2	Cf-3	Cf-4	Cf-5	Cf-6	Cf-7	Cf-8	Cf-9	Cf-10	Cf-11	Cf-12	Cf-13	Cf-14
BCS	33	4	3											
GT	108	20	7	4	3	3			1	1				
CR	13	4	1											
EC	23	9	2	1	1		1							
OPO	177	37	13	5	4	3	1		1	1				
OAB	6	4												
OC_G	37	11	2	2			2				1	1		
ZO	43	15	2	2			2				1	1		
IN	23	7	2	1				2					1	1
NC	4	1	1	2										
OPOc	27	8	3	3				2					1	1
Fr (%)	70	17	5.1	2.8	1.1	0.9	0.9	0.6	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3

**Tabla 10.** Estimaciones de diferenciación genética de  $F_{ST}$  para la región control (debajo de la diagonal) y para microsatélites (arriba de la diagonal) entre pares de localidades. Los números con un asterisco fueron estadísticamente significativos antes de la corrección de Bonferroni, los números con dos asteriscos permanecieron estadísticamente significativos después de la corrección de Bonferroni.

	BCS	GT	CR	EC	OAB	OC-G	IN	NC
BCS	-	0.004	0.014	0.024*	-0.012	-0.001	0.018	0.048*
GT	-0.006	-	-0.003	0.008	0.003	-0.003	0.045**	0.020
CR	0.001	-0.012	-	-0.016	0.007	0.005	0.071	0.039
EC	0.024	0.005	-0.031	-	0.003	0.013*	0.078**	0.077*
OAB	0.166*	0.071	-0.008	-0.017	-	0.001	0.010	0.050
OC-G	0.018	0.004	-0.021	-0.021	0.002	-	0.036**	0.018
IN	0.043*	0.025*	0.005	-0.004	0.023	-0.007	-	0.117*
NC	0.16*	0.088	0.091	0.032	0.115	0.015	-0.043	-

**Tabla 11.** Análisis espacial de varianza molecular (SAMOVA) de estructura genética poblacional para la región control y loci microsatélites. Los valores en negritas indican que el valor del estadístico F es significativamente diferente de cero,  $P < 0.05$ .

<b>Región control</b>					<b>Microsatélites</b>				
Modelos	Composición del grupo	$F_{CT}$	$F_{ST}$	$F_{SC}$	Composición del grupo	$F_{CT}$	$F_{ST}$	$F_{SC}$	
2	Otros OC-G	-0.013	0.002	0.014	Otros OC-G	0.030	0.030	-0.001	
3	Otros NC OC-G	0.001	0.011	0.010	Otros IN OC-G	0.028	0.022	-0.006	
4	Otros OAB NC OC-G	0.009	0.015	0.006	Otros BCS IN OC-G	0.026	0.010	-0.017	
5	NC/EC/CR BCS GT OAB/OC-G IN	-0.003	0.010	0.013	OAB/EC/CR/NC BCS GT OC-G IN	0.031	0.004	-0.028	



**Tabla 12.** Análisis jerárquico de varianza molecular (AMOVA) de la región control del ADNmt y los microsatélites (fondo gris). Los valores con asterisco indican que el valor del estadístico  $F$  es significativamente diferente de cero,  $P < 0.05$ .

Estructura probada	Fuente de Variación	Componente de la Varianza	Porcentaje de variación	Estadístico $F$	Valor $P$
A. Sur-Norte	Entre grupos	0.004	1.21	0.0121	0.090
		-0.001	-0.28	-0.003	0.414
	Entre poblaciones dentro de grupos	0.002	0.43	0.004	0.335
		0.007	1.48	0.015*	0.001
	Dentro de las poblaciones	0.345	98.36	0.016	0.106
		0.481	98.80	0.012*	0.001
B. Oriente-Occidente	Entre grupos	0.012	3.38	0.034*	0.032
		0.011	2.24	0.022	0.070
	Entre poblaciones dentro de grupos	-0.00002	-0.01	-0.0001	0.481
		0.004	0.72	0.007*	0.022
	Dentro de las poblaciones	0.345	96.62	0.034	0.110
		0.481	97.04	0.030*	0.001
B. Oriente-Centro-Occidente	Entre grupos	0.008	2.22	0.022*	0.024
		0.003	0.51	0.005	0.244
	Entre poblaciones dentro de grupos	-0.001	-0.39	-0.004	0.655
		0.005	1.05	0.011*	0.011
	Dentro de las poblaciones	0.345	98.18	0.018	0.100
		0.481	98.44	0.016*	0.001
C. Suroriente-Suroccidente-Nororiente-Norcentro	Entre grupos	0.008	2.29	0.023*	0.017
		0.002	0.40	0.004	0.290
	Entre poblaciones dentro de grupos	-0.003	-0.8	-0.008	0.769
		0.005	1.05	0.011*	0.028
	Dentro de las poblaciones	0.345	98.51	0.015	0.106
		0.481	98.55	0.014*	0.000

**Tabla 13.** Parámetros de demografía histórica por región para *C. falciformis*. Los números en negritas fueron estadísticamente significativos,  $P < 0.05$ .

		Región		
		OPO	ZO	OPOc
Parámetros de expansión demográfica	$\tau$	0.56	0.74	0.22
	$\theta\theta$	0.018	0	0
	$\theta I$	99999	51.58	99999
	Edad en años	47,694	63,203	19,011
	<i>SSD</i>	0.002	0.003	0.21
	<i>Hri</i>	0.13	0.08	0.05
	Parámetros de expansión espacial	$\tau$	0.57	0.5
$\theta$		0.01	0.29	1.04
<i>M</i>		99999	99999	99999
Edad en años		48,241	42,691	19,467
<i>SSD</i>		0.002	0.002	0.004
<i>Hri</i>		0.13	0.13	0.05
Pruebas de neutralidad	<i>D</i>	-1.5	-1.12	-0.71
	<i>F<sub>s</sub></i>	-4.67	-2.38	-1.55

**Tabla 14.** Comparación del desequilibrio de ligamiento gamético por pares de loci microsatélite en *C. falciformis* ( $P < 0.0083$  probabilidad marginal después de la corrección con Bonferroni).

Locus	Locus	<i>P</i>
Cli106	Cli107	0.108
Cli106	Cli119	0.292
Cli106	Cf11	0.008
Cli107	Cli119	0.658
Cli107	Cf11	0.183
Cli119	Cf11	0.575

**Tabla 15.** Valores de probabilidad resultantes de la prueba exacta de equilibrio Hardy-Weinberg y de exceso/déficit de heterocigotos, por locus y por localidad. Los valores en negritas fueron estadísticamente significativos después de la corrección de Bonferroni.

	<b>Prueba de probabilidad</b>				<b>Exceso de heterocigotos</b>				<b>Déficit de heterocigotos</b>			
	Cli106	Cli107	Cli119	Cf11	Cli106	Cli107	Cli119	Cf11	Cli106	Cli107	Cli119	Cf11
BCS	0.988	0.200	0.175	0.346	0.421	0.895	0.930	0.726	0.598	0.111	0.141	0.348
GT	0.036	0.150	0	0.175	0.809	0.635	0.995	0.750	0.181	0.468	0	0.252
CR	0.756	0.265	0.136	0.714	0.739	0.954	0.853	0.791	0.275	0.117	0.282	0.412
EC	0.401	0.239	<b>0.001</b>	0.038	0.747	0.498	0.967	0.910	0.257	0.561	0.039	0.136
OAB	0.027	0.444	0.015	1	0.994	0.941	0.969	0.514	0.013	0.198	0.025	1
OC-G	0.587	0.544	<b>0.003</b>	0.049	0.023	0.289	0.959	0.991	0.980	0.723	0.087	<b>0.008</b>
NC	0.394	0.957	0.322	0.131	0.920	0.647	0.972	0.039	0.381	0.760	0.171	1
IN	0.647	0.277	0.077	0.525	0.836	0.609	0.862	0.867	0.237	0.429	<b>0.120</b>	0.365

**Tabla 16.** Índices de diversidad genética estimada mediante cuatro loci de microsatélites en *C. falciformis*. Se muestra por cada localidad y locus: tamaño de muestra ( $N$ ), número de alelos ( $Na$ ), alelos efectivos ( $Ne$ ), heterocigocidad observada ( $Ho$ ), heterocigocidad esperada ( $He$ ), índice de fijación ( $F$ ) y riqueza alélica ( $R$ ) por localidad y loci.

