



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



**Estructura poblacional y conectividad
genética del tiburón martillo *Sphyrna lewini*
en el Pacífico Oriental Tropical**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS MARINAS
PRESENTA

JUAN PEDRO RODRÍGUEZ ARANA FAVELA

La Paz, B.C.S., 2023.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTOR DE TESIS

Ciudad de La Paz, B.C.S. 28 de ABRIL del 2023

El Colegio de Profesores de Posgrado de CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS en su Sesión (Unidad Académica)

ORDINARIA No. 0-367-23 celebrada el día 28 del mes abril de 2023 conoció la solicitud presentada por el (la) alumno (a):

Apellido Paterno:	RODRIGUEZ ARANA	Apellido Materno:	FAVELA	Nombre (s):	JUAN PEDRO
-------------------	-----------------	-------------------	--------	-------------	------------

Número de registro: A 1 9 0 3 4 0

del Programa Académico de Posgrado: DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS

Referente al registro de su tema de tesis; acordando lo siguiente:

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:

"ESTRUCTURA POBLACIONAL Y CONECTIVIDAD GENÉTICA DEL TIBURÓN MARTILLO *Sphyrna lewini* EN EL PACÍFICO ORIENTAL TROPICAL"

Objetivo general del trabajo de tesis:

"Establecer la conectividad genética y estructura poblacional del tiburón martillo *Sphyrna lewini* en el Pacífico Oriental Tropical".

2.- Se designa como Directores de Tesis a los profesores:

Director: DR. ROGELIO GONZÁLEZ ARMAS 2° Director: DR. JAMES THOMAS KETCHUM

No aplica:

3.- El Trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:

EL CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS - IPN

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente, hasta la aprobación de la versión completa de la tesis por parte de la Comisión Revisora correspondiente.

Director(a) de Tesis

DR. ROGELIO GONZÁLEZ ARMAS

2° Director de Tesis (en su caso)

DR. JAMES THOMAS KETCHUM

Aspirante

MC. JUAN PEDRO RODRÍGUEZ ARANA FAVELA

Presidente del Colegio

DR. SERGIO HERNÁNDEZ TRUJILLO I.P.N.



CICIMAR
DIRECCIÓN



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14
 REP 2017

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S. siendo las 12:00 horas del día 11 del mes de Mayo del 2023 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Posgrado de: CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS para examinar la tesis titulada:

"ESTRUCTURA POBLACIONAL Y CONECTIVIDAD GENÉTICA DEL TIBURÓN MARTILLO *Sphyrna Lewini* EN EL PACÍFICO ORIENTAL TROPICAL"

del (la) alumno (a):

Apellido Paterno:	RODRIGUEZ ARANA	Apellido Materno:	FAVELA	Nombre (s):	JUAN PEDRO
--------------------------	-----------------	--------------------------	--------	--------------------	------------

Número de registro: A 1 9 0 3 4 0

DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS

Aspirante del Programa Académico de Posgrado:

Una vez que se realizó un análisis de similitud de texto, utilizando el software antiplagio, se encontró que el trabajo de tesis tiene 6 % de similitud. **Se adjunta reporte de software utilizado.**

Después que esta Comisión revisó exhaustivamente el contenido, estructura, intención y ubicación de los textos de la tesis identificados como coincidentes con otros documentos, concluyó que en el presente trabajo SI **NO** **SE CONSTITUYE UN POSIBLE PLAGIO.**

JUSTIFICACIÓN DE LA CONCLUSIÓN: *(Por ejemplo, el % de similitud se localiza en metodologías adecuadamente referidas a fuente original)*

El porcentaje de similitud corresponde a las referencias y antecedentes, los cuales vienen citados en la tesis

****Es responsabilidad del alumno como autor de la tesis la verificación antiplagio, y del Director o Directores de tesis el análisis del % de similitud para establecer el riesgo o la existencia de un posible plagio.**

Finalmente y posterior a la lectura, revisión individual, así como el análisis e intercambio de opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR** **SUSPENDER** **NO APROBAR** la tesis por **UNANIMIDAD** o **MAYORÍA** en virtud de los motivos siguientes:

"SATISFACE LOS REQUISITOS SEÑALADOS POR LAS DISPOSICIONES REGLAMENTARIAS VIGENTES"

COMISIÓN REVISORA DE TESIS


DDR. ROGELIO GONZÁLEZ ARMAS
 Director de Tesis
 Nombre completo y firma


DR. FELIPE GALVÁN MAGAÑA
 Nombre completo y firma


DR. ARTURO TRIPP VALDEZ
 Nombre completo y firma


DR. JAMES THOMAS KETCHUM
 Director de Tesis
 Nombre completo y firma


DR. SEBASTIÁN IGNACIO HERNÁNDEZ MUÑOZ
 Nombre completo y firma


DR. SERGIO HERNÁNDEZ TRUJILLO
 Nombre completo y firma
PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA DE AUTORIZACIÓN DE USO DE OBRA PARA DIFUSIÓN

En la Ciudad de La Paz, B.C.S. el día 11 del mes de Mayo del año 2023

El (la) que suscribe M en C. JUAN PEDRO RODRIGUEZ ARANA FAVELA Alumno (a) del Programa

DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS

con número de registro A190340 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:

DR. ROGELIO GONZÁLEZ ARMAS Y DR. JAMES THOMAS KETCHUM

y cede los derechos del trabajo titulado:

"ESTRUCTURA POBLACIONAL Y CONECTIVIDAD GENÉTICA DEL TIBURÓN MARTILLO *Sphyrna Lewini* EN EL

PACÍFICO ORIENTAL TROPICAL"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expresado del autor y/o director(es) del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las

siguientes dirección(es) de correo: peterodriguezaf@hotmail.com- rarmas@ipn.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente de este.


M en C. JUAN PEDRO RODRIGUEZ ARANA FAVELA

Nombre completo y firma autógrafa del (de la) estudiante

NOMBRE DEL TRABAJO

Estructura poblacional y conectividad genética del tiburón martillo *Sphyrna lewini* en el Pacífico Or

AUTOR

JUAN PEDRO RODRÍGUEZ ARANA FAVE
LA

RECUENTO DE PALABRAS

23817 Words

RECUENTO DE CARACTERES

130056 Characters

RECUENTO DE PÁGINAS

88 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

1.6MB

FECHA DE ENTREGA

May 9, 2023 2:55 PM GMT-7

FECHA DEL INFORME

May 9, 2023 2:56 PM GMT-7

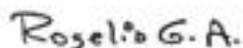
● **6% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos

- 5% Base de datos de Internet
- 3% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de Crossref
- Base de datos de contenido publicado de Crossref
- 1% Base de datos de trabajos entregados

● **Excluir del Reporte de Similitud**

- Material bibliográfico
- Material citado
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 10 palabras)



Dr. ROGELIO CONZÁLEZ ARMAS



DR. JAMES THOMAS KETCHUM

AGRADECIMIENTOS

A mis padres simplemente por todo...cada paso en esta vida es gracias y por ustedes.

A mi novia Anamaria por su apoyo y amor.

A mi director, el Dr. Rogelio González Armas, un verdadero mentor, amigo y un padre no de sangre, pero en espíritu. Gracias por estar ahí los últimos 7 años.

A Randall Arauz, un verdadero campeón de la conservación, por ser el primer en escucharme y direccionarme en este proyecto. De los mejores seres humanos que conozco.

Al Dr. Sebastián Hernández, por aventurarse en este proyecto conmigo solo al escuchar la idea, sin conocernos y aun así, siempre estar ahí desde el día uno.

Al Dr. James Ketchum y Dr. Mauricio Hoyos de Pelagios Kakunjá, por meterme en el mundo de los tiburones y enseñarme mi vocación. Estaré siempre agradecido con ustedes.

Al Dr. José Gregorio Martínez, que también sin conocerme, me rescató, dio su tiempo y atención para todos los análisis de SNPs haciendo posible este proyecto. Un verdadero maestro.

A todos los investigadores que participaron y colaboraron en este proyecto: Felipe Galván, Arturo Tripp, Hector Villalobos, Diana Pazmiño, Florian Devloo Delva y Antonio Corgos.

A todo el equipo de Pelagios Kakunja, y de todas las otras organizaciones, como CREMA, BIOMOL y TIRN, que apoyaron en la toma de muestras a lo largo de muchos años.

Al CICIMAR-IPN por ser mi casa de estudios y brindarme la oportunidad de crecer académicamente en uno de los centros de investigación marina más importantes del país.

A CONACYT por la beca, que más que un apoyo, es un salvavidas para todos aquellos que estamos buscando nuestro lugar en el mundo.

A National Geographic por el grant en su programa "Early Career", cuyo financiamiento hizo posible realizar este estudio, tanto salidas de campo como los análisis de muestras en Australia. A pesar de todos los retrasos sufridos por la pandemia de SARs Covid, el equipo de NatGeo siempre me apoyó con tiempo y facilidades.

A Cesar y Humberto de CICIMAR, que están siempre al pie de cañón para ayudar en cualquier trámite y son un apoyo gigante para todos los procedimientos que hay que hacer como estudiante.

INDICE

• Introducción general.....	1
• Justificación.....	10
• Preguntas de Investigación.....	11
• Objetivo General.....	11

Capítulo 1. Un área de crianza prioritaria para la conservación del tiburón martillo común *Sphyrna Lewini* en México.

• Introducción.....	12
• Objetivos específicos.....	14
• Hipótesis.....	14
• Materiales y métodos.....	18
Área de estudio.....	15
Obtención de muestras.....	16
Extracción de ADN y análisis moleculares.....	17
• Resultados.....	19
• Discusión.....	23
• Conclusiones.....	25

Capítulo 2. Estructura poblacional y conectividad genética del tiburón martillo *Sphyrna lewini* en el Pacífico Oriental Tropical.

• Introducción.....	26
• Objetivos específicos.....	30
• Hipótesis.....	30
• Materiales y métodos.....	31
Área de estudio.....	31
Obtención de muestras.....	33
Extracción, secuenciación y obtención de SNPs.....	35
SNPs no neutrales o bajo selección.....	36
Estructura poblacional y tamaño poblacional efectivo.....	37
Parentesco.....	38
• Resultados.....	39
• Discusión.....	53
• Conclusiones.....	57
• Discusión y conclusiones generales.....	58
• Recomendaciones e implicaciones para la conservación.....	60
• Referencias.....	61

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Experimento planteado por Ovenden (2013).....5

Figura 2. Visión lateral y ventral de *Sphyrna lewini*.....9

Capítulo 1. Un área de crianza prioritaria para la conservación del tiburón martillo común *Sphyrna lewini* en México.

Figura 1. Área de estudio.....16

Figura 2. Composición porcentual de haplotipos.....19

Figura 3. Red haplotípica.....21

Capítulo 2. Estructura poblacional y conectividad genética del tiburón martillo *Sphyrna lewini* en el Pacífico Oriental Tropical.

Figura 1. Área de estudio.....33

Figura 2. Fotografía toma de muestras.....34

Figura 3. SNPs bajo selección.....40

Figura 4. DAPC y PCA.....42

Figura 5. Resultados STRUCTURE.....44

Figura 6. Gráficos Evanno y Puechmaille.....45

Figura 7. Diagrama de caja de parentesco.....47

Figura 8. Diagrama caja de parentesco de cada sitio.....48

Figura 9. Árbol genealógico de máxima verosimilitud.....52

INDICE DE TABLAS

Capítulo 1. Un área de crianza prioritaria para la conservación del tiburón martillo común *Sphyrna lewini* en México.

Tabla 1. Localidades y número de N.....20

Tabla 2. Valores de Fst.....22

Capítulo 2. Estructura poblacional y conectividad genética del tiburón martillo *Sphyrna lewini* en el Pacífico Oriental Tropical.

Tabla 1. Número de muestras por sitio.....39

Tabla 2. Tamaño poblacional efectivo.....35

Tabla 3. Relaciones familiares dentro de sitios.....49

Tabla 4. Relaciones familiares entre sitios.....51

RESUMEN

Conocer la estructura poblacional y conectividad genética de *Sphyrna lewini* en el Pacífico Oriental Tropical (POT), es de gran importancia para los esfuerzos de conservación de la especie en la región, ya que se encuentra en peligro crítico de extinción a nivel global. En esta investigación, identificamos una posible área de crianza prioritaria para *S.lewini* en las costas de Sinaloa, México, cuya firma genética del ADNmt es única y diferente al resto de los sitios considerados en el Pacífico Mexicano, presentando 5 haplotipos independientes. Adicionalmente, utilizando Polimorfismos de Nucleótido Único (Single Nucleotide Polymorphism-SNPs) se identificó una población panmictica desde la península de Baja California hasta Panamá. También se identificó la conectividad genética entre áreas de crianza en la costa de Costa Rica (Coyote) con áreas de agregación de adultos en Isla del Coco, estableciendo una conectividad directa entre dos hábitats fundamentales para la especie. Se logró identificar las bondades y desventajas del uso de diferentes marcadores moleculares para objetivos específicos, comparando con otros autores e investigaciones de la misma especie, así como la importancia de usar diferentes herramientas para estudiar la estructura poblacional de la especie.

ABSTRACT

The population structure and genetic connectivity of *Sphyrna lewini* in the Eastern Tropical Pacific (ETP) is of great importance for the conservation efforts of the species in the region, particularly because it is critically endangered globally. In this study, we identified a possible priority nursery area for *S.lewini* off the coast of Sinaloa, Mexico, whose mtDNA genetic signature is unique and different from the rest of the sites considered in the Mexican Pacific, presenting 5 independent haplotypes. Additionally, using SNPs, a panmictic population was identified from the Baja California peninsula to Panam. Also we found genetic connectivity between nursery off the coast of Costa Rica (Coyote) with adult aggregation sites such as Cocos Island, establishing a direct connectivity between two fundamental habitats for the species. It was possible to identify the benefits and disadvantages of using

different molecular markers for specific objectives comparing our results with other publications of the same species, and the importance of using different tools to study the population structure of the species.

INTRODUCCIÓN

La conservación y manejo de especies altamente móviles es un reto sumamente complejo por diferentes razones, que tienen que ver tanto por presiones naturales como antropogénicas. En primer lugar, las especies altamente migratorias o con rangos de movimientos muy amplios, suelen cruzar fronteras geopolíticas, cuyos gobiernos o administraciones tienen una agenda que puede diferir en cuanto a la conservación y aprovechamiento de los recursos se refiere (Espinoza *et al.* 2018). Para las especies marinas, la complejidad aumenta significativamente, ya que el estudio de ellas suele tener un mayor grado de complejidad y costos de estudio más elevados, por la dificultad en cuanto a la toma de datos, el acceso a los organismos, la continuidad y tamaño de los océanos, que permite movimientos mucho más amplios en diferentes planos y que pueden cambiar espacio temporalmente de acuerdo con las condiciones ambientales adecuadas para cada especie (Corrigan *et al.* 2018). Además, uno de los retos más importantes para el estudio de especies marinas altamente móviles es el acceso a un número representativo o significativo de muestras, para poder hacer inferencias de las poblaciones que se quieren estudiar.

El impacto negativo y presiones ejercidas sobre las poblaciones de especies altamente migratorias o con altos rangos de movilidad, ha sido ampliamente documentado, teniendo como el principal factor amenazante, la pesca, ya sea dirigida o como resultado de captura incidental de especies como los atunes, tiburones y otros peces pelágicos (Bonaccorso *et al.* 2021). Debido a las estrategias K, de la gran mayoría de las especies altamente migratorias, como mamíferos marinos, tortugas y tiburones, la presión pesquera ejercida intensivamente sobre las poblaciones de estos últimos, ha sido perjudicial y la principal razón del declive en las poblaciones de tiburones a nivel mundial (Corrigan *et al.* 2018). Al tener una madurez tardía, baja fecundidad y un número bajo de crías (Field *et al.* 2009), los tiburones grandes como la mayoría de las especies de la familia Carcharhinidae, Lamnidae y Sphyrnidae, carecen de la resiliencia ecológica necesaria para soportar

la presión pesquera y que ésta, se haga de manera sostenible, interrumpiendo los flujos migratorios tanto de individuos como de flujo genético (Camhi, 1998; Dudgeon, *et al.* 2012).

Adicional a la pesca, los cambios ambientales debido al cambio climático y la contaminación, modifican las condiciones fisicoquímicas del ambiente, así como algunos procesos biológicos como la productividad, siendo agentes importantes que alteran la movilidad de las especies en los océanos (Chin *et al.* 2010; Rosa *et al.* 2014). Otro factor igualmente importante, es la fragmentación del hábitat debido al desarrollo urbano e industrial. Este tipo de afectación es mucho más evidente y negativo en organismos terrestres. Sin embargo, para los organismos marinos, la fragmentación del hábitat modifica los ecosistemas costeros, que son utilizados por muchas especies como áreas de crianza, zonas de alimentación y refugio, por lo que muchos de los movimientos naturales o rutas que siguen estas especies, se vean comprometidas (Catalano, *et al.* 2022; Hammerschlag *et al.* 2022).

Conectividad

A pesar de que no todas las especies de tiburones son altamente migratorias, ya que muchas son pequeñas o medianas y son menos móviles (distancias máximas de 270km; Speed *et al.* 2016) el buen manejo para su conservación radica en mantener la conectividad de las poblaciones dentro de sus respectivos hábitats. A grandes rasgos, la conectividad es el intercambio de individuos, genes o poblaciones entre hábitats espacialmente fragmentados (Balbar y Metaxas, 2019). Investigaciones biogeográficas y de meta poblaciones, muestran que hábitats con alto grado de conectividad entre sí, son más eficientes en cuanto a la conservación de las especies y más estables ecológicamente (Beger *et al.* 2010). La conectividad ecológica no solo permite llevar a cabo la historia de vida de las especies de manera exitosa, sino que ayuda a la adaptación y resiliencia de dicha especie a diferentes cambios ambientes, debido al intercambio genético (Krosby *et al.* 2010; UN, 2019).

Existen dos tipos de conectividad: En primer lugar, la conectividad demográfica, siendo esta no solo el movimiento e intercambio de organismos, sino implica la

migración de individuos de diferentes estadios de madurez, desde adultos, juveniles e inclusive neonatos, entre poblaciones y/o hábitats, de forma que se vuelven miembros activos en cuanto a crecimiento, reproducción y supervivencia (Rodríguez Valencia, 2007).

Para tener conectividad demográfica, el número de migrantes necesarios dependerá del tamaño poblacional, y se alcanza, cuando la población receptora recibe al menos el 10% de migrantes para tiburones y otras especies marinas (Ovenden, 2013). En cuanto a la conectividad genética, es el intercambio de genes y el grado en el cual, el flujo genético afecta los procesos evolutivos a nivel poblacional (Lowe y Allendorf, 2010). Este tipo de conectividad puede ser descrita mediante dos modelos principales: a) el primer modelo, una barrera impermeable ha separado una población original, en dos más pequeñas, llamadas “poblaciones filogeografías” (PG).

Este ejemplo no es tan común en poblaciones marinas, ya que depende de barreras físicas como montañas o urbanización para separar físicamente a la población original; b) el segundo modelo, la conectividad está restringida (RC) dentro del rango de una especie por una barrera permeable, como lo son condiciones fisicoquímicas del océano, así como corrientes marinas, por mencionar unos ejemplos (Ovenden, 2013). Por lo tanto, muchos estudios se refieren a conectividad, basándose únicamente en el movimiento de un individuo de punto A a un punto B, que se pudo haber generado por diferentes razones, como la búsqueda de alimento o cambios ambientales, pero no están relacionados con el flujo genético. Por ello, el estudio adecuado de la conectividad genética es complejo y fundamental para el manejo y conservación de estas especies, así como de la creación y designación de Áreas Marinas Protegidas (AMP)(Pujolar, *et al.* 2013; Balbar y Metaxas, 2019; Domingues, *et al.* 2019; Guzmán, *et al.* 2021)

La conectividad al no ser un parámetro que se pueda medir con facilidad ha sido generalmente presentada como un subproducto de otras investigaciones que se concentran en los movimientos, uso de hábitat y rangos de distribución de animales marinos como tiburones, tortugas y ballenas. Las técnicas tradicionales para

estudiar los movimientos y conectividad como lo son la foto identificación, captura-recaptura, marcaje y otras más especializadas como la telemetría tanto acústica como satelital son muy útiles para entender los movimientos de individuos durante periodos cortos (horas, días) y largos (meses, años) de tiempo, y en general durante áreas pequeñas y grandes (Chao, 1987, Holland *et al.* 1999, Kohler y Turner, 2001, Papastamatiou, *et al.* 2013). Es importante recordar, que la conectividad no solo se basa en el desplazamiento o migración de individuos, sino, además, si los individuos migrantes se integran a la nueva población. Es por ello por lo que, a diferencia de los métodos antes mencionados, para estudiar los movimientos, la genética complementa con una perspectiva a largo plazo de la conectividad entre poblaciones. De esta manera, la conectividad genética agrega el factor reproductivo al estudio del movimiento (Ovenden, 2013).

La conectividad genética se define como el grado en el cual el flujo genético afecta los procesos evolutivos de una subpoblación (Lowe y Allendorf, 2010). Los métodos genéticos utilizados para identificar esta conectividad, y otras variables, permiten la evaluación de la estructura poblacional que resulta de estas fuerzas evolutivas, dándole forma a las frecuencias alélicas, dentro y entre poblaciones, mediante la mutación, la deriva génica, la migración y la selección (Wright, 1931). Además, los métodos genéticos pueden ayudar a estimar el tamaño poblacional efectivo, utilizando modelos para estimar el número de reproductores en una población, así como la capacidad de una población de adaptarse a los cambios ambientales, y consecuentemente el estado de salud de una población y su capacidad de recuperarse cuando dicha población disminuye (Hare *et al.* 2011).

Para determinar la conectividad genética, es primordial establecer si existen o no diferencias entre dos o más grupos de organismos, por lo que se utiliza el índice de fijación (F_{ST}) definido como la medida de diferenciación de la población debido a la estructura genética (Beaumont, 2005; Meirmans y Hedrick, 2011), y se representa mediante la siguiente ecuación:

$$F_{ST} = 1 / (4N_e m + 1) \quad (\text{Wright, 1969})$$

En esta ecuación, el valor F_{st} mide la diferenciación genética entre poblaciones; si es igual a cero, significa que no existe diferencia entre las poblaciones; si es mayor a cero, las poblaciones son diferentes (Holsinger y Weir, 2009). Este valor representa que el umbral genético para determinar esas diferencias es un valor absoluto, y no depende del número de individuos en una población, como es el caso de la conectividad demográfica definida por Ovenden (2013) (Figura 1).

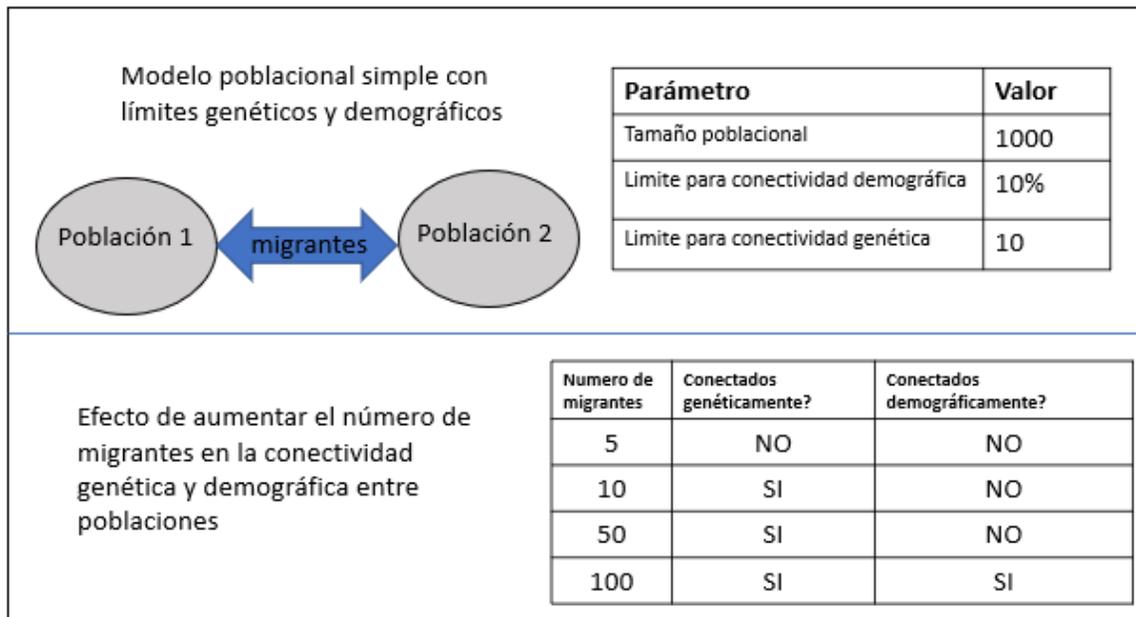


Figura 1. Experimento planteado por Ovenden (2013), para demostrar la diferencia entre la conectividad genética y demográfica. Mientras que el número de migrantes aumenta en dos poblaciones hipotéticas, el umbral genético para alcanzar la conectividad se alcanza antes el umbral demográfico. Para conseguir la conectividad genética, es necesario un número de individuos migrantes, y para conseguir la conectividad demográfica es necesario que los migrantes sean una proporción de la población.

Para poder determinar los valores de variabilidad y diversidad genética, es necesario el uso particular de diferentes técnicas y herramientas moleculares, utilizando el ADN como materia prima (Amos y Harwoodm 1998). Estos marcadores moleculares, corresponden a un conjunto de técnicas que indican la presencia de

variantes alélicas, como producto de algún tipo de mutación en el material genético de las poblaciones a través del tiempo (Grover y Sharma, 2016). Dichas variaciones, son conocidas como polimorfismos, y nos ayudan a identificar y separar grupos, poblaciones, cepas, especies o grupos taxonómicos mayores, mediante la discriminación entre grupos biológicos a cualquier nivel de estudio. Estos marcadores nos permiten identificar poblaciones con una diversidad genética reducida y que pueden ser más vulnerables a los cambios ambientales, así como distinguir subpoblaciones genéticamente diferenciadas del resto para enfocar de mejor manera los esfuerzos de conservación (González, 2003).

En cuanto a la estructura poblacional, su importancia para los esfuerzos de manejo y conservación radica en la identificación de diferencias sistemáticas en las frecuencias alélicas entre poblaciones de la misma especie. Estas diferenciaciones están impulsadas por el apareamiento no aleatorio, así como una combinación de procesos evolutivos como recombinación, mutación, deriva génica, historia demográfica y selección natural (Meirmans y Hedrick, 2011).

Identificar si hay o no poblaciones de la misma especie con características genéticas diferentes, siempre ha sido una gran herramienta para el manejo de las especies marinas, ya que permite concentrar los esfuerzos en poblaciones más vulnerables (Morin *et al.* 2009). La estructura de las poblaciones puede indicar procesos evolutivos tanto pasados como presentes, y nos permite tener una idea general de la conectividad que existe entre lugares diferentes que tengan presencia de la misma especie, ya sea porque dichos individuos comparten un ancestro común, o porque hay un flujo genético (Abdul-Muneer, 2014). En este contexto, al no haber una estructura genética entre los individuos de diferentes sitios, esto quiere decir que los genes están siendo compartidos por todos esos individuos. Por otro lado, al haber alguna estructura, significa que hay algo que está limitando o diferenciando el flujo de genes de una población o grupo de individuos hacia otros, identificando unidades de manejo pesquero y conservación (Dudgeon, *et al.* 2012)

Biología del tiburón martillo

El tiburón martillo común *Sphyrna lewini* (Figura 2), ha sido una especie ampliamente estudiada en el Pacífico Oriental Tropical (POT) y ha adquirido mucha atención en la última década, debido a su estatus de conservación, establecido como “en peligro crítico de extinción” por la IUCN, en su última evaluación de la especie publicada en 2019 (Rigby *et al.* 2019). El alto valor comercial de sus aletas consideradas de primera calidad en el mercado asiático, específicamente Hong Kong; así como el consumo de su carne, lo ha convertido en un recurso pesquero de gran valor y con una explotación considerable a nivel mundial (Smith *et al.* 2009).

A pesar de tener una distribución circumtropical en las aguas cálidas de todo el mundo (Compagno *et al.* 2005), el POT constituye una amplia región con muchos sitios de agregación de *S. lewini*, ya que cuenta con características oceanográficas, fisiográficas y geológicas, donde se lleva a cabo el ciclo reproductivo de la especie. Dicho se divide en dos etapas: la primera tiene lugar en áreas de crianza que se ubican en diferentes zonas costeras continentales o en islas (Clarke 1971; Holland *et al.* 1993) algunas en zonas altamente productivas y con una amplia plataforma continental (Duncan *et al.* 2006, Castillo *et al.* 2012; Hoyos *et al.* 2014).

Es en estos sitios donde los neonatos y juveniles de *S. lewini* pueden permanecer desde varios meses hasta un par de años, haciendo movimientos relativamente cortos (<100km), alimentándose cerca del fondo marino y buscando protección en la plataforma continental o en las lagunas costeras (Holland *et al.* 1993; Rodríguez Arana, 2018; Estupiñan-Montaño *et al.* 2021). Posteriormente, durante la transición de juveniles a adultos, empiezan a realizar movimientos más extensos a zonas más alejadas de la costa, para finalmente llegar a los sitios de agregación de juveniles y adultos, en las montañas submarinas e islas oceánicas (Hearn *et al.* 2010; Hoyos *et al.*, 2014; Ketchum *et al.* 2014; Rodríguez Arana, 2018). Estos sitios de agregación son considerados como puntos calientes biológicos con una gran abundancia y diversidad de depredadores tope (Hearn *et al.* 2010). Es en estos lugares donde se han observado los grandes cardúmenes de tiburón martillo, los

cuales son muy importantes para el buceo recreativo, permitiendo el acceso y observación de estas agregaciones desde hace varias décadas (Klimley, 1995).

Sphyrna lewini es considerada una especie altamente móvil. Sin embargo, se ha encontrado cierto grado de filopatría a sus áreas de crianza, y una fidelidad a los sitios de agregación. Por esta razón, a pesar de poder hacer grandes movimientos, es muy común que los organismos pertenecientes a ciertas zonas permanezcan en ellas (Duncan *et al.* 2006; Coiraton *et al.* 2020). Las poblaciones actuales de *S. lewini* se diferenciaron por barreras cripticas como los pueden ser cuencas oceánicas, así como barreras menos evidentes como fenómenos geológicos, biológicos y oceanográficos, tales como gradientes de temperatura, giros marinos, disponibilidad de alimento, etc. (Duncan *et al.*, 2006; Jorgensen *et al.* 2009). Por ello, el estudio de sus poblaciones con enfoque en su conservación es fundamental: desde una perspectiva de manejo pesquero, la identificación de poblaciones independientes de *S. lewini* es vital, ya que las dinámicas de cada población son afectadas por procesos locales (ej. nacimientos, reclutamiento, mortalidad natural y mortalidad por pesca (Camhi, 1998).