Localidad	Locus	$N$	$Na$	$Ne$	$Ho$	$He$	$F$	$R$
BCS	Cli106	41	6	1.951	0.512	0.488	-0.051	4.763
	Cli107	29	10	6.596	0.759	0.848	0.106	6
	Cli119	36	16	6.803	0.750	0.853	0.121	7.62
	Cf11	39	5	1.623	0.359	0.384	0.065	3.008
GT	Cli106	143	9	2.481	0.601	0.597	-0.007	5.002
	Cli107	102	13	6.798	0.853	0.853	0.000	6.129
	Cli119	133	23	11.094	0.865	0.910	0.050	7.417
	Cf11	143	5	1.996	0.503	0.499	-0.009	2.925
CR	Cli106	18	7	3.240	0.778	0.691	-0.125	4.133
	Cli107	6	6	5.538	0.667	0.819	0.186	6
	Cli119	18	12	8.640	0.833	0.884	0.058	6.282
	Cf11	18	4	1.895	0.444	0.472	0.059	3.222
EC	Cli106	34	8	3.385	0.647	0.705	0.082	3.952
	Cli107	33	9	6.331	0.848	0.842	-0.008	5.803
	Cli119	38	14	8.805	0.737	0.886	0.169	7.947
	Cf11	39	5	1.771	0.385	0.435	0.116	2.828
OAB	Cli106	14	6	2.240	0.357	0.554	0.355	3.379
	Cli107	6	6	4.500	0.667	0.778	0.143	6.209
	Cli119	13	10	4.333	0.615	0.769	0.200	6.925
	Cf11	14	5	1.587	0.429	0.370	-0.159	2.746
OC-G	Cli106	60	8	2.261	0.633	0.558	-0.135	4.041
	Cli107	48	9	6.008	0.875	0.834	-0.050	6.113
	Cli119	51	20	10.383	0.784	0.904	0.132	7.838
	Cf11	59	4	1.933	0.492	0.483	-0.018	3.07
NC	Cli106	8	4	1.707	0.375	0.414	0.094	3.45
	Cli107	7	7	4.667	0.857	0.786	-0.091	6.418
	Cli119	8	12	10.667	0.875	0.906	0.034	9.8
	Cf11	7	3	2.649	1.000	0.622	-0.607	3
IN	Cli106	34	6	1.503	0.324	0.335	0.034	2.827
	Cli107	14	8	5.521	0.857	0.819	-0.047	5.848
	Cli119	30	14	7.258	0.767	0.862	0.111	6.885
	Cf11	34	4	1.348	0.235	0.258	0.089	2.161
Total		363	8.688	4.610	0.646	0.669	0.028	5.117

**Tabla 1.** Tasas de migración reciente entre pares de localidades estimadas mediante BayesAss expresadas como  $M$ =tasa de migración escalada por la mutación.

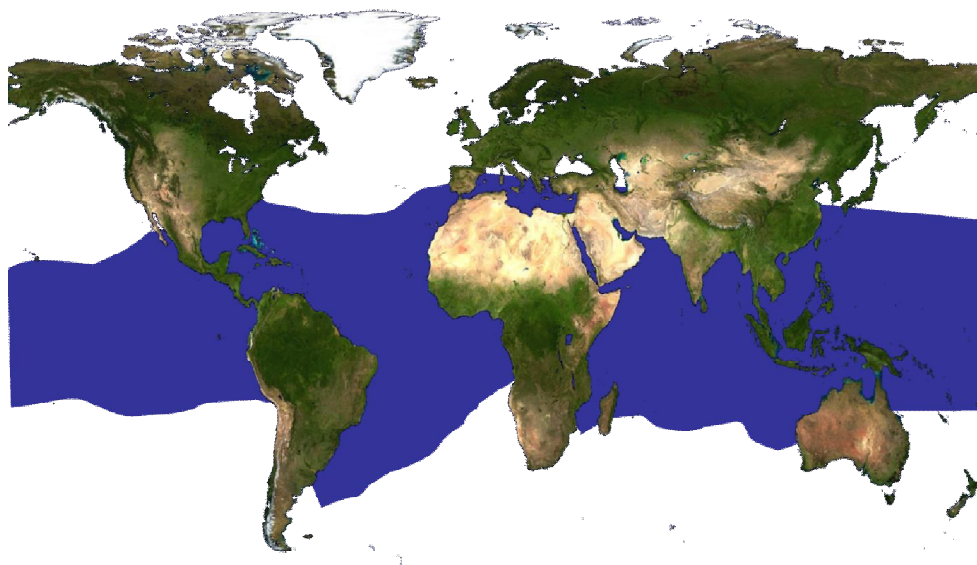
		<b>Localidad receptora de migrantes</b>							
		BCS	GT	CR	EC	OAB	OC-G	NC	IN
<b>Localidad emisora de migrantes</b>	BCS		0.005	0.01	0.006	0.023	0.004	0.023	0.004
	GT	0.055		0.024	0.016	0.014	0.014	0.11	0.007
	CR	0.005	0.003		0.004	0.011	0.003	0.018	0.003
	EC	0.006	0.016	0.01		0.044	0.005	0.022	0.004
	OAB	0.006	0.004	0.01	0.005		0.004	0.019	0.004
	OC-G	0.154	0.188	0.079	0.19	0.02		0.081	0.108
	NC	0.005	0.003	0.008	0.004	0.01	0.003		0.004
	IN	0.088	0.093	0.175	0.02	0.071	0.058	0.026	

**Tabla 18.** Diversidad genética reportada para otras especies de tiburones. RC = Región control del mtADN,  $N$  = número de muestras,  $H$  = número de haplotipos,  $h$  = diversidad haplotípica,  $\pi$  = diversidad nucleotídica,  $H_o$  = heterocigocidad observada,  $H_e$  = heterocigocidad esperada,  $F_{ST}$  = coeficiente de diferenciación para datos de región control,  $F_{ST}$  = coeficiente de diferenciación para datos de microsatélites. GM = Golfo de México, A = Atlántico.