Por lo tanto, cada población puede reaccionar de manera independiente a la explotación, y de igual manera cada población puede reaccionar de manera diferente a variaciones ambientales, lo que puede llevar no solo a la continua sobreexplotación de la especie, sino a una pérdida de diversidad genética (Begg *et al.* 1999, Hilborn *et al.* 2003). En este contexto, investigar la estructura poblacional, patrones de adaptación localizada y comportamiento reproductivo, es especialmente crítico en tiburones, debido a su baja fecundidad y largos tiempos de maduración, que los hacen más sensibles a la sobreexplotación (Stevens, 1989; Bejarano- Álvarez *et al.* 2011; Furlong-Estrada, *et al.* 2017; Martínez-Candelas, *et al.* 2020).

Las dos etapas del ciclo de vida de *Sphyrna lewini* (áreas de crianza y sitios de agregación), están claramente establecidos (Coriaton *et al.* 2020). Sin embargo, los movimientos de las hembras adultas desde los sitios de agregación (montañas submarinas o islas oceánicas) hacia la costa con la finalidad de parir a sus crías, no

ha sido registrado con precisión (Ketchum *et al.* 2009; Ketchum *et al.* 2014b; Estupiñan-Montaña *et al.* 2021b). Primordialmente, esta falta de información se debe a la dificultad de colocar cualquier tipo de marcas o transmisores en las hembras adultas por su baja o nula abundancia en muchos sitios, particularmente en el GC y Pm y a lo extenso de las zonas costeras que utilizan como áreas de crianza donde la cobertura por receptores acústicos es difícil de alcanzar. Se ha utilizado la telemetría acústica y el marcaje satelital, para estudiar movimientos en las islas y de las islas a la costa, sin embargo, en el caso de la telemetría acústica, la necesidad de tener una amplia red de receptores acústicos y que exista poca distancia entre estos colocando muchos receptores, hace de este método poco viable por los costos para estudiar los movimientos hacia la costa. Por otro lado, la telemetría satelital puede ser muy costosa, particularmente las marcas tipo PSAT (Thomas *et al.*, 2012), así mismo como la problemática de colocarlas en los organismos adultos, ha sido un impedimento para establecer esta conectividad entre los sitios de agregación y las áreas de crianza.

Debido a lo anterior, este proyecto se dividió en dos capítulos: el primero de ellos analiza la estructura poblacional de las áreas de crianza del Pacífico Mexicano (PM) para la identificación de un sitio al que consideramos como prioritario para el manejo y conservación de esta especie. Y el segundo capítulo examina la estructura poblacional y la conectividad entre diferentes sitios del Pacífico Oriental Tropical (POT).

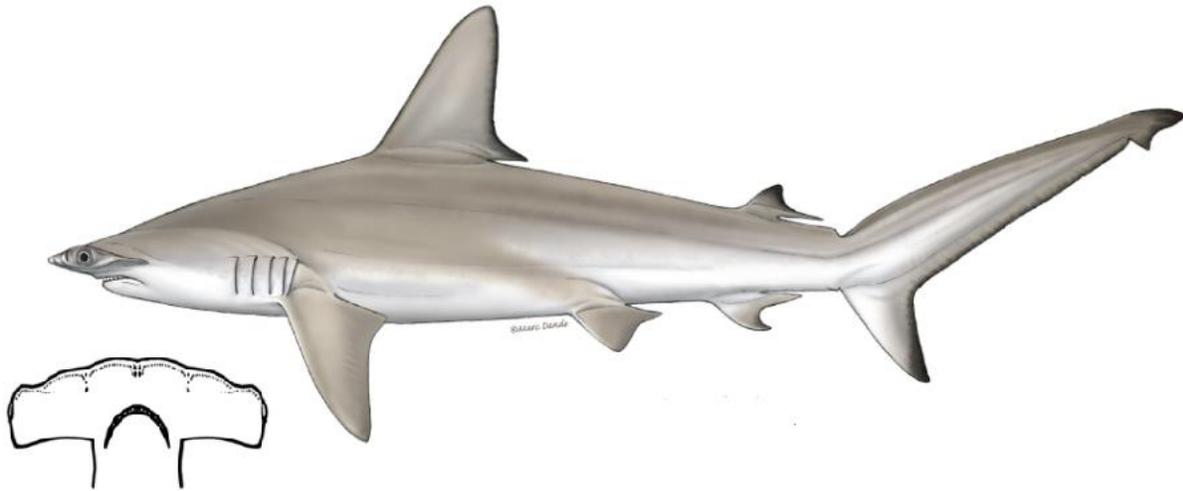


Figura 2. Vista lateral de *Sphyrna lewini* y vista ventral de la cabeza que distingue a esta especie de las otras especies de tiburón martillo: Cuatro lóbulos cefálicos y una muesca en la parte central.

JUSTIFICACIÓN

El declive de las poblaciones de *Sphyrna lewini* en el POT se debe principalmente a la sobrepesca de neonatos y juveniles (White *et al.* 2008), lo que ha ocasionado una disminución en la abundancia del 50% al 90% en muchas zonas de su distribución en la región y a nivel mundial (Torres-Huerta *et al.* 2008, Nance *et al.* 2011). Diversos estudios han mostrado evidencia de la existencia de diferentes subpoblaciones dentro del intervalo de distribución de esta especie en el POT (Elizondo *et al.* 2022), razón por la cual resulta necesario el estudio de la conectividad genética para determinar la importancia de áreas específicas para *S. lewini* y el manejo de unidades genéticamente diferentes (Castillo-Olguín *et al.* 2012).

S. lewini es considerada una especie en peligro por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (Rigby *et al.* 2019). La pesquería intensiva, y una baja recuperación cuando hay una disminución poblacional, hace de esta especie,

una de las especies de tiburones más vulnerables en la actualidad (Field, *et al.* 2009; Pérez-Jiménez, 2014).

La frecuente presencia en el POT sugiere una fuerte filopatría (Rangel-Morales *et al.* 2022), por lo que es de vital importancia preservar las áreas de crianza donde se desarrollan neonatos y juveniles y donde ocurren los procesos adaptativos que les confiere ventajas respecto a poblaciones aledañas (Duncan, *et al.* 2006, Salomón, *et al.* 2009, Elizondo *et al.* 2022).

Aunque las áreas de crianza están protegidas en México por la Norma Oficial Mexicana 029 de (NOM029-PESC-2006- DOF, 2007) la cual establece limitaciones a la pesca de tiburones en ciertas temporadas del año y zonas geográficas, el número de estas áreas es muy limitado y no se tienen contempladas para todas las especies de tiburones, además de que no es posible hacer programas de manejo eficientes, ya que no se conocen adecuadamente los patrones de movimientos, flujo de genes y hábitats clave (nacimiento, expulsión y protección de crías), lo cual es fundamental para poder establecer zonas de refugio, y una explotación sustentable de *S. lewini* (Speed *et al.* 2010).

Las pesquerías extraen tiburones neonatos y juveniles principalmente por ser los más numerosos, por lo que una disminución en la población de este grupo de edad podría causar el colapso de la especie y la pérdida de variabilidad genética de las poblaciones en su conjunto (Dudgeon *et al.* 2012). Por lo tanto, el desarrollo de estrategias de conservación para tiburones, depende de la información científica generada sobre las características biológicas, estructura poblacional, flujo genético, movimientos, migraciones y hábitats usados por los neonatos y juveniles. Por esta razón, es fundamental obtener información adicional acerca de estos estadios tan poco estudiados. Adicionalmente, establecer la conectividad que existe entre las áreas de crianza y las zonas de agregación de adultos de *S. lewini*, nos va a permitir identificar las zonas prioritarias para la conservación de la especie, complementando la protección que se les brinda a los adultos en los parques nacionales y áreas marinas protegidas a lo largo del POT, con la protección de las crías en sus áreas de crianza.

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la conectividad genética entre las diferentes áreas de crianza potenciales y las zonas de agregación de adultos de *S. lewini* en el POT?

¿Cuál es la estructura poblacional de *S. lewini* en el POT?

¿Cuál es el tamaño poblacional efectivo de *S. lewini* en el POT?

OBJETIVO GENERAL

Establecer la conectividad genética y estructura poblacional del tiburón martillo *Sphyrna lewini* en el Pacífico Oriental Tropical.

Capítulo 1. Un área de crianza prioritaria para la conservación del tiburón martillo común *Sphyrna lewini* en México.

INTRODUCCIÓN

El tiburón martillo común *Sphyrna lewini*, es una de las especies de tiburones de mayor importancia comercial en México, cuyas principales zonas de explotación se encuentran en el margen costero del Pacífico Mexicano (PM) (Anislado-Tolentino y Robinson 2001; Pérez-Jiménez *et al.* 2014; Furlong-Estrada *et al.* 2014, 2015). Es una especie catalogada como en peligro crítico de extinción a nivel global y no cuenta con ninguna protección especial en aguas mexicanas, además de una veda trimestral generalizada para todas las especies de elasmobranquios en el PM (DOF 2012).

Hasta la actualidad, se han realizado un gran número de investigaciones sobre *S. lewini* en las zonas costeras de diferentes partes del mundo. Sin embargo, pocas han identificado las zonas prioritarias para el manejo y conservación de la especie en sus primeras etapas de vida. En estas primeras etapas, es cuando los tiburones son más vulnerables y son actualmente, los estadios de edad más capturado por la pesca ribereña (Smith *et al.* 2009; Furlong-Estrada *et al.* 2014).

Llegar a establecer áreas de crianza concretas y bien identificadas, ha sido uno de los principales retos de la conservación de la especie, ya que su ciclo de vida comprende de dos zonas fundamentales: a) sitios de agregación de adultos, que se encuentran en islas oceánicas y montañas submarinas; y b) áreas de crianza en la zona costera (Hoyos-Padilla *et al.* 2014, Estupiñán- Montaño, *et al.* 2021). La atención y los esfuerzos de conservación de la *S. lewini* han sido ampliamente concentrado en los sitios de agregación de adultos, como las Islas Galápagos en Ecuador, Isla del Coco en Costa Rica, Isla Malpelo en Colombia y el Archipiélago de Revillagigedo en México, debido a la gran biodiversidad biológica que se encuentra en estos sitios, su historia natural, relevancia internacional, ampliación

del territorio nacional de cada país, así como por su importancia económica para actividades turísticas como el buceo SCUBA (Bessudo *et al.* 2011; Prus, 2013, Ketchum *et al.* 2014a; Nalesso, *et al.* 2019; Lara-Lizardi, 2020; Estupiñán- Montaña, *et al.* 2021).

Por otro lado, las áreas de crianza de *S. lewini* al estar ubicadas en cercanía a los principales asentamientos humanos, de los cuales, muchos de ellos dependen de la pesca artesanal como principal actividad económica, están en conflicto directo con el desarrollo y el sustento de la gente, por lo que los esfuerzos de conservación históricamente han sido muy complicados y poco eficaces (Zanella, *et al.* 2019). Es por ello, que la implementación de zonas de refugio o áreas marinas protegidas en donde la especie pueda desarrollarse en sus edades tempranas sin las limitaciones de la pesca es fundamental para la preservación del tiburón martillo común (Duncan y Holland, *et al.* 2006; Freitas, *et al.* 2009; Dicken, 2011).

Una de las principales razones que limitan la creación de zonas protegidas, además del conflicto ya mencionado con actividades humanas, es la falta de información sobre una especie particular, así como la múltiple interpretación y ambigüedad que existe al hablar de áreas de crianza para especies de tiburones. Definiciones de área de crianza como las de Bass (1978), Branstetter (1990) y Castro (1993), se basan en la designación de un área de crianza a aquellas zonas donde las hembras grávidas dejan a sus crías y donde los neonatos pasan los primeros semanas, meses o años de sus vidas. Basado en lo anterior, un gran número de áreas geográficas puede ser consideradas como áreas de crianza, lo que hace difícil la asignación a que zonas son más importantes que otras. Heupel *et al.* (2007) propone criterios adicionales, incluyendo que, para ser un área de crianza de cualquier especie de tiburón, la especie se encuentra con mayor frecuencia en esa área que en otras circundantes, dando una densidad mayor. Adicionalmente, que la especie en cuestión presentan una fidelidad a dicha área específica y que el área es utilizada por la especie a través del tiempo, mientras otras no.

Se han utilizado recopilaciones bibliográficas históricas para identificar las áreas de crianza más comunes para diferentes especies de tiburones en México (Salomon

Aguilar *et al.* 2009), donde se han utilizado las capturas pesqueras como principal fuente de información (Alejo Plata *et al.* 2007; Cuevas, 2018) y se han inferido dichas zonas para *S. lewini* utilizando estudios de biología reproductiva (Torres Huerta *et al.* 2008; Bejarano-Álvarez *et al.* 2011). Hasta la fecha, los estudios que utilizan la genética como herramienta principal para estudiar esta especie de tiburón martillo, han sido enfocados para diferenciar e identificar poblaciones, así como el flujo genético que existe entre ellas (Duncan *et al.* 2006; Nance *et al.* 2011; Castillo Olguin *et al.* 2012). Por lo que utilizando las mismas herramientas, nos propusimos i) añadir información al reservorio actual de material genético de la especie en el PM, ii) utilizar el ADN mitocondrial (ADNmt), para identificar una de las potenciales áreas de crianza más relevantes para la especie en México y iii) conocer la estructura que esta presenta comparativamente con otras localidades del país previamente estudiadas, ampliando el conocimiento sobre la variabilidad genética de *S. lewini* en el PM.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir la diversidad genética de *Sphyrna lewini* en las áreas de crianza del Pacífico Mexicano.
- Establecer si existe conectividad genética entre las diferentes áreas de crianza de *S. lewini*.
- Identificar las áreas de crianza potenciales de *S. lewini* más importantes de acuerdo con su estructuración genética.

HIPÓTESIS

La diferenciación genética entre las áreas de crianza de *S. lewini* en el Pacífico Mexicano se debe a una conectividad diferenciada con distintas zonas de agregación de adultos, debido al comportamiento filopátrico de las hembras adultas de esta especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de Estudio

El Pacífico Mexicano (PM) es una región conformada por once de los treinta y dos estados que forman el territorio nacional mexicano, siendo estos: Baja California, Baja California Sur, Sonora, Sinaloa, Nayarit, Colima, Jalisco, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas. El PM, tiene una línea de costa de 7,828 kilómetros, que constituyen el 70% del total del litoral mexicano.

La Reforma, Sinaloa ($24^{\circ}57'N$, $108^{\circ}19'W$) es una comunidad pesquera situada a 80 km de Culiacán en la costa este del Golfo de California. Es un estero que forma parte del Corredor Reforma-Marismas Nacionales en el Golfo de California. La Reforma está ubicada en la Bahía Santa María de la Reforma (BSMR), que está compuesta por un cuerpo de agua de 55,000 Ha. Sin embargo, la presencia de tiburones se concentra en la plataforma continental fuera de la bahía. La zona de estudio está limitada al norte por la boca de la Bahía llamada La Risión y al Sur por la Boca de Navolato, la cual se extiende hasta 40 kilómetros mar adentro y que es la zona comúnmente utilizada para la pesca artesanal del recurso tiburón.

Además de La Reforma, se consideraron los sitios utilizados por Castillo Olguin *et al.* (2012): Baja California, BC ($31^{\circ}52'N$, $117^{\circ}12'W$); Baja California Sur, BS ($24^{\circ}09'N$, $110^{\circ}15'W$); Mazatlán, MZ ($23^{\circ}31'N$, $106^{\circ}43'W$); Nayarit, NA ($21^{\circ}32'N$, $105^{\circ}25'W$); Michoacán, MC ($17^{\circ}52'N$, $102^{\circ}10'W$); Oaxaca, OA ($15^{\circ}39'N$, $96^{\circ}29'W$) y Chiapas, CH ($14^{\circ}30'N$, $92^{\circ}27'W$).

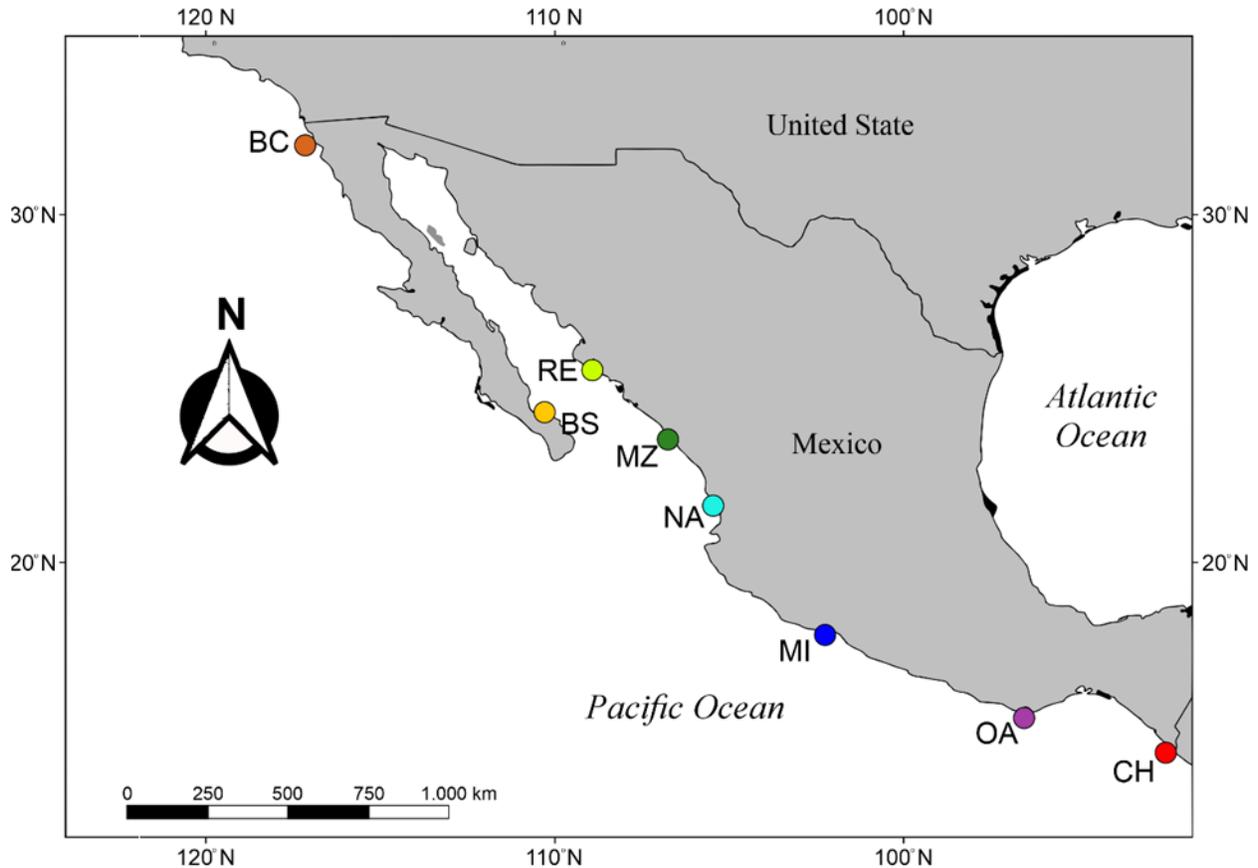


Figura 1. Área de estudio. Se consideraron 8 sitios del PM como áreas de crianza potenciales para *S. lewini*. Baja California (BC), Baja California Sur (BCS), La Reforma (RE), Mazatlán (MZ), Nayarit (NA), Michoacán (MI), Oaxaca (OA) y Chiapas (CH).

Obtención de muestras

Los muestreos en La Reforma se realizaron en octubre y diciembre de 2015 y en marzo, mayo, junio y agosto de 2016, durante salidas de Pelagios Kakunjá para estudiar las áreas de crianza del tiburón martillo común de la costa de Sinaloa. Las salidas se realizaron en su mayoría durante la noche, ya que es cuando los tiburones están más activos. La captura de los individuos se realizó mediante el uso de un palangre de 75 anzuelos circulares con ayuda de pescadores locales. A los anzuelos se les retiró la lengüeta, para facilitar la extracción del anzuelo y minimizar el daño a los tiburones al momento de ser capturado. Los lances se realizaron a la

deriva, para cubrir la mayor área posible, y cada lance tuvo una duración (tiempo de remojo) de 1 hora, para garantizar la supervivencia de los organismos, ya que el tiburón martillo común es muy susceptible a la anoxia cuando carece de movimiento, aun por cortos periodos de tiempo. La carnada utilizada fue principalmente lisa y barrilete, cortada en pequeños trozos de 50-100 gr aproximadamente.

Una vez capturados, los tiburones fueron medidos (longitud total y furcal), luego se colocaron marcas convencionales para identificar a cada individuo y para la realización de estudios adicionales y posteriormente se tomó una biopsia proveniente del cartílago de la segunda aleta dorsal, la cual se preservó en un vial Eppendorf sumergida en alcohol al 96%. Los individuos capturados fueron liberados en buenas condiciones, de acuerdo con el protocolo de marcaje y manipulación de tiburones establecido por el Comité Institucional del Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de California, Davis (IACUC, Protocolo No. 16022).

Como muestras adicionales, se obtuvieron las secuencias haplotípicas obtenidas por Castillo Olguin *et al.* (2012), para tener una representación amplia de la especie en el PM cubriendo los sitios determinados en la Figura 3. Las secuencias se obtuvieron través de la herramienta BLAST del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés) utilizando los códigos de acceso publicados por los autores: JN543266-JN543270.

Extracción de ADN y análisis moleculares

Las biopsias obtenidas mediante las salidas de marcaje se procesaron mediante el protocolo modificado de fenol cloroformo para la extracción de ADN. Las muestras de tejido se trataron con 500 µl de buffer extracción más 60 µl de sodio dodecilo sulfato (SDS) al 10% y 20 µl de proteinasa K, incubándose a 37°C por 24 horas. Posteriormente, se limpió de nucleasas y lípidos con una extracción de fenol (500

μl), una de fenol cloroformo isoamil (PCI 400 μl) y finalmente una de cloroformo isoamil (300 μl). Se precipitó el ADN con 1000 μl de etanol absoluto frío y con 20 μl de cloruro de sodio, para luego incubarlo en un congelador a -20°C por 2 hrs. Se centrifugaron a máxima velocidad, se decantó el sobrenadante y se hizo otro lavado con 200 μl de etanol frío al 70%. Para decantar el sobrenadante de nuevo y resuspender el tampón o pellet en 50 μl de TE (10 mM de Tris pH 8.0 y 1 mM de EDTA) estéril. Posteriormente se comprobó la calidad del ADN con 3 μl de la extracción (stock) y 1 μl de azul de bromofenol en un gel de agarosa al 1% y fue visualizado en un transiluminador de luz UV. Se determinó la concentración en nanogramos por microlitro con ayuda del Nano drop, para finalmente almacenarse a -4°C hasta su utilización. A partir del ADN aislado y purificado, se amplificó mediante PCR con los partidores o primers universales reportados por Stoner *et al.* (2003): Elasmocr15642F: 5'-TTGGCTCCCAAAGCC-3' y Elasmocr16638R: 5'-CCCTCGTTTTWGGGGTTTTTCGAG-3'. Los productos de PCR para la región control de ADNmt fueron secuenciado en ambas direcciones en Macrogen Inc. en Corea del Sur.

Las secuencias fueron limpiadas, alineadas y ajustadas manualmente con el programa Geneious Prime® 2022.0.1 (Kearse *et al.*, 2012) y se utilizó la herramienta BLAST para confirmar que todas las secuencias correspondan a *Sphyrna lewini*, obteniendo entre un 99-100% de coincidencia con las secuencias publicadas para la misma especie. Se estimaron los índices de diversidad genéticas tales como el número de sitios de nucleótidos de segregación (k), el número de haplotipos (n), los haplotipos privados (ph), la diversidad de haplotipos (h) y la diversidad de nucleótidos (π) para cada sitio utilizando en el software ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.* 2005).

Las diferencias genéticas entre los sitios de comparación pareada (Φ_{ST}), también denominadas como el índice de fijación o F_{ST} , se estimaron en función de las frecuencias de haplotipo como indicadores del flujo génico se calcularon en ARLEQUIN 3.11 con 20.000 permutaciones. Para evitar falsos positivos de valores

p en valores Φ_{ST} debidos a comparaciones múltiples, se aplicó una corrección de Bonferroni para obtener un valor ajustado de α (Rice 1989). Además, se estimó la red de haplotipos para todas las secuencias de regiones de control de ADNmt utilizando un algoritmo filogenético con el fin de estimar la relación entre haplotipos sin ambigüedades o conexión no determinadas (Salzburger *et al.* 2011). El modelo de sustitución se estableció de acuerdo con la mayor probabilidad logarítmica obtenida con JMODELTEST 0.1.1 (Posada, 2008). El árbol de máxima verosimilitud se cargó en el software HAPLOVIEWER (Salzburger *et al.* 2011), donde se reconstruyó y editó la genealogía del haplotipo.

RESULTADOS

Se realizaron un total de 110 lances de pesca en La Reforma, capturando 57 individuos distintos de varias especies de tiburones como *Sphyrna lewini*, *Rhizoprionodon longurio*, *Isurus oxirynchus* y *Gaelocerdo cuvier*. La especie más capturada fue *S. lewini* con un total de 34 individuos (60% de las capturas). Los individuos de *S. lewini* capturados fueron todos inmaduros (neonatos y juveniles), teniendo longitudes totales de 40cm a 138cm y una proporción de sexos de 1.1 machos por cada hembra (1.1:1). De todos los individuos capturados en La Reforma, únicamente se pudo extraer ADN de buena calidad de 18 individuos, sumando las 125 secuencias obtenidas de Castillo Olguin *et al.* (2012).

Posterior a la limpieza y alineación de las secuencias se obtuvo un fragmento de 694 pares de bases (pb) de la región control del ADNmt de un total de 143 individuos pertenecientes a 8 localidades costeras del PM (Tabla 1). Se identificaron 10 haplotipos, con una diversidad haplotípica de $h = 0.4412$. La localidad con una mayor diversidad haplotípica fue La Reforma (RE), seguida de Mazatlan (MZ), Nayarit (NA) y Michoacán (MI). Las localidades de Baja California (BC), Oaxaca (OA) y Chiapas (CH), únicamente presentaron un solo haplotipo, siendo el ya descrito por Castillo-

Olguin (2012), relacionando la baja diversidad haplotípica al bajo número de muestras correspondientes a dichas localidades.

Tabla 1. Las 8 localidades del Pacífico Mexicano, que corresponden a Baja California (BC), Baja California Sur (BS), Mazatlán (MZ), Nayarit (NA), Michoacán (MI), Oaxaca (OA), Chiapas (CH) y La Reforma (RE). Se muestra el número de secuencias de ADNmt utilizadas por sitios (N), el número de haplotipos, haplotipos privados (ph), sitios polimórficos (k), así como la diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π).

Sitio	N	No.Haplotipos	ph	k	h	π
BC	9	1	0	0	0	0
BS	17	1	0	0	0	0
MZ	36	4	1	24	0.4238+-0.0945	0.0071-0.0039
NA	24	4	1	10	0.4312+-0.1169	0.0028+-0.0018
MI	17	3	0	9	0.4044+-0.1304	0.0030+-0.0019
OA	8	1	0	0	0	0
CH	14	1	0	0	0	0
RE	18	5	5	4	0.5621+-0.1342	0.0012+-0.0010

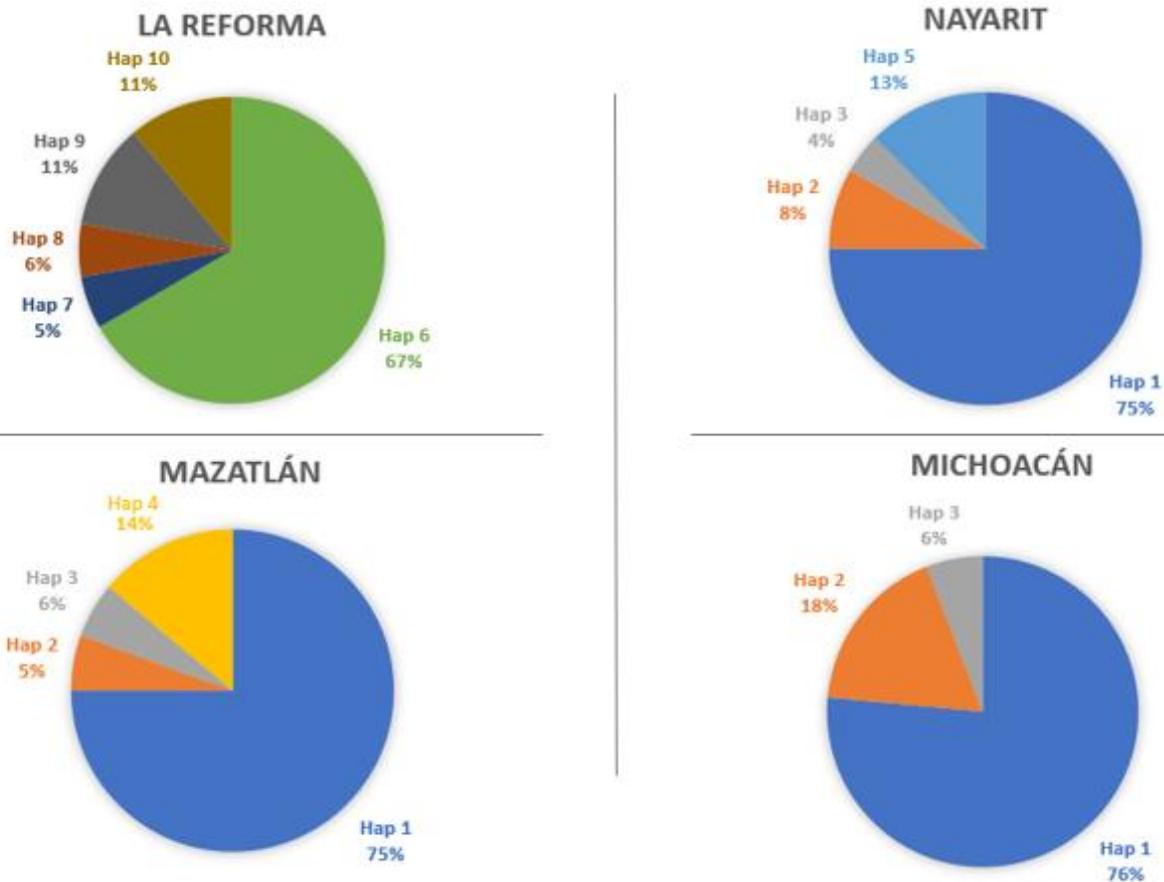


Figura 2. Composición porcentual de los 10 haplotipos presentes en los sitios con mayor diversidad haplotípica. Se puede observar que el haplotipo 1 (Hap 1) es el que está mayormente presente en todos los sitios exceptuando La Reforma. La composición haplotípica es diferente en La Reforma en comparación con los otros sitios.