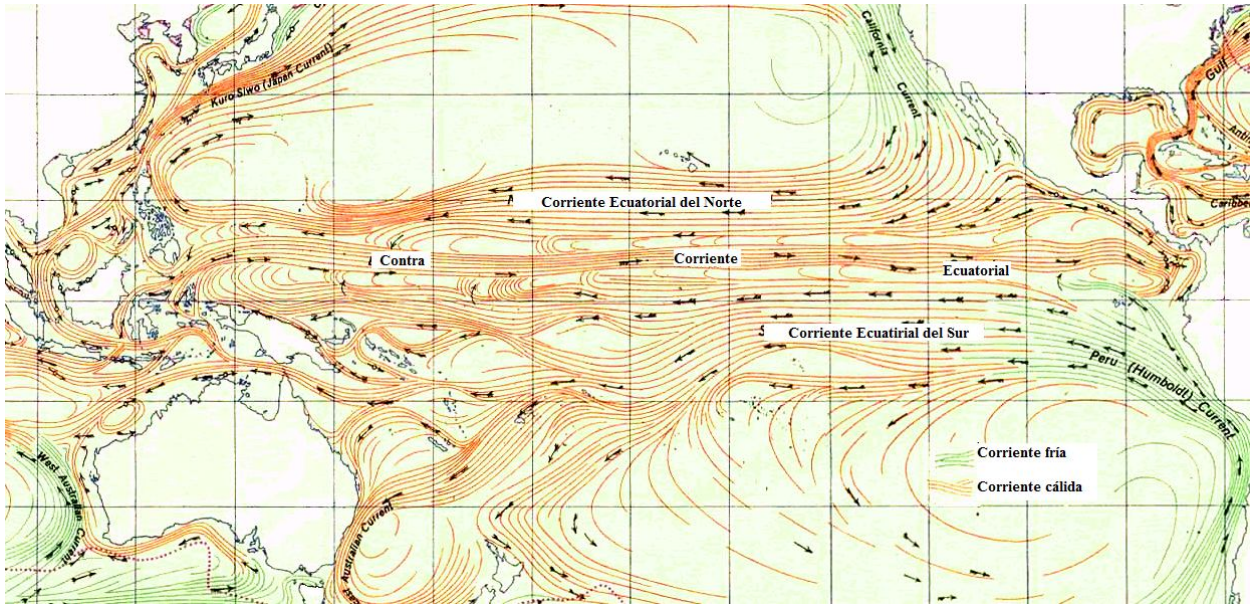
Especie	Marcador	Zona	$N$	$H$	$h$	$\pi$	$H_o$	$H_e$	$F_{ST}$	$F_{ST}$	Autor
<i>Carcharhinus falciformis</i>	RC-Micros	Pacífico	353	14	0.48	0.0009	0.646	0.669	0.002	0.001	Este trabajo
<i>Carcharhinus limbatus</i>	RC-Micros	GM,A	323	23	0.81	0.002	0.500	0.500	0.350	0.007	Keeney et al. (2005)
	RC	Global	364	37	0.84	0.004					Keeney y Heist (2006)
<i>Carcharhinus plumbeus</i>	RC-Micros	Global	329	67	0.959	0.005			0.655	0.058	Portnoy et al. (2010)
<i>Carcharhinus obscurus</i>	RC	Global	255	25	0.84	0.005			0.55		Benavides et al. (2011)
<i>Carcharhinus leucas</i>	RC-Micros	Atlántico	102	14	0.76	0.003	0.833	0.844		0.002	Karl et al. (2011)
<i>Sphyrna lewini</i>	RC	Global	271	24	0.80	0.013			0.660		Duncan et al. (2006)
	RC-Micros	EPO	221	7	0.53	0.001	0.77	0.79	0.031	0.005	Nance et al. (2011)
<i>Negaprion brevirostris</i>	RC-Micros	Global	80	11	0.78	0.006			0.99		Schultz et al. (2008)
<i>Negaprion acutidens</i>	RC-Micros	Global	58	4	0.28	0.0006			0.77		Schultz et al. (2008)
<i>Carcharodon carcharias</i>	RFLP-Micros	Indico	95	29	-	0.020			0.8		Pardini et al. (2001)
	RC	Pacífico	59	20	0.79	0.001			0.68		Jorgensen et al. (2010)
<i>Carcharias taurus</i>	RC-Micros	Global	193	9	0.73	0.004	0.65	0.74	0.295	0.032	Ahonen et al. (2009)
<i>Cetorhinus maximus</i>	RC	Global	62	6	0.72	0.001			-		Hoelzel et al. (2006)
<i>Galeorhinus galeus</i>	RC	Global	116	38	0.92	0.007			0.84		Chabot y Allen (2009)
<i>Rhincodon typus</i>	RC	Global	70	44	0.9-1	0.007			0.107		Castro et al. (2007)
<i>Stegostoma fasciatum</i>	ND4-Micros	Indo-Pacífico	75	8	0.72	0.14		0.91	0.439	0.065	Dudgeon et al. (2009)



**Figura 1.** Tiburón piloto *Carcharhinus falciformis*. Fotografía tomada por George Burgess (<http://www.flmnh.ufl.edu/fish/Gallery/Descript/silkyshark/silkyshark.html>).

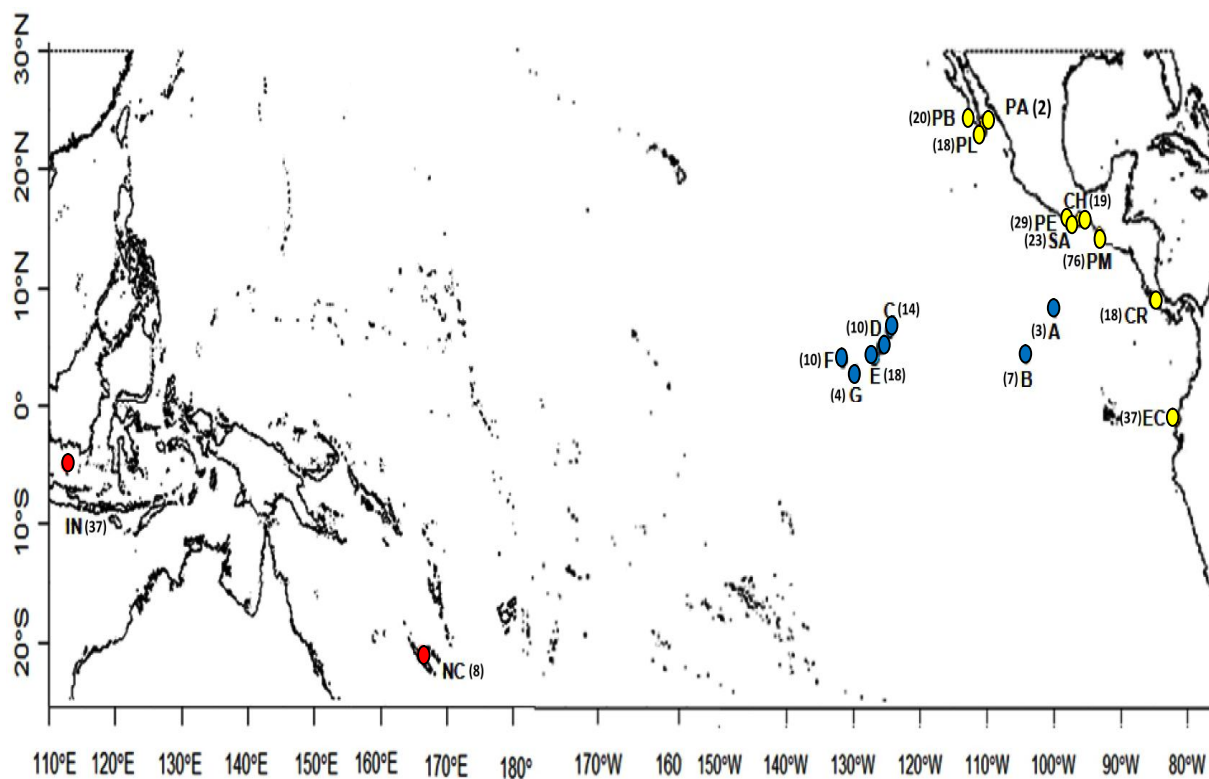


**Figura 1.** Área geográfica de distribución potencial del tiburón piloto *C. falciformis*.

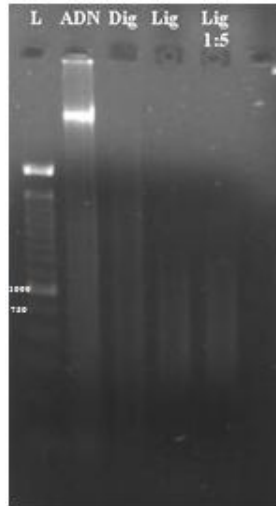


**Figura 3.** Sistema de corrientes en el Océano Pacífico. Modificado de: [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/67/Ocean\\_currents\\_1943\\_%28borderless%293.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/67/Ocean_currents_1943_%28borderless%293.png).