Los valores de Φ_{ST} que resultaron significativos posterior a la corrección de Bonferroni, fueron exclusivamente los valores correspondientes a la comparación pareada de RE con el resto de los sitios mostrando una divergencia poblacional en este sitio con respecto a los otros (Tabla 3). De los 10 haplotipos identificados para todas las muestras, 5 corresponden a los identificados para el PM por Castillo-Olguin, y los otros 5 corresponden exclusivamente a las secuencias de RE (Figura 2)

Tabla 2. Divergencia poblacional de *Sphyrna lewini* en el Pacífico mexicano. Por debajo de la diagonal los valores Φ_{ST} entre los sitios de comparación pareada y por encima de la diagonal, los valores p correspondientes. Los valores p significativos después de la corrección de Bonferroni se resaltan en negrita ($\alpha = 0,001$).

	BC	BS	MZ	NA	MI	OA	CH	RE
BC		0.99995	0.19572	0.2159	0.25755	0.99995	0.99995	0
BS	0.00000		0.04455	0.06434	0.10163	0.99995	0.99995	0
MZ	0.05487	0.09740		0.28567	0.40598	0.23293	0.0854	0
NA	0.05597	0.10750	0.00727		0.59591	0.31669	0.0877	0
MI	0.07568	0.14062	0.00245	0.02116		0.26984	0.10858	0
OA	0.00000	0.00000	0.04593	0.04577	0.06365		0.99995	0
CH	0.00000	0.00000	0.08485	0.09175	0.12009	0.00000		0
RE	0.65148	0.71593	0.52314	0.51185	0.51871	0.64083	0.69509	

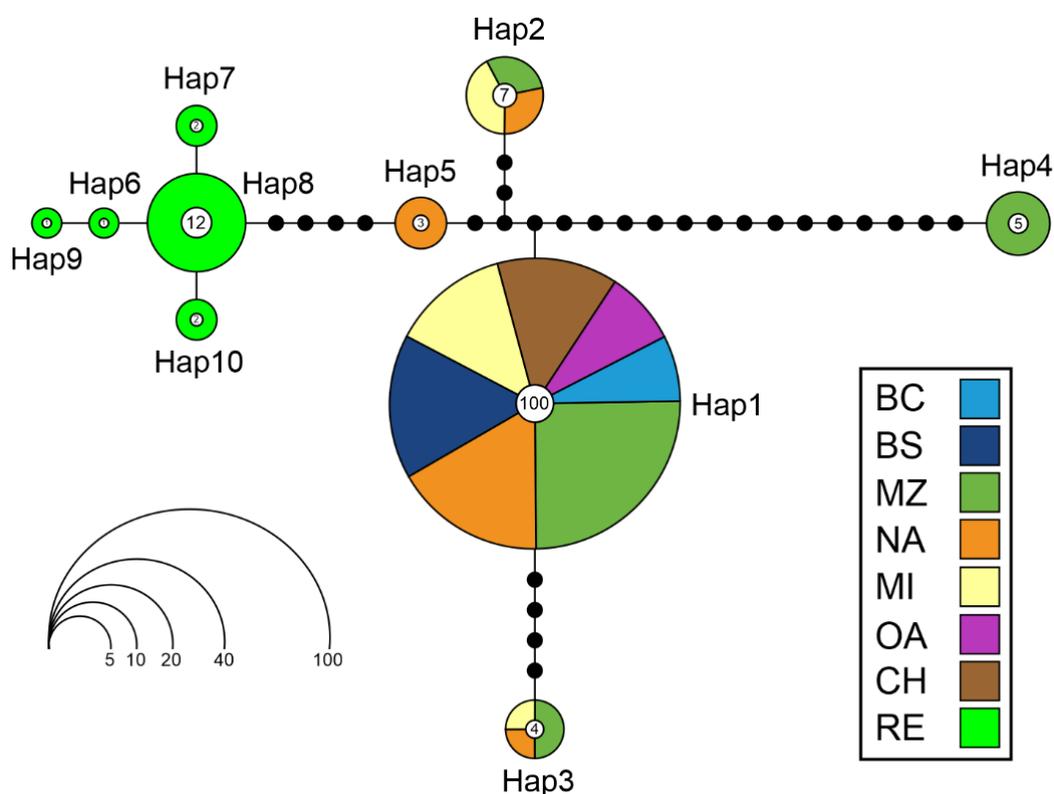


Figura 3. Genealogía/red haplotípica de *Sphyrna lewini* correspondiente a 143 secuencias de la región control de ADNmt en 8 sitios del Pacífico Mexicano. La genealogía generada por Haplotype Viewer ilustra las relaciones de los 10 haplotipos identificados. El tamaño de cada círculo indica el número de secuencias presentes para cada haplotipo y los colores corresponden a cada uno de los sitios considerados. Cada línea indica un paso mutacional entre los haplotipos y los círculos negros indican haplotipos hipotéticos faltantes. Las localidades son: Baja California (BC), Baja California Sur (BS), Mazatlán (MZ), Nayarit (NA), Michoacán (MI), Oaxaca (OA), Chiapas (CH), La Reforma (RE).

DISCUSIÓN

La evidencia genética obtenida de las secuencias parciales de la región de control del ADNmt (Figura 3), sugiere una clara diferenciación espacial entre la población de La Reforma, con otros sitios donde la especie se encuentra a lo largo del PM. Los haplotipos encontrados por Castillo-Olguín *et al.* (2012), para la zona central del PM, indican una diversidad y firma genética similar entre sitios cercanos, como Mazatlán y Nayarit. Sin embargo, la presencia de cinco haplotipos completamente diferentes y exclusivos en La Reforma refuerza la hipótesis de que esta zona costera podría ser un área de crianza prioritaria para *Sphyrna lewini*, donde la información genética de la región control de ADNmt de los neonatos y juveniles que habitan allí, es diferente de todos los demás sitios considerados. Esto posiblemente contribuya a la plasticidad de los patrones migratorios de esta especie (Coiraton *et al.* 2020).

La Reforma cuenta con una de las flotas de embarcaciones menores dedicadas a la pesca comercial más grandes del país, que podría poner en peligro la supervivencia tanto de hembras preñadas como de neonatos y juveniles que utilizan este sitio en particular, si no se establecen herramientas de manejo del recurso en un corto plazo, como tallas mínimas de captura y tonelaje máximo permitido por temporada (CONAPESCA 2004, 2017). Además, poblaciones discretas como la representada en La Reforma, pueden ser de importancia para la variabilidad genética de la especie en el PM y el Golfo de California (GC).

A escala regional, el Golfo de California tiene dinámicas oceanográficas y características geográficas muy particulares, como surgencias y una plataforma continental muy amplia en la costa oriental (Lavin *et al.* 2003) que promueven la presencia de *S. lewini* ya sea en las áreas de crianza (Rosende-Pereiro y Corgos, 2018; Rangel-Morales *et al.* 2022) y en los sitios de agregación de adultos (Klimley, y Butler, 1988; Klimley, 1993; Klimley *et al.* 2005; Ketchum *et al.* 2014b). Estas condiciones oceanográficas y de hábitat, como una extensa plataforma continental, alta productividad debido a las surgencias y un aporte constante de nutrientes

arrastrados desde el continente, mantienen decenas de kilómetros de estos estuarios, marismas, sistemas de manglares y costa en condiciones de vida adecuadas para que los neonatos y juveniles de *S. lewini* (Bernal, *et al.* 2001; Arreguin-Sánchez y Arcos, 2011). La extensión de estos ecosistemas altamente productivos en la boca del GC, junto con la filopatría que presentan las hembras a sitios selectivos dentro de esta área (Rangel-Morales *et al.* 2022), pueden generar una diferenciación en un marcador molecular hereditario matrilineal que resulta en una dinámica evolutiva diferente a la de otros sitios del PM Nance, *et al.* 2011; Castillo-Olguin *et al.* 2012). Es posible que las características oceanográficas costeras antes mencionadas, tengan una mayor influencia sobre las hembras, ya que son ellas las que viajan a las áreas de crianza cerca de la costa y no los machos, o al menos no con fines reproductivos. El apareamiento ocurre en los sitios de agregación de adultos como montañas submarinas e islas oceánicas (Salinas de León, *et al.* 2017), por lo tanto, las diferentes condiciones oceanográficas y geográficas de la costa tienen una influencia sobre las hembras que eligen las respectivas áreas de crianza en zonas costeras.

Adicionalmente, es probable que los machos sean los responsables del flujo de genes al desplazarse entre diferentes sitios de agregación de adultos y reproduciéndose de manera indistinta (Daly-Engel *et al.* 2012), mientras las hembras son responsables de la estructuración genética. Con muchos lugares diferentes con condiciones adecuadas dentro del Golfo de California, para el desarrollo óptimo de neonatos y juveniles de *S. lewini*, la selectividad de las hembras a un sitio específico, como La Reforma, es un factor que se convierte en filopatría. Esta filopatría es lo que interpretamos en el ADNmt como uno de los factores que podrían impulsar la diferenciación entre los sitios dentro del GC y otros sitios en el PM (Rangel-Morales *et al.* 2022). Por lo tanto, establecer nuevas regulaciones de manejo en las pesquerías de tiburones de tipo temporal serían de gran relevancia. Es decir, vedas más largas en tiempo en áreas particulares como La Reforma, más allá de los tres meses establecidos en la prohibición actual en el PM (DOF, 2012). Lo anterior podría ser primordial para la conservación del acervo

genético que presenta la especie en sitios particulares. Sin embargo, al solo contemplar en este estudio la firma genética de la línea matriarcal, es muy probable que, utilizando marcadores biparentales, la varianza genética se homogenice, y la distinción observada en estos resultados sea más difícil de apreciar.

Los haplotipos únicos observados en La Reforma podrían indicar un sitio de parición único para un grupo particular de hembras adultas, aunque sus rangos de distribución y de donde provienen dichas hembras siguen siendo desconocido. Se necesitan más estudios considerando el amplio rango de distribución de *S. lewini* a lo largo del POT, y aumentando las resoluciones de los marcadores moleculares (por ejemplo, SNP), que podrían proporcionar cierta claridad sobre las hembras adultas que están utilizando estas áreas para tener a sus crías y están impulsando la diferenciación entre La Reforma y los otros sitios. Además, el estudio de otras áreas de crianza potenciales en toda la costa de PM y otros sitios y ayudará a establecer la estructura genética de la población, en términos de la señal genética de los individuos ya que otros autores como Nance (2011) no encontraron una diferenciación genética a pequeña escala tan evidente como la presentada en este estudio.

CONCLUSIONES

Durante este estudio se identificó a La Reforma, como un área de crianza prioritaria para *Sphyrna lewini* por lo cual es crítico establecer medidas de manejo. Lo anterior con el fin de darle oportunidad a las hembras preñadas de parir a sus crías, y a éstas de crecer sin las limitaciones de la pesca en sus áreas de crianza. Proteger la diversidad genética de *S. lewini* es una manera fundamental de promover esfuerzos para su conservación y de comprender los aspectos micro evolutivos que la rodean.

Este capítulo se puede consultar como publicación en la siguiente referencia:

Rodríguez-Arana Favela, J.P., S., Hernández, R., González-Armas, F., Galván-Magaña, A., Tripp-Valdez, M., Hoyos-Padilla & J.T., Ketchum (2022). A priority nursery area for the conservation of the scalloped hammerhead shark *Sphyrna lewini* in Mexico. *Journal of Fish Biology*. 1(1): 1-5. DOI: 10.1111/jfb.15227.

Capítulo 2. Estructura poblacional y conectividad genética del tiburón martillo *Sphyrna lewini* en el Pacífico Oriental Tropical.

INTRODUCCIÓN

En el capítulo anterior, ya se mencionó la vulnerable situación de *S. lewini* con respecto a su historia de vida, sobrepesca y la dificultad de su estudio en cuanto a la conectividad de los hábitat críticos como lo son las zonas de agregación de adultos y las áreas de crianza, y a las limitantes que presentan ciertos métodos utilizados como la telemetría acústica y satelital (Thomas *et al.* 2012; Ketchum *et al.* 2014). Para este capítulo, se considera una metodología que puede englobar diferentes factores del estudio poblacional de la especie, así como su conectividad, sin necesidad de utilizar ningún tipo de marcas o transmisores electrónicos.

En cuanto a métodos moleculares, desde el 2006 se han utilizado herramientas genéticas como el ADN mitocondrial (ADNmt) y los microsatélites de ADN nuclear, para estudiar la composición genética de las diferentes poblaciones de *S. lewini* a lo largo de su distribución. Duncan *et al.* (2006) realizó un estudio global de la especie usando muestras de 271 organismos de 20 áreas de crianza, en el cual encontró 24 haplotipos y tres linajes genéticos diferentes. Nance *et al.* (2011) hizo un estudio muy similar enfocado al POT, donde encontró 7 haplotipos y una disminución en las poblaciones basados en el flujo genético histórico y actual. Castillo *et al.* (2012) encontraron 5 haplotipos dentro de la distribución mexicana de *S. lewini*, y una población efectiva de 2 poblaciones.

Elizondo *et al.* (2022) identificaron dos grupos genéticamente discretos, uno para México y otro para Guatemala, Costa Rica y Panamá, identificando 16 haplotipos utilizando ADNmt. Aun cuando estos trabajos son precedentes de gran importancia para el estudio de la especie, proporcionan una gran cantidad de información de alta calidad, hay ciertos factores que se deben de considerar y que aún falta analizar, para determinar la estructura poblacional de esta especie en el POT, así

como la conectividad que existe entre las áreas de crianza entre sí, así como entre los sitios de agregación de adultos y las áreas de crianza cerca de la costa.

Aun cuando los análisis con ADNmt (marcadores uniparentales) y microsatélites (marcadores biparentales) siguen siendo vigentes y se siguen desarrollando nuevos tipos de análisis y metodologías para utilizarlos, la baja en los costos de secuenciación, y el desarrollo de nuevas tecnologías, han abierto la puerta a herramientas genéticas de bajo costo y mucho más precisas para estudiar la variabilidad genética.

La secuenciación de nueva generación o de alto rendimiento (NSG, por sus siglas en inglés), utiliza procesos paralelos masivos para trabajar de manera más rápida y rentable que el método de tradicional de Sanger (Gibson y Muse, 2004). Con el NSG es posible reducir los costos y el tiempo de secuenciación del ADN y el ARN, y es posible secuenciar muestras más pequeñas, de igual manera reduciendo el tiempo y esfuerzo necesarios para prepararlas. La herramienta principal del NSG son los SNPs (Single Nucleotide Polymorphism- Polimorfismo de Nucleótido Único-pronunciado “snips”), que son variaciones en la secuencia de ADN que afecta a una sola base nitrogenada de una secuencia del genoma (Peterson, *et al.* 2012).

A manera de referencia, al utilizar la región control del ADNmt, solo se está utilizando un solo locus para encontrar diferencias entre los organismos estudiados, y al utilizar microsatélites, el número de loci estudiado corresponde al número de microsatélites utilizados, que para *S. lewini* comúnmente suelen ser entre 15-17 microsatélites (15-17 locis). Mientras, el uso de SNPs, se pueden analizar varios miles de loci a la vez, lo que puede ser de gran ayuda para identificar genes de selección y especiación entre diferentes poblaciones, ya que el nivel de resolución es mucho mayor al aumentar el número de locis analizados. De igual forma, la precisión, es decir la veracidad genética identificada, ya sea mediante diferencias o similitudes en las secuencias, de los análisis con SNPs, dependiendo los diferentes métodos existentes, puede ser desde un 98% a un 100% (Peterson, *et al.* 2012).

El método NSG escogido para este estudio, fue desarrollado por Diversity Arrays Technology Ptl Ltd, el cual es una técnica de marcadores genéticos de alto rendimiento que puede detectar variaciones alélicas para proporcionar una cobertura completa del genoma sin ninguna información de secuencia de ADN para el genotipado y otros análisis genéticos (Jaccoud, *et al.* 2001; Kilian, *et al.* 2012). Los pasos generales implican reducir la complejidad del ADN genómico con enzimas de restricción específicas, elegir diversos fragmentos para que sirvan como representaciones de los genomas padres, amplificar a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), insertar fragmentos en un vector para colocarlos como sondas dentro de un microarreglo, luego a través de métodos de hibridación con genomas de referencia y la lectura de la fluorescencia, se sometan a un sistema de imágenes que identifica bases nucleotídicas particulares (Kilian *et al.* 2012). El objetivo es identificar y cuantificar diversas formas de polimorfismo del ADN genómico de las especies muestreadas (Jaccoud, *et al.* 2001; Kilian, *et al.* 2012). Esta técnica permite el análisis de miles de marcadores moleculares que permiten una mayor resolución para investigar la variación y estructuración genética de la especie en cuestión.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la estructura poblacional y diversidad genética de *Sphyrna lewini* en el Pacífico Oriental Tropical, utilizando herramientas de secuenciación de nueva generación mediante el uso de SNPs.
2. Establecer la conectividad genética que existe entre los sitios de agregación de *S.lewini* en islas oceánicas y montañas submarinas con las áreas de crianza en las costas del Pacífico Oriental Tropical mediante el uso de SPNs.
3. Estimar el tamaño poblacional efectivo para cada zona dentro del área de estudio.

HIPÓTESIS

H₁ Existe conectividad genética entre zonas de agregación de adultos y áreas de crianza del POT, así como una diferenciación en la firma genética de México y Centroamérica, debido a las distancias geográficas y preferencias filopátricas de las hembras.

H₂ La población de *Sphyrna lewini* en el POT presenta un bajo tamaño poblacional efectivo debido a una disminución en la diversidad genética de la especie, ocasionada por la sobreexplotación pesquera en la región.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de Estudio

El Pacífico Oriental Tropical (POT) es una ecorregión marina que abarca desde la península de Baja California hasta el norte de Perú, incluyendo las islas Revillagigedo, Clipperton, Isla del Coco, Isla Malpelo y las Islas Galápagos (Spalding *et al.* 2007). En el POT se conocen dos estaciones predominantes: la seca y la lluviosa, siendo la lluviosa más larga, ya que inicia a mediados de mayo y finaliza en noviembre con un máximo de precipitación en septiembre y octubre (Lavín *et al.* 2006). El clima de la región está influenciado por la Zona de Convergencia Intertropical (ZCIT). El sistema de corrientes del POT está influenciado estacionalmente por la Contracorriente Ecuatorial, la Corriente Ecuatorial del Norte, la Corriente Costera de Costa Rica y por cierta acción intermedia de la Corriente Ecuatorial del Sur y la Corriente de California (Wyrtki, 1965).

La salinidad superficial de las aguas del POT es máxima entre marzo-abril, cuando es superior a 34psu, mínima entre octubre y noviembre cuando es inferior a 28psu, valores que están fuertemente influenciados por la precipitación de la región

(Guzmán y Cortés, 1993). Las aguas del POT, se ven afectadas por la corriente cálida que fluye desde el Pacífico occidental conocida como “El Niño”, debido al debilitamiento de los vientos del sureste a finales de cada año. Cada cierto tiempo, este fenómeno de calentamiento de las aguas superficiales se hace más pronunciado, elevando la temperatura superficial del mar, resultando en un desequilibrio de los ecosistemas marinos de toda la región (Grigg y Hey, 1992; Lavín *et al.* 2006).

El POT se caracteriza por ser una de las zonas marinas tropicales más productivas del mundo, debido al constante aporte de nutrientes por las precipitaciones, así como una zona importante de surgencias (Lavín *et al.* 2006). Desde las costas de Sinaloa en México hasta el norte de Perú, las costas están bordeadas por amplios ecosistemas de manglar, estuarios y lagunas costeras, que proporcionan refugio y alimento a un gran número de especies marinas y terrestres (Fiedler y Talley, 2006).

Los sitios de obtención de muestras fueron los siguientes:

Áreas de Crianza:

- San Bruno, BCS, México (BRUNO)
- Bahía de La Paz, BCS, México (LAPAZ)
- La Reforma, Sinaloa, México (REF)
- Boca de Camichín, Nayarit, México. (BOCA)
- Barra de Navidad, Jalisco (JALIS)
- Sipiccate, Guatemala (SIPI)
- Guatemala (GUA)
- Coyote, Costa Rica (COYO)
- Ojochal, Costa Rica (OJO)
- Panamá (PAN)

Zonas de agregación de adultos:

- La Animas, BCS, México (ANI)
- El Bajo Espíritu Santo, BCS, México (BAJO)
- Archipiélago de Revillagigedo, Colima, México (REVI)
- Isla del Coco, Costa Rica (COCO)

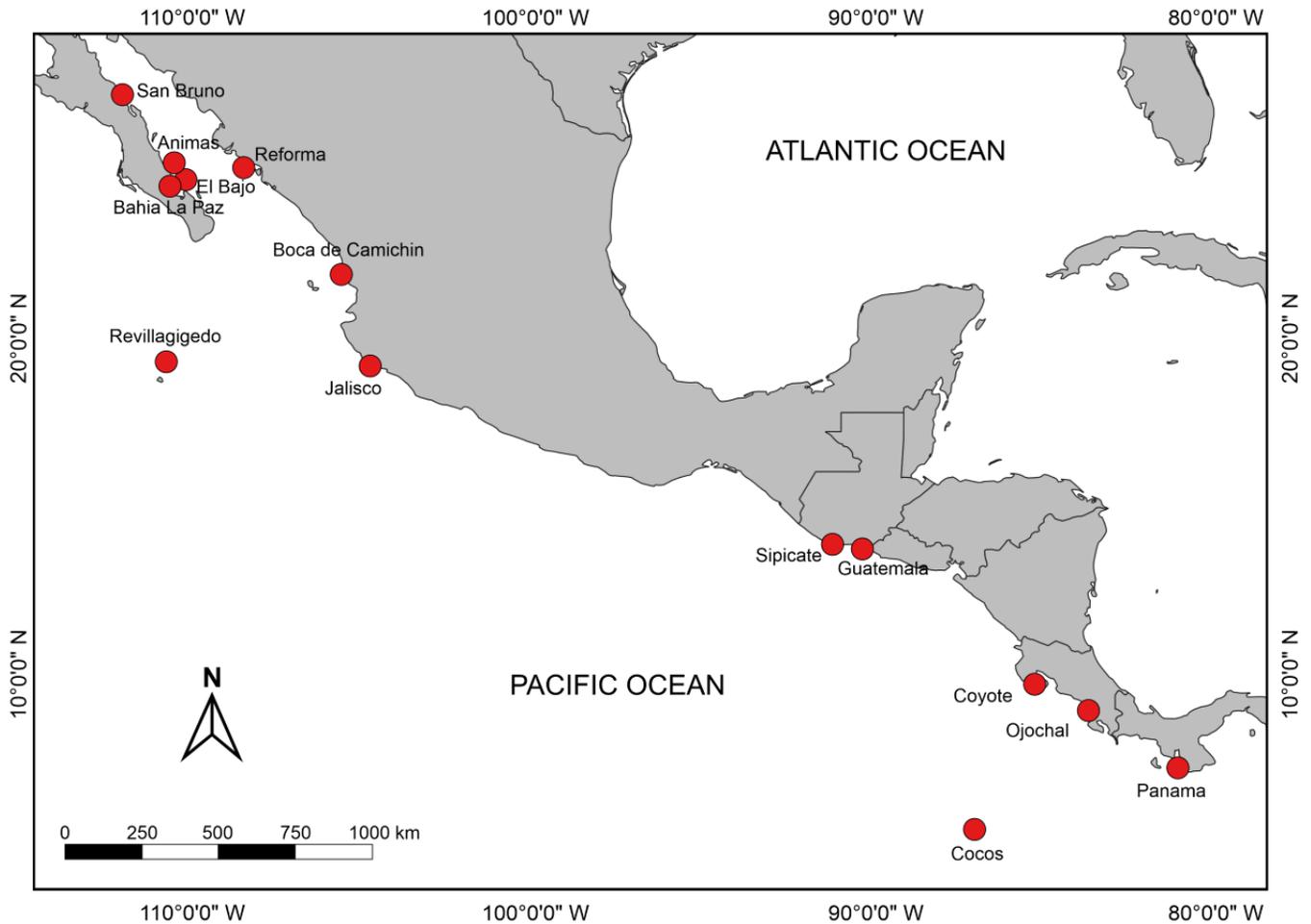


Figura 1. Área de estudio y sitios de muestreo en el Pacífico Oriental Tropical.

Obtención de muestras

Se colectaron muestras de tejido de *S. lewini* en diferentes áreas de crianza y zonas de agregación de adultos del POT. Los métodos más comunes de colecta en zonas costeras fueron utilizando organismos pertenecientes a las capturas pesqueras, trabajando con pescadores locales de varias comunidades, así como haciendo muestreos específicamente dirigidos a la especie por personal capacitado, para asegurar la supervivencia de los individuos posteriormente de ser capturados.

De cada individuo capturado en las zonas costeras, se tomó una biopsia mediante un corte de entre 2-5cm de la segunda aleta dorsal, denominado “finclip”, el cual es almacenado en alcohol etílico al 96% y refrigerado para mejorar la preservación del tejido. En caso de los organismos adultos, el muestreo solo se llevó a cabo en los sitios de agregación, donde se les toma biopsias utilizando varas hawaianas y/o arpones con puntas modificadas para extraer una cantidad pequeña de tejido, sin causar mayor daño al animal. Lo anterior se hace mediante buceo SCUBA o buceo libre (Figura 2). Los organismos adultos de mayor interés para este estudio son las hembras, ya sea preñadas o con señales de cópula, ya que son éstas las que hacen movimientos a las zonas costeras. La biopsia tomada para los organismos adultos, de igual manera fue preservada en alcohol al 96% y refrigerada.

Ya que las muestras fueron obtenidas en colaboración entre varias instituciones (CICIMAR, Pelagios Kakunjá, CREMA, BIOMOL, UDG) e investigadores de cuatro países diferentes (México, Guatemala, Costa Rica, Panamá), se decidió homologar el proceso de obtención del ADN para tener todas las muestras bajo una misma metodología. Previo a la unificación de las muestras, se realizó una submuestra de cada una de ellas, para poder tener por duplicado y almacenado parte del tejido original para futuros proyectos de investigación. Las submuestras seleccionadas para el análisis fueron colocadas en placas de PCR de 96 pocillos. Cada pocillo contenía 20mg de muestra, totalmente sumergida en alcohol al 96%. Las placas fueron enviadas al laboratorio Diversity Arrays Technology™ (DArT) en Canberra, Australia, para la extracción del ADN y la secuenciación.



Figura 2. Fotografía tomada en 2019 durante una de las expediciones a Isla del Coco, Costa Rica. En la fotografía se observa la punta de la vara hawaiana cerca de una hembra de *Sphyrna lewini*. Las marcas blancas en las aletas, así como en las branquias, son heridas ocasionadas durante la cópula, lo cual identificada a este individuo como adulto y que se apareó recientemente.

Extracción, secuenciación y obtención de SNPs

Se utilizó el protocolo de extracción de ADN para DArT (Jaccoud *et al.* 2001). Las muestras de tejido se molieron en polvo fino con nitrógeno líquido, transfiriéndose a un tubo Eppendorf conteniendo 1ml de buffer de extracción de ADN (2% CTAB 0.35 M sorbitol, 0.1 M Tris HCL pH 8.0 y 5 mM EDTA pH 8.0) y se incubaron a 65°C durante 1 hora. La suspensión se extrajo con 1ml de mezcla de cloroformo:isoamilo (24:1), mezclándose por 30 minutos, y centrifugado por 20 minutos a 10,000 rpm x g, RT. Después de la centrifugación, la fase superior se transfirió a un nuevo tubo

y el ADN se precipitó agregando 1 volumen de isopropanol helado y se lavó con 2 ml de etanol al 70%. Después del secado, el pellet se disolvió en 1xTE (10 mM Tris HCL pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0). Se revisó la calidad y cantidad de ADN en gel de agarosa al 0.8%.

La empresa DArT en Australia, procesaron las muestras de ADN extraído utilizando la técnica DArTseq™ para la construcción de bibliotecas de representación genómica, la secuenciación y el genotipado. Se siguieron los protocolos de reducción de complejidad previamente desarrollados por Kilian *et al.*, (2012). La reducción de la complejidad del genoma se logró con una digestión de doble restricción utilizando una combinación de enzimas de restricción sensibles a la metilación PstI y SphI. Las bibliotecas genómicas se secuenciaron en una plataforma Illumina HiSeq 2500 teniendo aproximadamente 1 millón de lecturas por muestra. Para la evaluación inicial de la calidad de las lecturas y la representación de las secuencias, las lecturas en bruto obtenidas se procesaron utilizando el software CASAVA v.1.8.2. (Illumina, 2020). Luego, se utilizó DArTtoolbox para realizar filtraciones, determinación de variantes y generar genotipos finales (Kilian *et al.*, 2012)

El conjunto de datos inicial fue sometidos a un riguroso proceso de filtrado con el fin de reducir la baja calidad y datos poco informativos (Larson *et al.* 2014). Los filtros se realizaron en la plataforma R (versión 4.1.3), usando el paquete dartR v. 1.9.6 (Gruber *et al.* 2021). Se eliminaron primeramente los SNPs duplicados, los SNPs monomórficos y los SNPs altamente heterocigotos, ya que no proporcionan información adecuada para el estudio. Se determinó un porcentaje de datos faltantes aceptable del 20% (Callrate 80) y una frecuencia del alelo menos común (minor allele frequency o MAF por sus siglas en ingles) de <0.02. La matriz de datos resultante se guardó en diferentes formatos como. structure, .phylip, objeto GENELIGHT y objeto GENID para su posterior análisis.

SNPs no neutrales o bajo selección

Para reducir la probabilidad de cometer errores estadísticos de tipo I o tipo II (Lotterhos & Whitlock, 2014; Narum & Hess, 2011), y además que los análisis de estructura requieren solamente marcadores neutrales, se empleó un enfoque para identificar SNP bajo la influencia de la selección natural o selección balanceadora y eliminar aquellos loci que no se ajustaban a las expectativas del equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW). BayeScan v2.1 (Foll & Gaggiotti, 2008) implementa un algoritmo bayesiano que compara las frecuencias de los alelos entre las poblaciones para estimar de manera diferente la probabilidad de que cada locus esté expuesto a la selección natural (Beaumont & Balding, 2004; Foll & Gaggiotti, 2008).