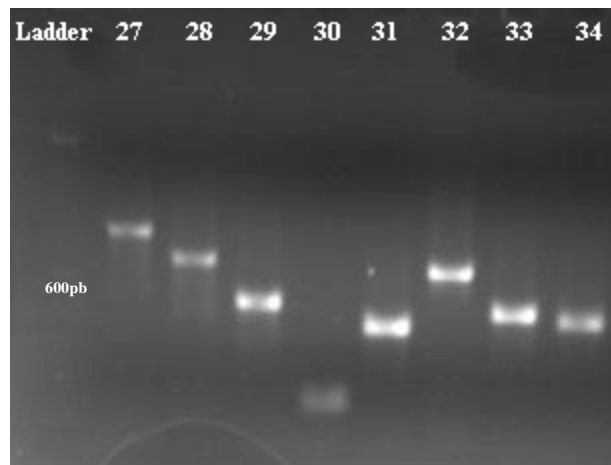




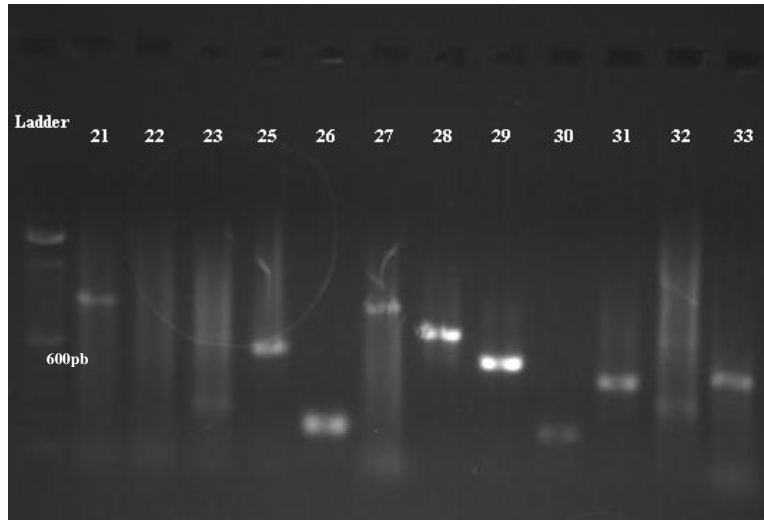
**Figura 4.** Localización geográfica de los sitios de muestreo. (Cada punto en la zona oceánica representa un lance de pesca, los puntos cercanos a la costa representan un punto de captura en la zona costera. Los códigos son de acuerdo a la Tabla 1. Los colores refieren a la región considerada: OPO (amarillo), ZO (azul) y OPOc (rojo).



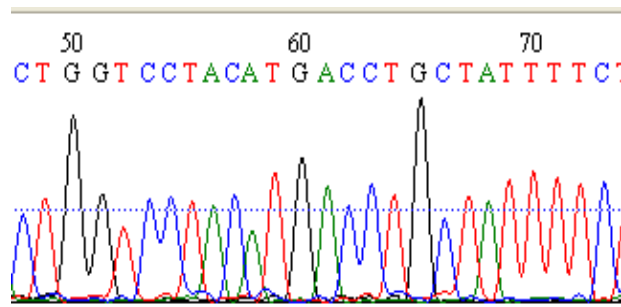
**Figura 5.** Imagen que muestra la extracción de ADN de la muestra con mayor calidad y concentración (ADN), así como su digestión (Dig) y ligación del ADN directo y diluido (Lig y Lig 1:5) exitosa del ADN<sub>g</sub> de *C. falciformis*. Se puede observar que tanto la ligación del ADN directo como la ligación muestran un barrido más intenso entre 300 y 1000 pb.



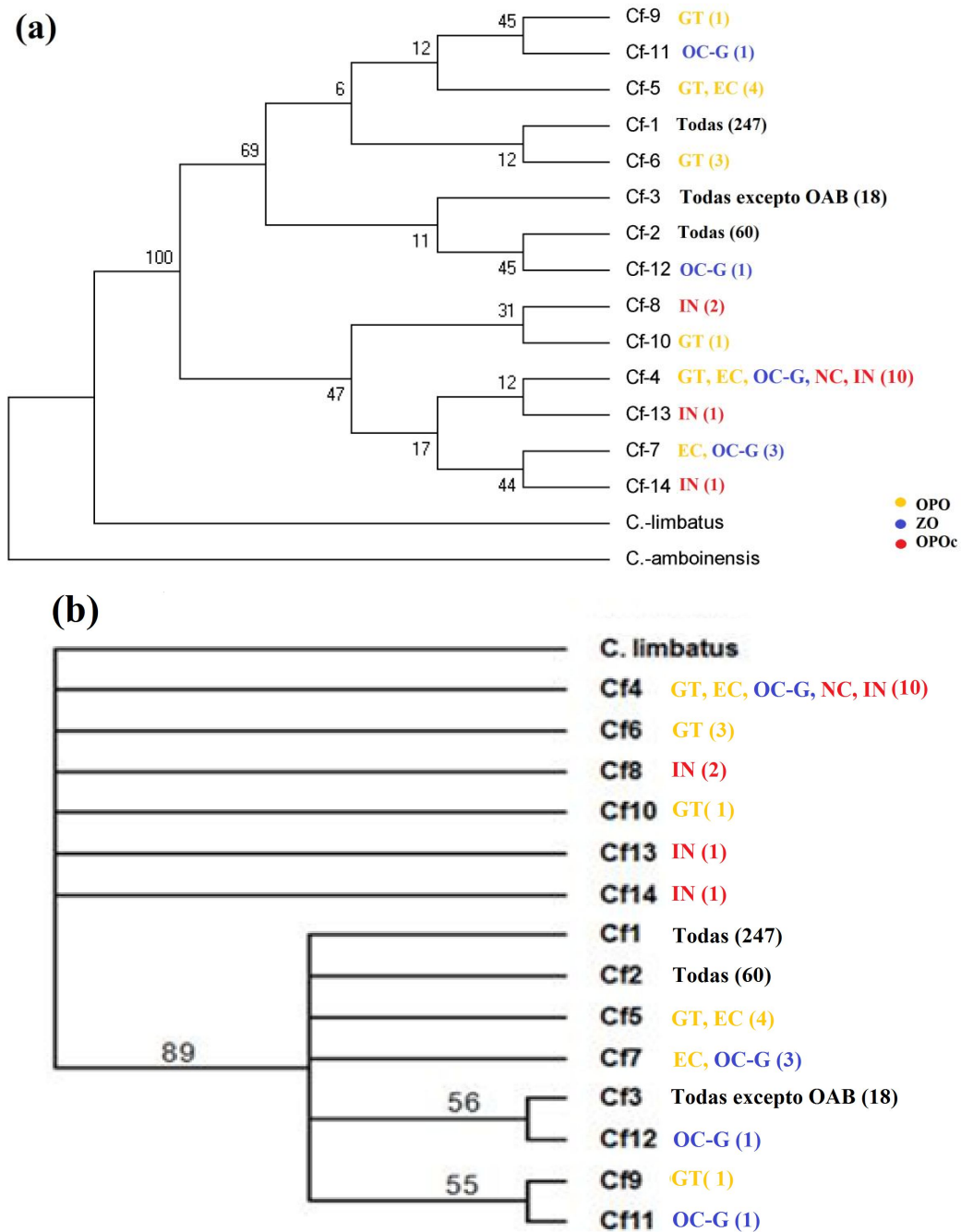
**Figura 6.** Gel de agarosa mostrando inserto con motivo GT de distinto tamaño indicando bandas con distintos tamaños de inserto.