Se realizó un análisis un BayeScan utilizando 10,000 iteraciones de burn-in para todas las corridas. Los loci atípicos de F_{ST} se identificaron a partir de la salida de BayeScan utilizando una tasa de falsos positivos de <0.05 y se utilizó la función de R para graficar el resultado. Adicionalmente, todos los loci identificados como outliers o loci bajo selección, se introdujeron a la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, por sus siglas en inglés), para identificar las regiones del genoma a la que corresponden dichos loci. Se hicieron dos sets de datos: el primero de SNPs neutrales y el segundo incluyendo SNPs tanto neutrales como bajo selección.

Estructura poblacional y tamaño poblacional efectivo (N_e)

Se utilizó el set de SNPs neutrales en el software STRUCTURE v.2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) a través de la plataforma CIPRES Science Gateway v. 3.3 (Cyberinfrastructure for Phylogenetic Research) para inferir la estructura genética de la población y patrones de mezcla entre poblaciones, permitiendo examinar la existencia de grupos biológicos dentro de nuestra muestra. Se realizaron 20 corridas independientes para $K = 1-14$ (14 sitios totales contemplados en este estudio) utilizando 1.000.000 de pasos MCMC (Cadena Markov Montecarlo), un burn-in de

100,000 iteraciones y considerando un modelo de mezcla y frecuencias correlacionadas.

Se examinaron los valores de α y el perfil de probabilidades posteriores para evaluar la convergencia entre corridas independientes. STRUCTURE Harvester (Earl y VonHoldt, 2012) se utilizó para extraer los valores de Q de cada ejecución para cada valor K, y luego se resumió en el programa CLUMPP 1.1.2 (Jakobsson y Rosenberg, 2007). El método 'Evanno' (Evanno *et al.*, 2005) y el método Puechmaille (Puechmaille, 2016) se utilizaron para inferir el número más probable de grupos biológicos, utilizando el software basado en la web StructureSelector (Li y Liu, 2018).

Se exploraron más a fondo los patrones de estructura genética, realizando un análisis del componente principal (PCA) y un análisis discriminante del componente principal (DAPC) utilizando el paquete de R ADEGENET (Jombart, 2008). Estos son métodos de reducción de dimensionalidad utilizados para transformar y proyectar puntos de datos en menos ejes ortogonales que pueden explicar la mayor cantidad de varianza en los datos genéticos, al maximizar (DAPC) o no (PCA) las diferencias. Se utilizó el programa NE Estimator v. 2.1, para calcular el tamaño poblacional efectivo (N_e), usando el método de desequilibrio de ligamiento con un valor de p crítico de 0.05.

Posteriormente, se infirió un árbol de máxima verosimilitud (MV) en RAxML v8.2.X 232 (Stamatakis, 2014) utilizando el modelo evolutivo GTR + G para el set de datos completos (SNPs bajo selección y neutrales). Para las búsquedas completas del árbol de MV, se utilizaron 1.000 réplicas de bootstrap en el algoritmo de RAxML para tener en cuenta la incertidumbre en la estimación de la topología del árbol (Stamatakis, 2014) en el CIPRES Science Gateway (Miller, Pfeiffer & Schwartz, 2010). El árbol resultante fue editado en el software Figtree v. 1.4.4.

Parentesco

Para identificar la presencia de relaciones familiares a varios niveles dentro de la muestra, se utilizó el paquete de R “Relate” v.1.0 (Pew, et al. 2015), utilizando la función COANCENTRY y los estimadores de parentesco de Li *et al.* (1993), Lynch y Ritland (1999), Queller y Goodnight (1989), Wang (2002) y Ritland (1996). Primeramente, se realizó una comparación entre los individuos del mismo sitio, y posteriormente una comparación entre sitios, para detectar si es posible identificar el flujo genético de un sitio a otro, a partir de las relaciones familiares de los individuos muestreados.

RESULTADOS

Se seleccionaron 282 muestras de 14 sitios diferentes del POT para su secuenciación. Se obtuvo un set inicial de 82,639 SNPs y metadatos asociados a cada locus en una matriz de Excel entregada por DArT. Posterior al proceso de filtrado realizado en R, se obtuvo un set de datos de 3987 SNPs totales correspondientes a 239 individuos (Tabla 1). Durante el proceso de filtrado, se determinó el porcentaje de datos faltantes del 20% (callrate), ya que las muestras de *S. lewini*, principalmente de los adultos, no son fáciles de conseguir, por lo que se decidió sacrificar el valor del callrate (80, en lugar de un valor más elevado, ej. 95), en aras de conservar la mayor cantidad de individuos. Aun así, el proceso de filtrado eliminó a 43 individuos que no cumplieron con los requerimientos y parámetros establecidos.

Tabla 1. Número de muestras por sitio. Los sitios se separaron por áreas de crianza (neonatos y juveniles) y zona de agregación de adultos. Se muestra el numero inicial de muestras individuales secuenciadas para cada uno de los 14 sitios considerados, y el número de muestras que se utilizaron para los análisis, posterior al proceso de filtrado. La eliminación de individuos se debe principalmente, a un gran número de datos faltantes en las secuencias para dichos individuos.

Áreas de crianza	No. inicial	No. final
San Bruno (México)	19	16
Bahía de La Paz (México)	23	18
La Reforma (México)	24	20
Boca de Camichín (México)	24	22
Jalisco (México)	24	23
Sipicate (Guatemala)	19	7
Guatemala	24	21
Coyote (Costa Rica)	24	24
Ojochal (Costa Rica)	24	18
Panamá	22	22
Zonas de agregación de adultos		
Las Ánimas (México)	4	4
El Bajo Espíritu Santo (México)	24	21
Revillagigedo (México)	4	3
Isla del Coco (Costa Rica)	23	20
Total	282	239

Con el programa BayeScan se encontraron nueve SNPs bajo selección positiva identificados por sus valores de F_{ST} , una probabilidad posterior de <0.95 y una tasa de falsos positivos estrechada al máximo de 0.05 (Figura 3). Al tener SNPs bajo selección positiva, se identificó la secuencia correspondiente a cada uno de los nueve SNPs en la matriz original de datos, y al utilizar la herramienta BLAST, no se encontraron secuencias parecidas. Esto se debe a que aún no se encuentra publicado el genoma completo de *S. lewini*, por lo que saber a qué gen corresponden dichos SNPs, y que es lo que se ha estado seleccionando no es posible por el momento. Los 9 SNPs bajo selección positiva, fueron eliminados de un set de datos, para hacer los análisis de estructura, exclusivamente con SNPs neutrales.

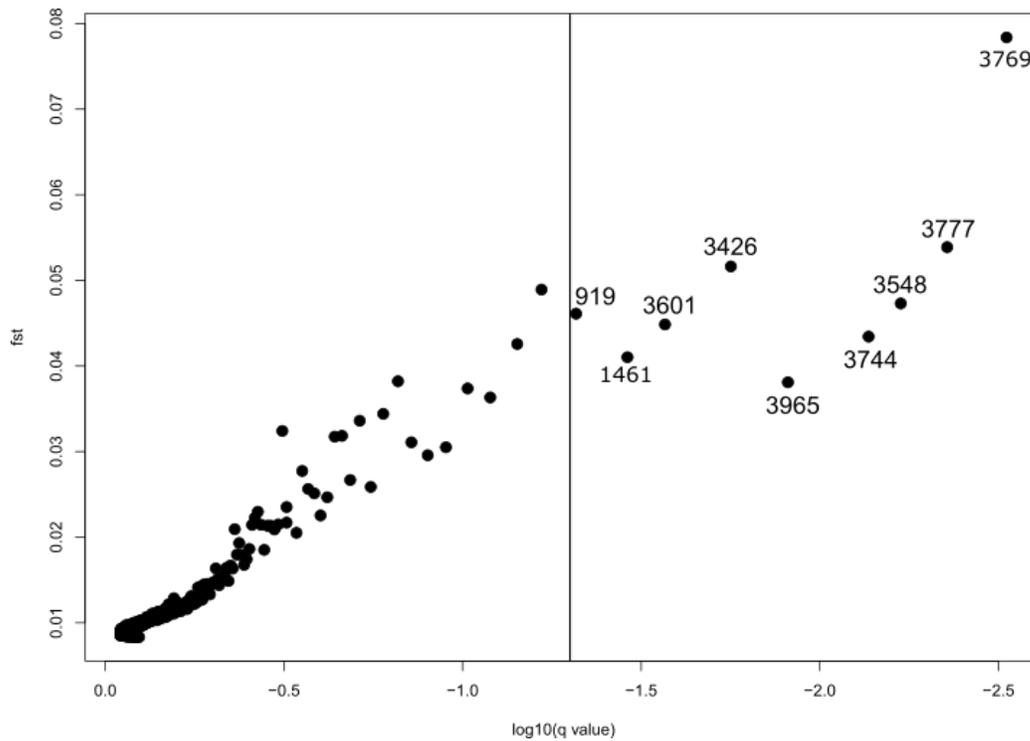


Figura 3. SNPs bajo selección positiva identificados con el software BayeScan. Cada punto representa cada uno de los 3987 SNPs, graficados de acuerdo con el valor de F_{ST} . La línea divisoria en medio del gráfico representa la tasa de falsos positivos de 0.05. Todos los SNPs a la derecha de esa línea, se consideran bajo selección positiva.

Estructura poblacional

Utilizando el set de datos correspondiente a los SNPs neutrales, en los resultados de DAPC (Figura 4. A), se observa una ligera estructura de algunos de los sitios, concretamente de Sipicate (SIPI), Guatemala (GUA) y Revillagigedo (REVI). Para este último, la estructura mostrada se debe a un bajo número de muestra (3) que está estirando la varianza mostrándola como un componente diferente. Para el caso de SIPI y GUA, ambos cuentan con un número aceptable de individuos. Sin embargo, es curioso que se muestre dicha estructura claramente diferenciada, ya que ambos sitios están en Guatemala y geográficamente muy próximo uno del otro. Es común que, al maximizar las variancias entre los sitios, se maximice también la separación que existe entre ellos y se disminuya la variación dentro de cada sitio, siendo esta la base del DAPC (Jombart *et al.* 2010). A diferencia del DAPC, el PCA (Figura 4. B) muestra un solo componente en donde convergen todos los sitios, mostrando que no existe variación entre los sitios.

Los resultados de STRUCTURE, muestran un valor de $K=3$ utilizando el método de Evanno (2005), indicando la presencia de tres clusters o stocks genéticos dentro de la muestra. Lo interesante de ello, es que como se muestra en la Figura 5, los tres clusters o stocks genéticos no diferencian entre sitios, sino que todos los sitios tienen presencia de cada uno de ellos en diferentes proporciones. Los colores azul, naranja y morado mostrados en las gráficas de barras de la Figura 5, indican el porcentaje del stock genético que presenta cada individuo.

El stock azul, es el componente más abundante para todos los individuos y para todos los sitios, seguido por el stock naranja, que en mucho menor medida se encuentra en la mayoría de los individuos y el stock morado, siendo el menos representado, que se encuentra en todos los individuos. Este último, inclusive en algunos individuos, reemplaza al stock naranja, pero en mucha menor proporción. Adicionalmente, la gráfica de Delta K, también construida a través del método de Evanno, muestra claramente un valor de $K=3$ (Figura 6. A).

Sin embargo, utilizando como método adicional de comprobación, el método de Puechmaille (2016), en donde se establece que el cálculo de Delta K por el método de Evanno, no siempre es preciso cuando se consideran poblaciones o grupos con número de muestras desiguales o desproporcionadas, lo que arroja resultados de K que no siempre son precisos. En el caso de este estudio, algunos de los sitios considerados tuvieron una menor cantidad de muestras que el resto. Sin embargo, no se removieron del estudio, ya que se consideró fundamental preservar la mayor cantidad de individuos posible.

De acuerdo con lo anterior, el método de Peuchmaille determinó un único cluster genético, y por lo tanto una única población que contempla los 14 sitios considerados, lo que concuerda con los resultados del PCA. Es importante establecer, que esto también corresponde a lo establecido por STRUCTURE, ya que los stocks genéticos encontrados dentro de la muestra y representados en la Figura 5, no diferencian entre sitios, sino que dichos stocks, están presentes en la gran mayoría de los individuos, por lo que su composición genética es la misma.