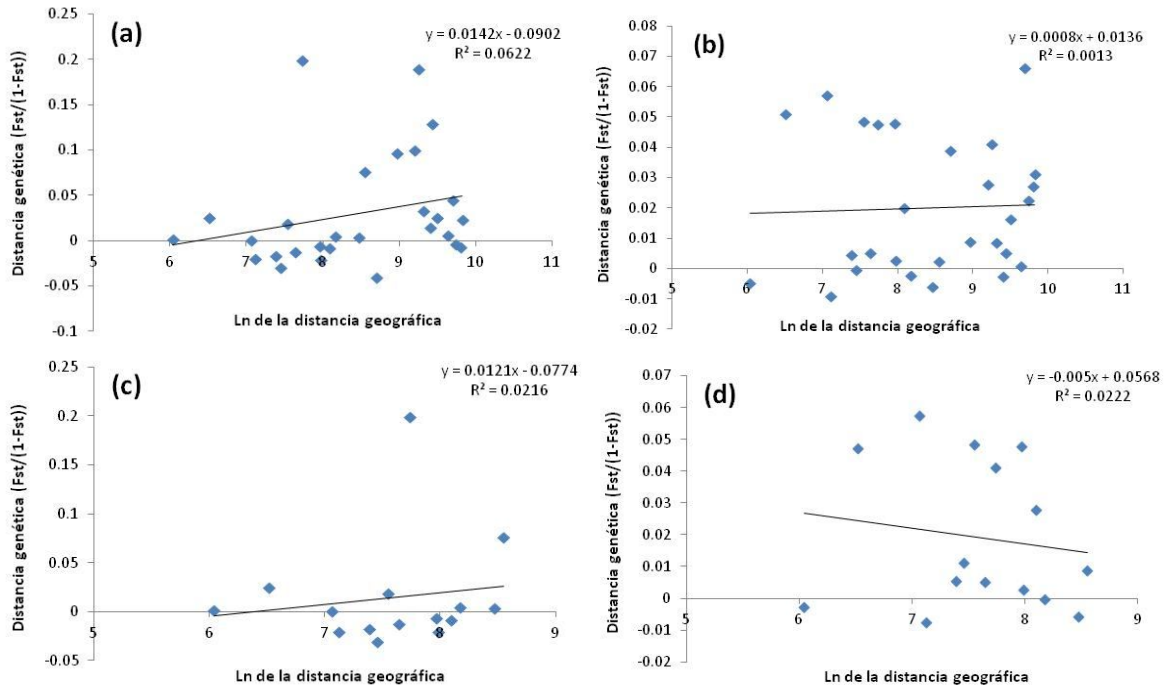
**Figura 7.** Gel de agarosa mostrando PCR de barrido para comprobar la presencia de loci microsatélites. De acuerdo con Wang et al., (2007) aquellas bandas que producen un barrido contienen potenciales motivos microsatélites.



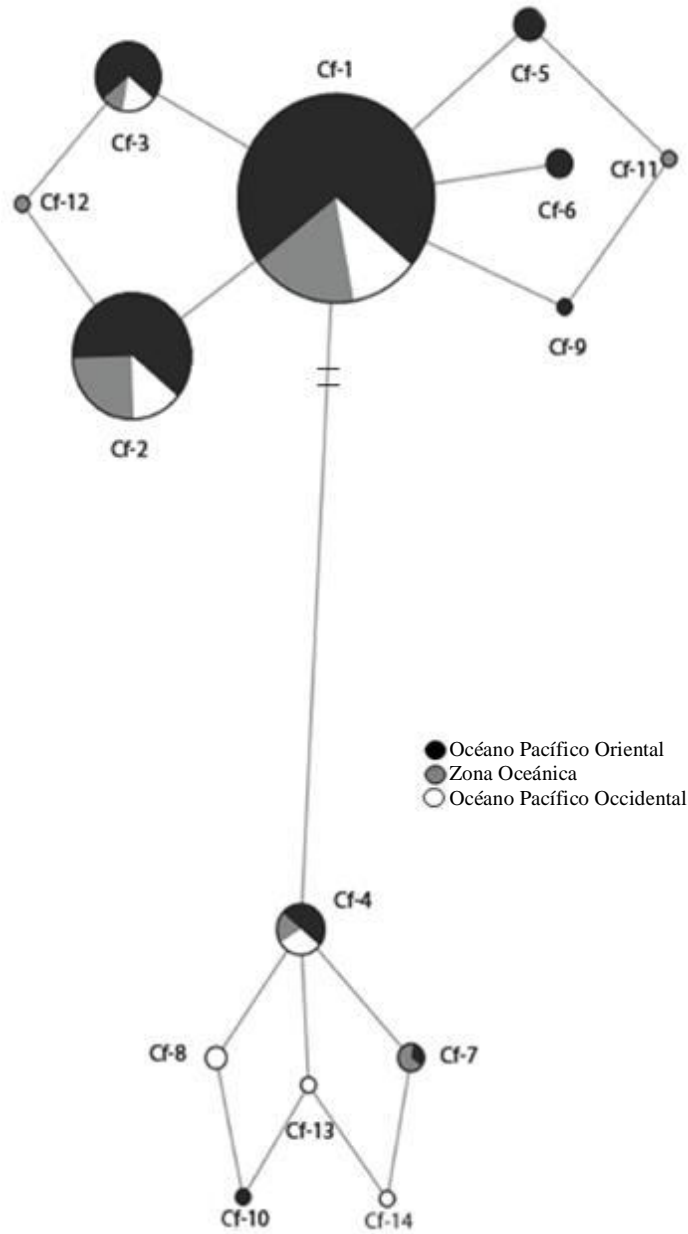
**Figura 8.** Eletroferograma parcial de una secuencia de la región control del ADNmt en *C. falciformis*.



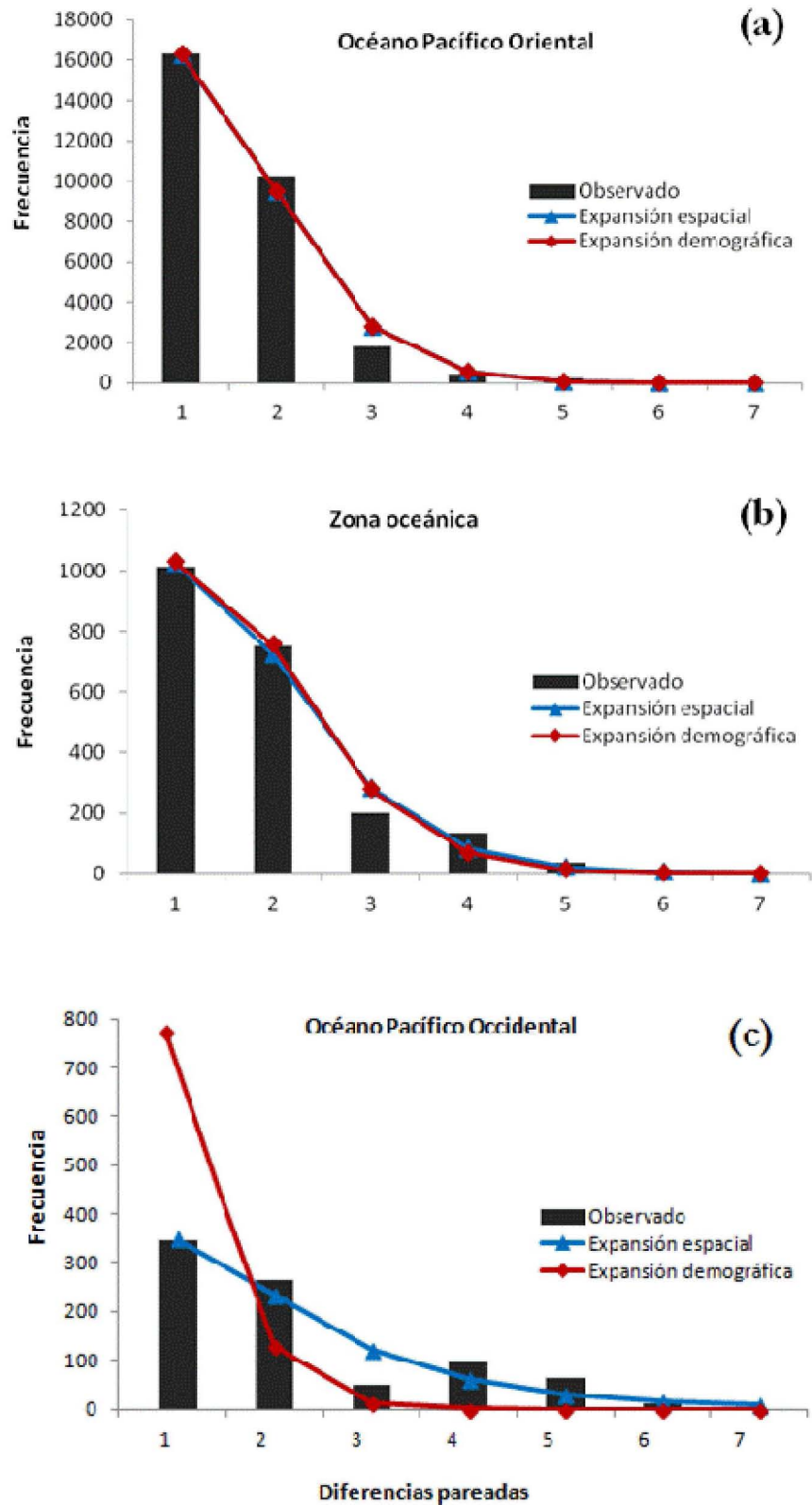
**Figura 92.** Filogenia de los haplotipos de la región control de *C. falciformis* obtenido a través de (a) máxima parsimonia y (b) aproximación bayesiana. Los números representan los valores de soporte de las ramas. Se señala la localidad donde se observó cada haplotipo junto a su abundancia dada entre paréntesis.



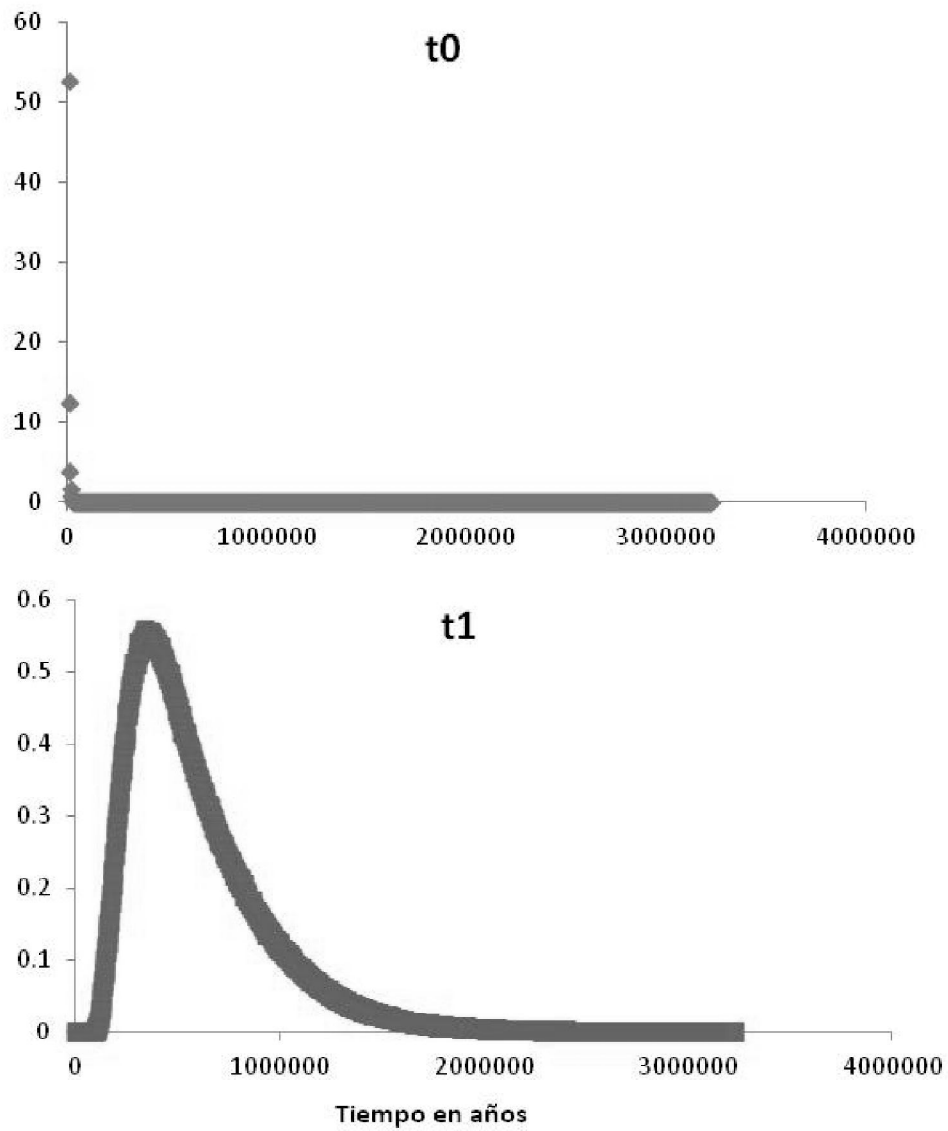
**Figura 10.** Gráfica que muestra el logaritmo natural de la distancia geográfica contra la distancia genética calculada a partir de los valores de  $F_{ST}$  linearizados para a) la región control y b) loci microsatélites en un gradiente longitudinal y c) la región control y d) loci microsatélites comparando entre el norte y sur del océano Pacífico Oriental. La función en el gráfico indica la ecuación de regresión lineal obtenida de los datos.



**Figura 11.** Red de haplotipos de *C. falciformis*. Los haplotipos están representados por círculos proporcionales a su frecuencia. Cada color representa la frecuencia del haplotipo por región. Las líneas indican pasos mutacionales entre haplotipos.

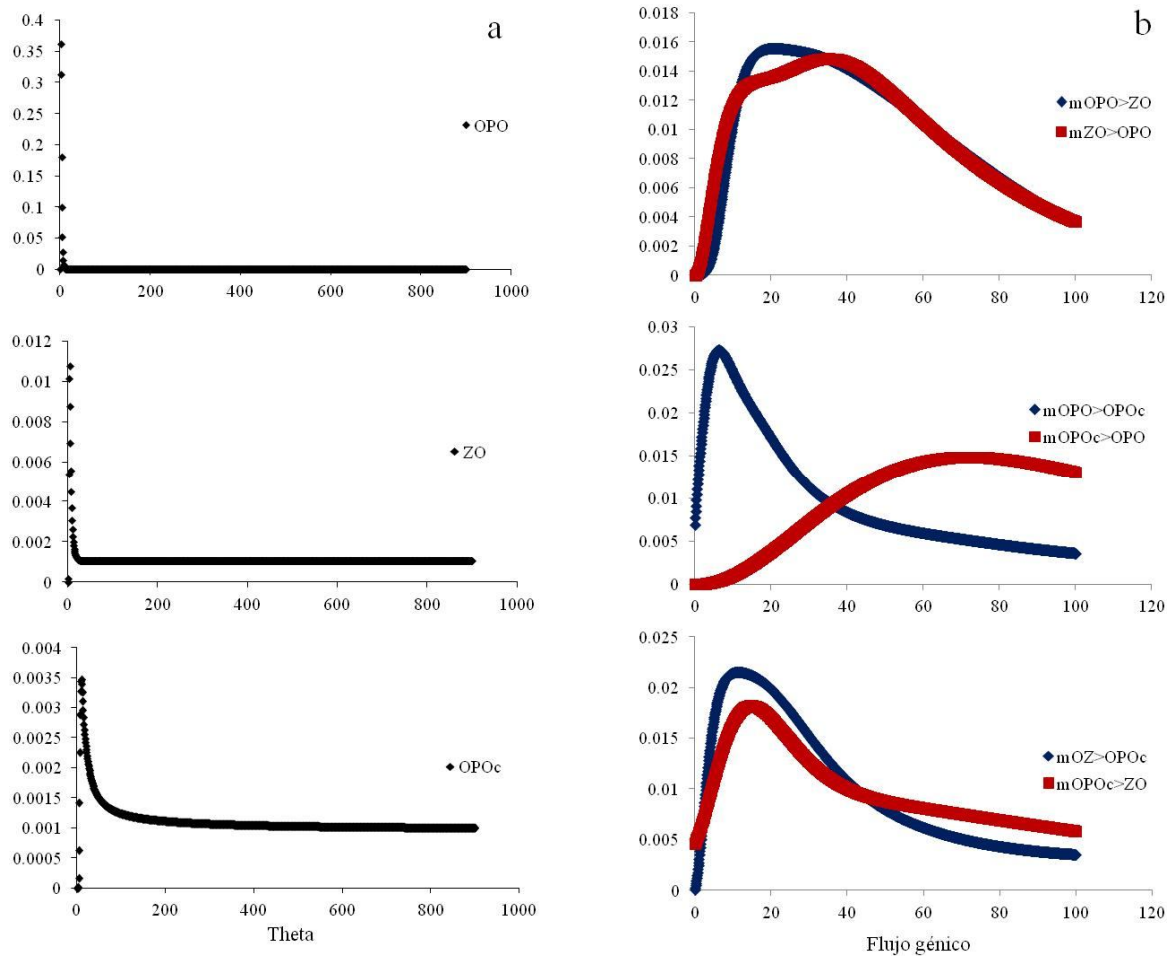


**Figura 12.** Distribución de frecuencia del número de diferencias entre pares de secuencias (mismatches) de *C. falciformis* por regiones.

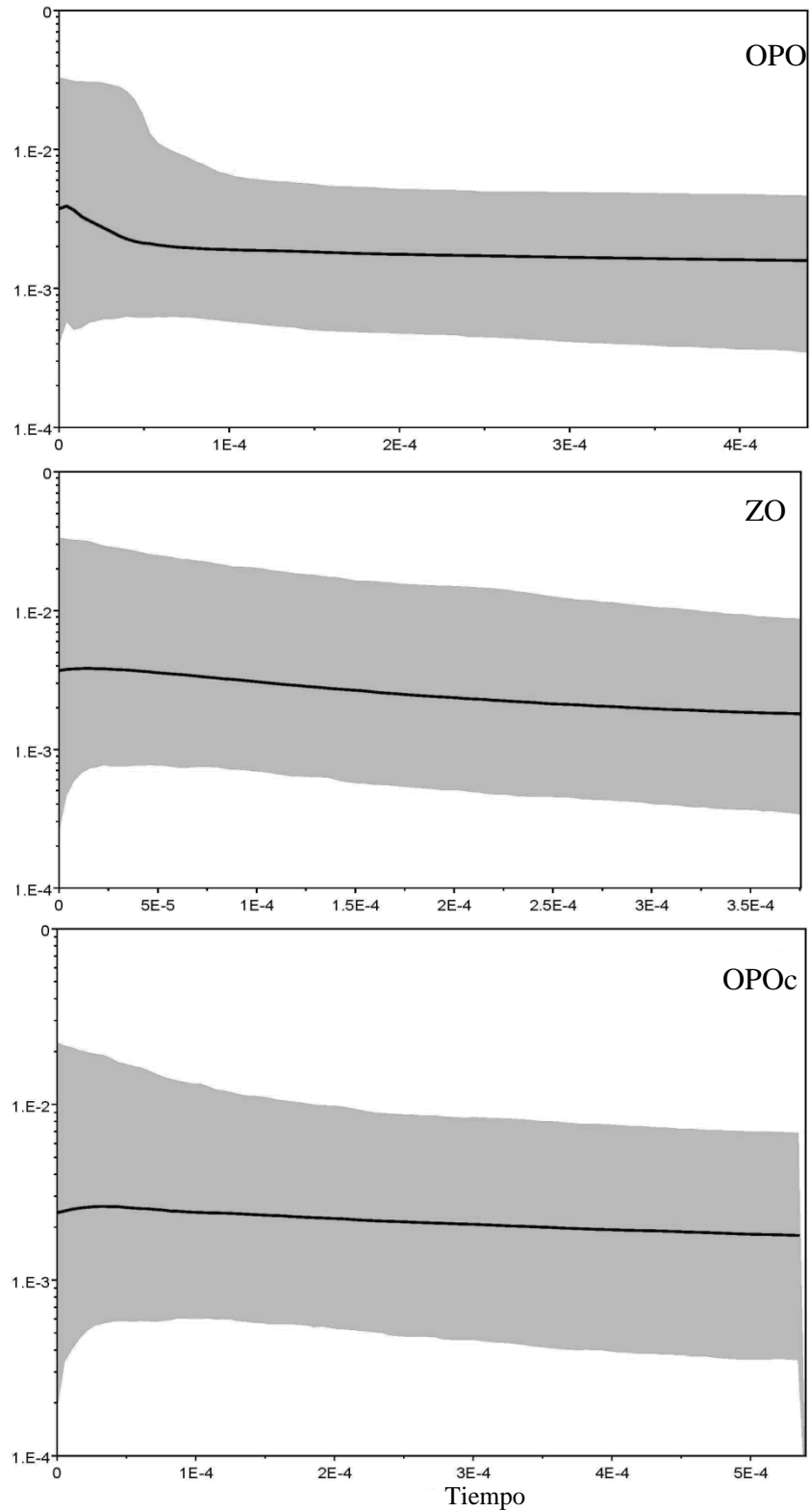


**Figura 13.** Probabilidad posterior del tiempo de divergencia (a) entre las regiones del Pacífico Oriental y Zona Oceánica, y (b) entre la Zona Oceánica y el Pacífico Occidental.

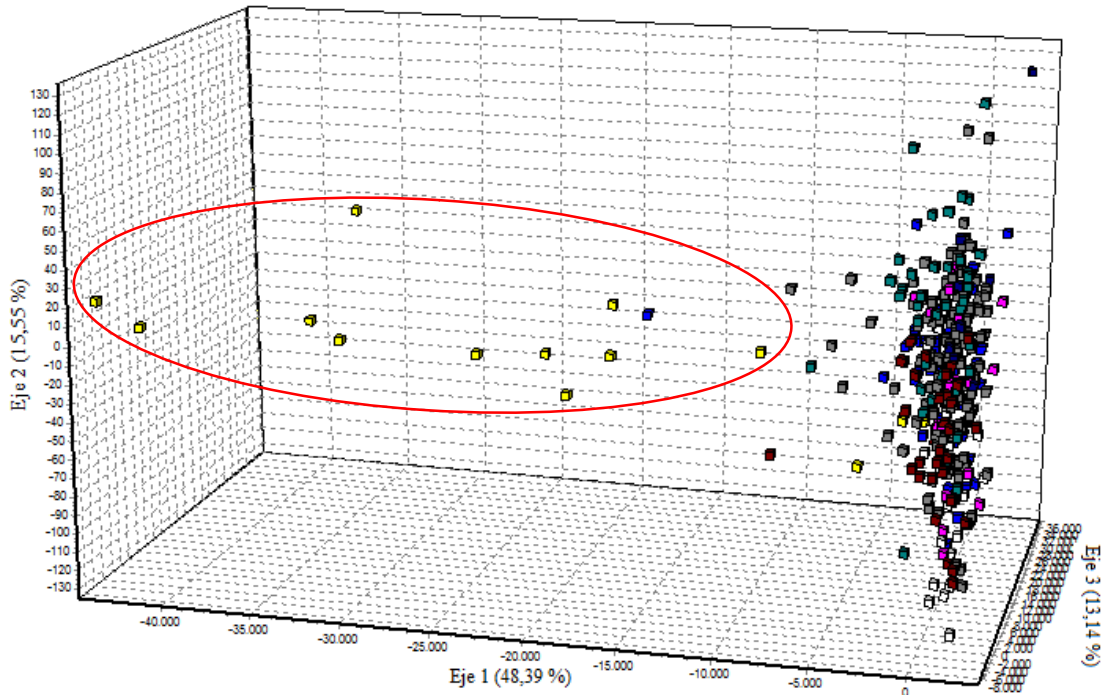




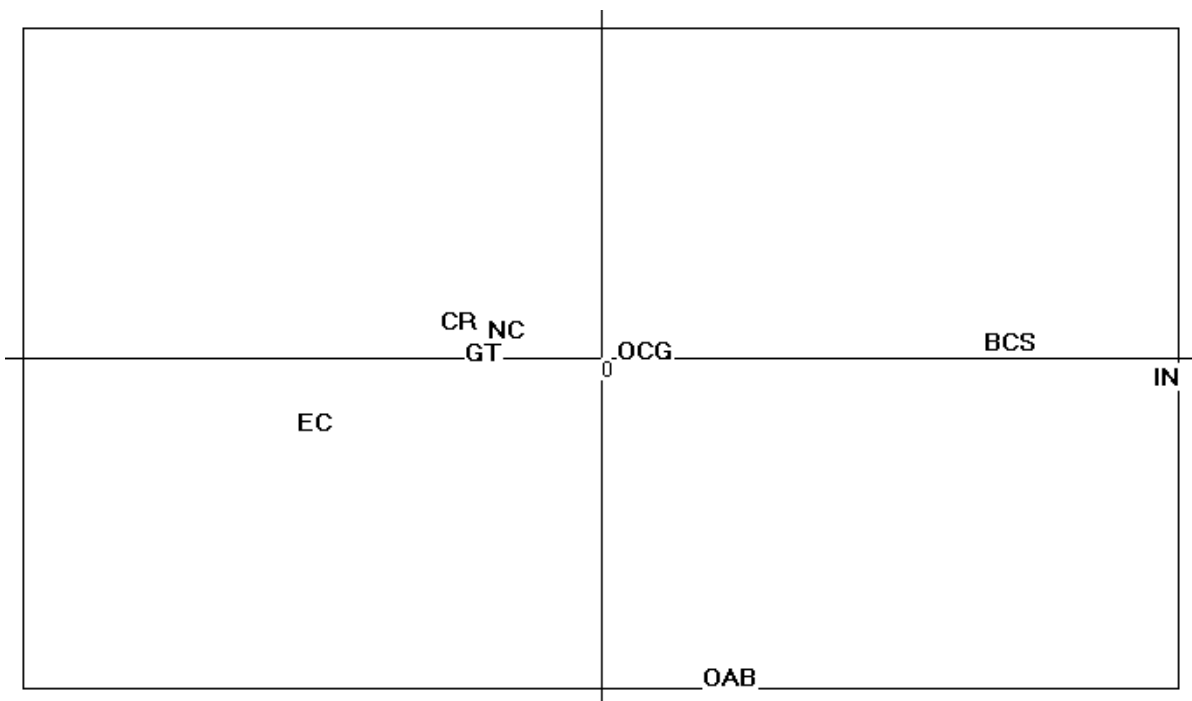
**Figura 14.** Probabilidad posterior (a) del tamaño efectivo de población por región y flujo génico entre par de regiones y (b) en ambas direcciones.



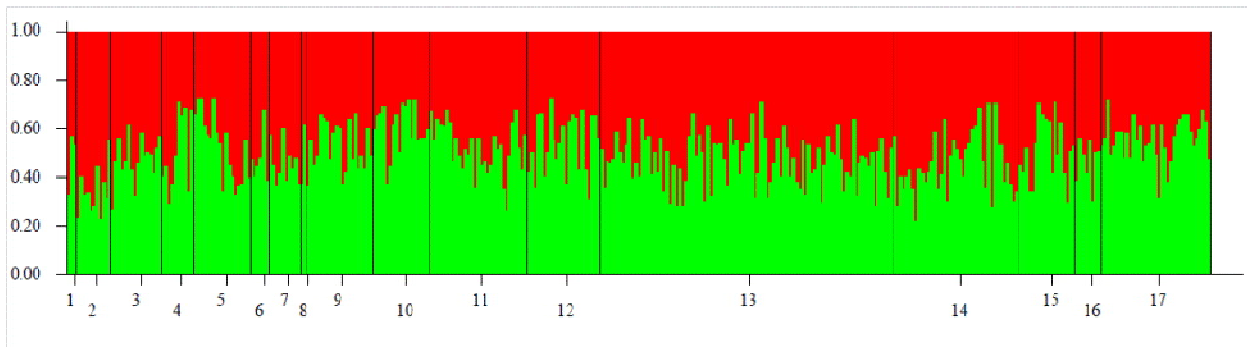
**Figura 153.** Perfil demográfico bayesiano del tamaño efectivo poblacional por región. La línea sólida es la estimación promedio, el área gris muestra los intervalos de confianza al 95%.



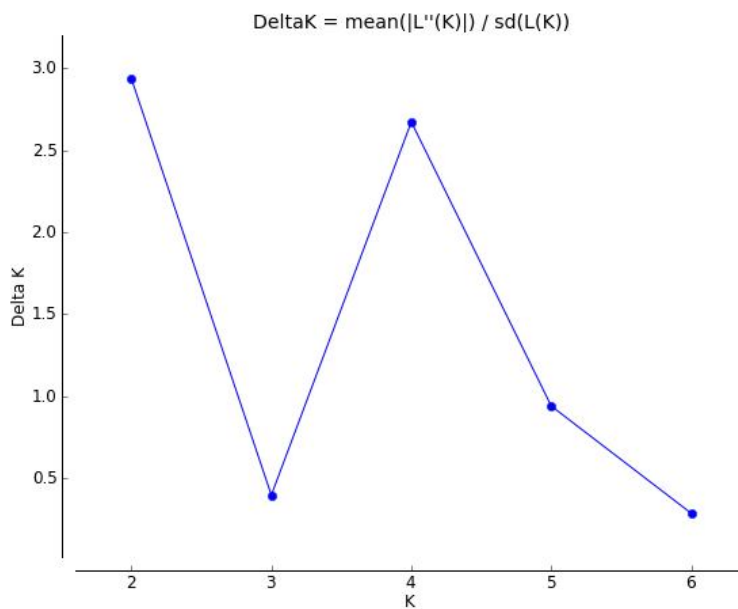
**Figura 16.** Análisis factorial de correspondencia empleando las frecuencias de alelos en cuatro loci microsatélites para ocho localidades de *C. falciformis*. Los individuos dentro del círculo rojo corresponden a la localidad OAB.



**Figura 17.** Análisis de componentes principales de las ocho localidades muestreadas de *C. falciformis*. Los acrónimos son de acuerdo a la Tabla 1.



**Figura 18.** Gráfica de la estructura poblacional obtenida con Distruct (Rosenberg, 2003). Cada individuo está representado por una línea vertical, los cuales están particionados en dos colores diferentes que representan el coeficiente de ancestría estimado para cada cluster o grupo genético. Las líneas negras separan las diferentes localidades que están numeradas como sigue: 1. A, 2. B, 3. C, 4. D, 5. E, 6. F, 7. G, 8. PA, 9. PB, 10. PL, 11. SA, 12. PEO, 13. PM, 14. CR, 15. EC, 16. NC, 17. IN.



**Figura 19.** Número de grupos genéticamente homogéneos a partir de la tasa de cambio de la función de verosimilitud o  $\Delta K$  (Evanno et al., 2005).