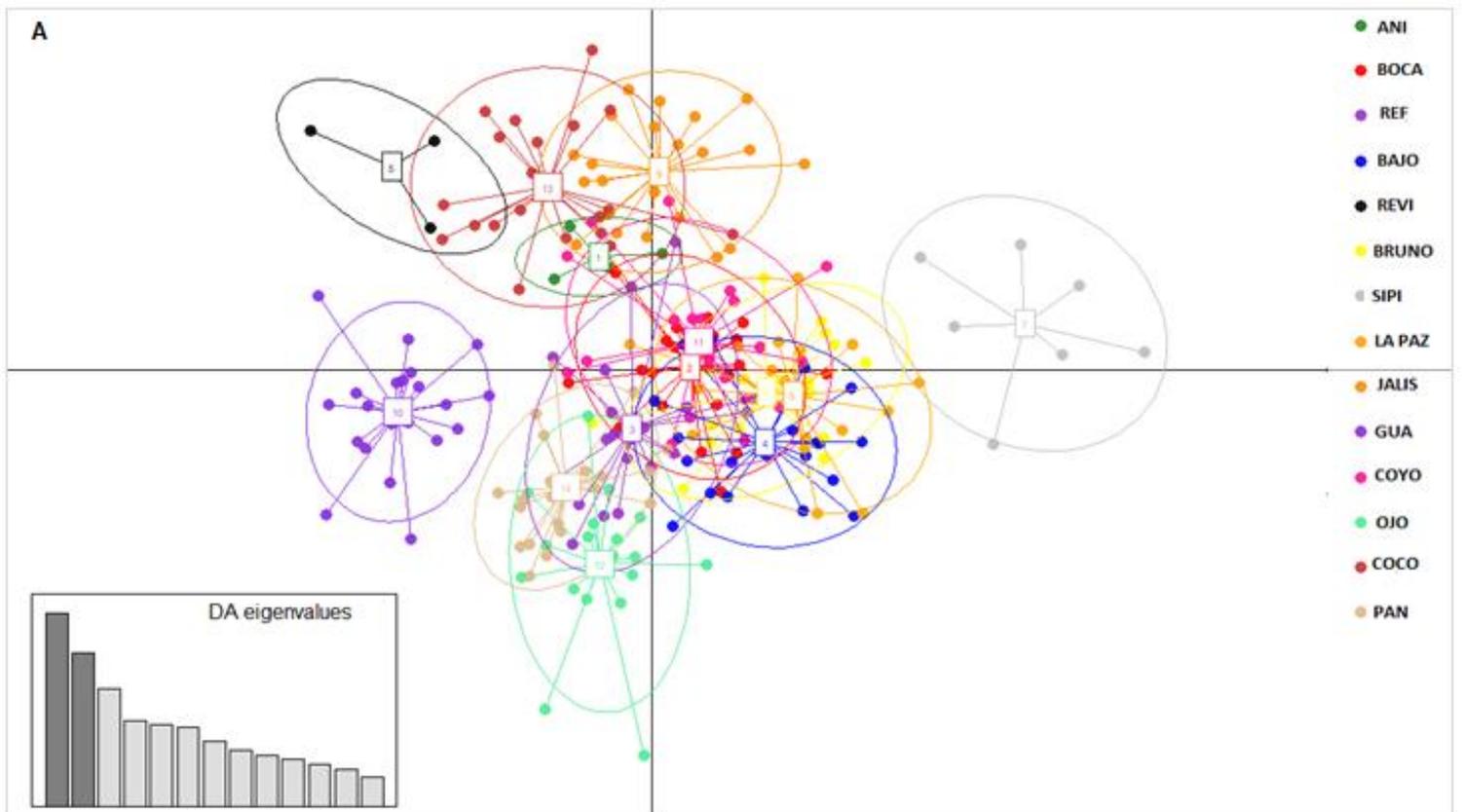
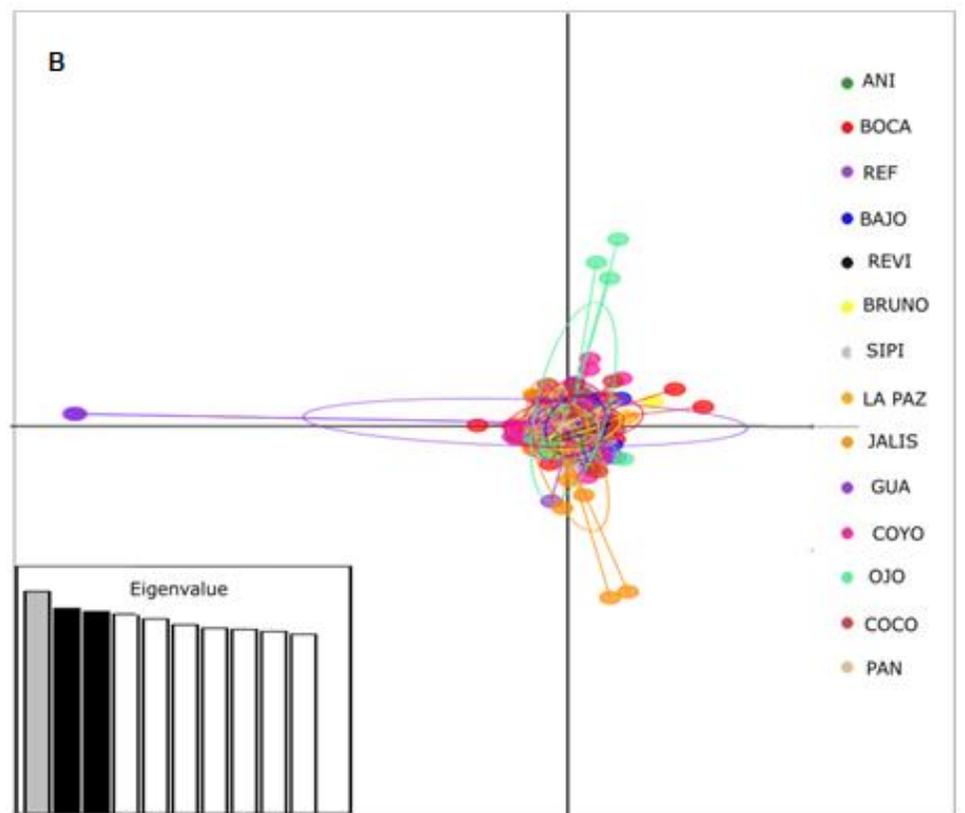
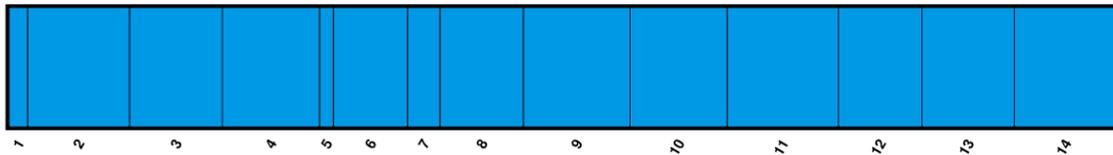


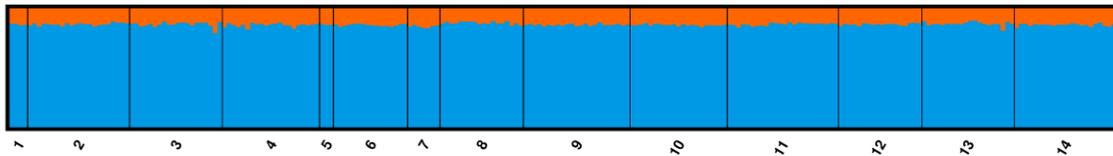
Figura 4. A) DAPC de SNPs neutrales. Cada color representa uno de los 14 sitios del POT y cada punto representa un individuo de *S. lewini*. Se muestran algunos grupos diferenciados del resto como Guatemala (GUA) y Sipicate(SIPI). Sin embargo, la mayoría se encuentran sobrepuestos. B) PCA de SNPs neutrales. A diferencia del DAPCS, donde las varianzas se estiran más, en esta figura se observa una completa sobreposición de todos los sitios, con algunos outliers, lo que representa que todos los sitios forman parte del mismo componente, y por lo tanto existe panmixia.



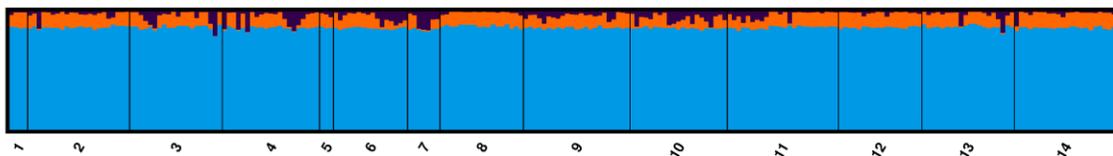
K=1



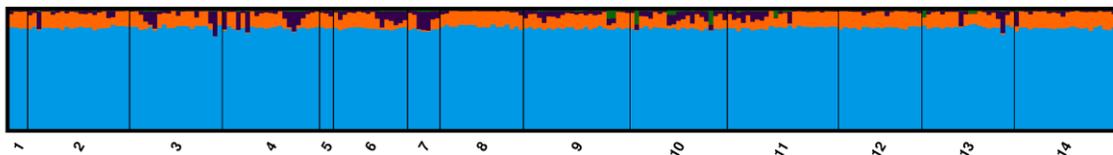
K=2



K=3



K=4



K=5

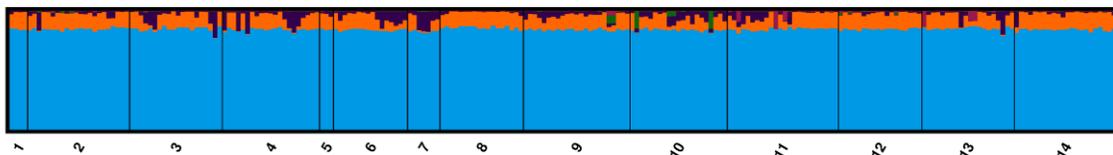


Figura 5. Gráficas de barras obtenidos a través de Structure Harvester para 14 sitios de *Sphyrna lewini* en el POT. Se realizaron para cada una de las 14 poblaciones posibles (K=14), sin embargo, solo se muestran los gráficos de K= 1-5. De acuerdo con STRUCTURE, el K=3 es el que mejor describe a los datos. En la figura, cada segmentación rectangular (1-14) representa cada sitio y el grosor de cada segmentación, es proporcional al número de individuos, los que están representados en las pequeñas barras. Los colores representan los diferentes stocks genéticos dentro de la muestra.

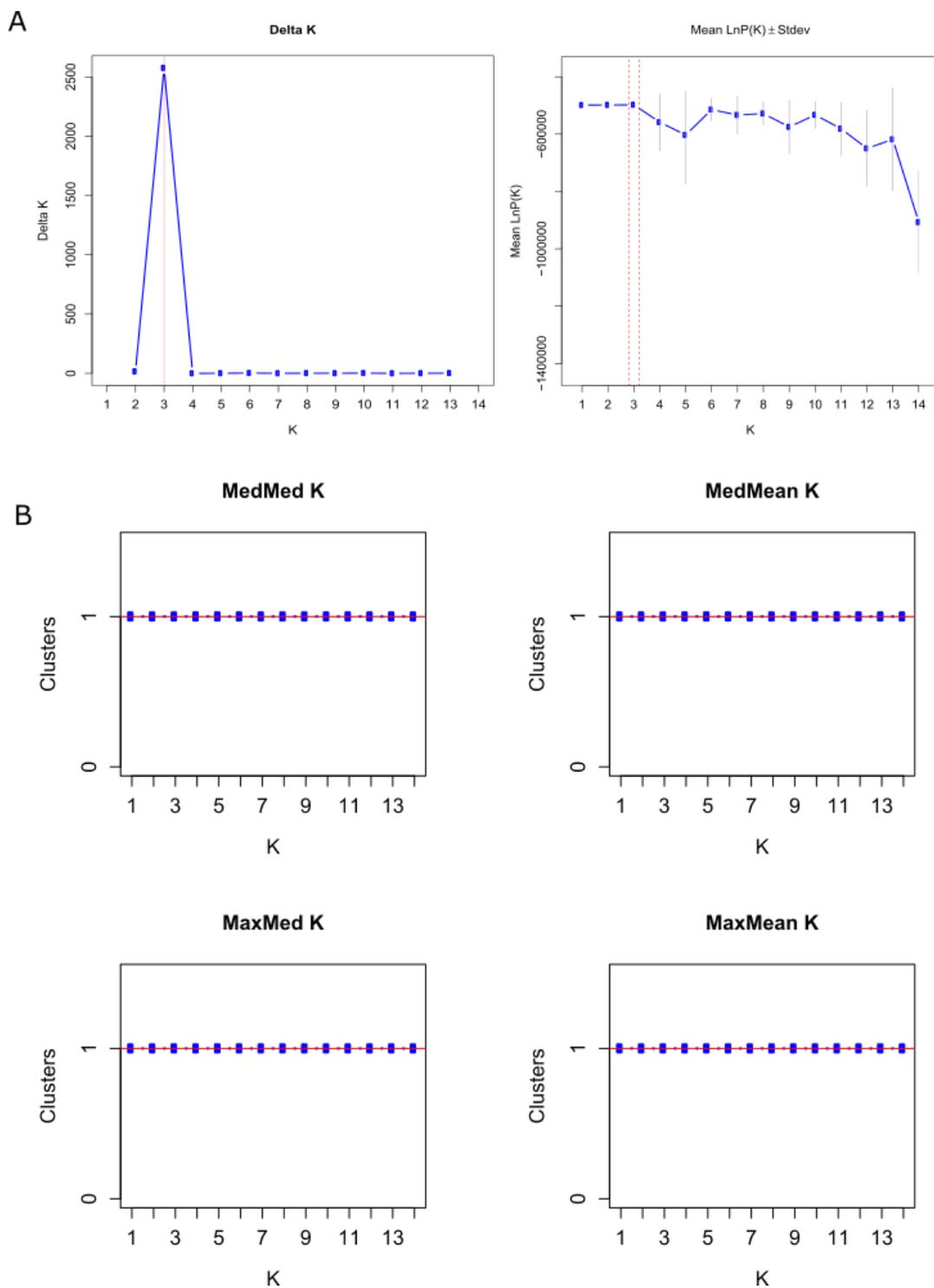


Figura 6. A) Gráficos obtenidos a partir de Structure Harvester para la detección del número de clusters (K) de *Sphyrna lewini* en el POT, a través del valor de Delta K calculado mediante el método de Evanno (2005), identificando un $K=3$. B) Detección del número de clusters utilizando el modelo correctivo de Puechmaille (2016), identificando un solo cluster para todos los sitios considerados.

Tamaño población efectivo (Ne)

Para el tamaño poblacional efectivo, este únicamente pudo ser calculado utilizando el valor de p crítico de 0.05, y aun así, hubo algunos sitios con un número bajo de N, a los cuales no fue posible realizar el cálculo a través del programa NE Estimator. Sin embargo, el cálculo de Ne para alguno de los sitios nos proporciona una idea general del estado de la población (Tabla 2). La mayoría de los sitios tuvo un valor de Ne muy bajo, siendo Guatemala el sitio con un tamaño población efectivo menor con 44.5 individuos.

Tabla 2. Tamaño poblacional efectivo (Ne) para *Sphyrna lewini* en el POT, utilizando el método de disequilibrio de ligamiento con un valor de p crítico de 0.05.

SITIO	N	NE (0.05)
Animas	4	-
Boca	22	140.4
Reforma	20	1675.8
El Bajo	21	1737.6
Revillagigedo	3	-
Bruno	16	-
Sipicate	7	-
La Paz	18	403.5
Jalisco	23	80.6
Guatemala	21	44.5
Coyote	24	194.9
Ojochal	18	146
Cocos	20	67.6
Panamá	22	1356.3

Parentesco

Mediante el análisis de parentesco, se pudo identificar relaciones familiares basadas en los estimadores de parentesco establecidos por los autores del programa Related (Pew. *et al.* 2014, Figura 7). Mediante esta estimación, los valores de parentesco se centran entre 0-1, teniendo una relación familiar más cercana cuando los valores son cercanos a 1 y ninguna relación familiar, cuando la estimación del valor de parentesco es 0. En las comparaciones entre los individuos de un mismo sitio, se encontró una relación de hermanos directos entre dos individuos de Guatemala, por un lado, y dos individuos de Isla del Coco por otro lado (Figura 8). Estos valores de parentesco fueron los más alto para este tipo de comparaciones (0.79 o más), siendo similares mediante el uso de varios estimadores (ej. Wang, Lynchli, Lynchrd, Ritland y Quellergt) lo que les da rigor a dichos valores de parentesco. Adicionalmente a esos individuos identificados como hermanos directos, se identificaron al menos 12 individuos adicionales como posibles medios hermanos (Tabla 3.)

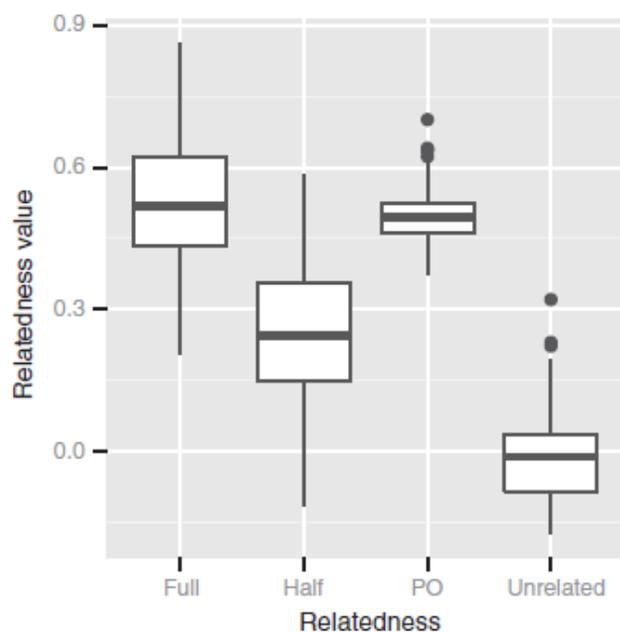


Figura 7. Diagrama de Caja representando los valores de parentesco (Relatedness) de diferentes relaciones familiares tomado de Pew et al. (2014). Hermanos directos (Full), Medios hermanos (Half), Padre-hijo (PO) y No relacionados (Unrelated).

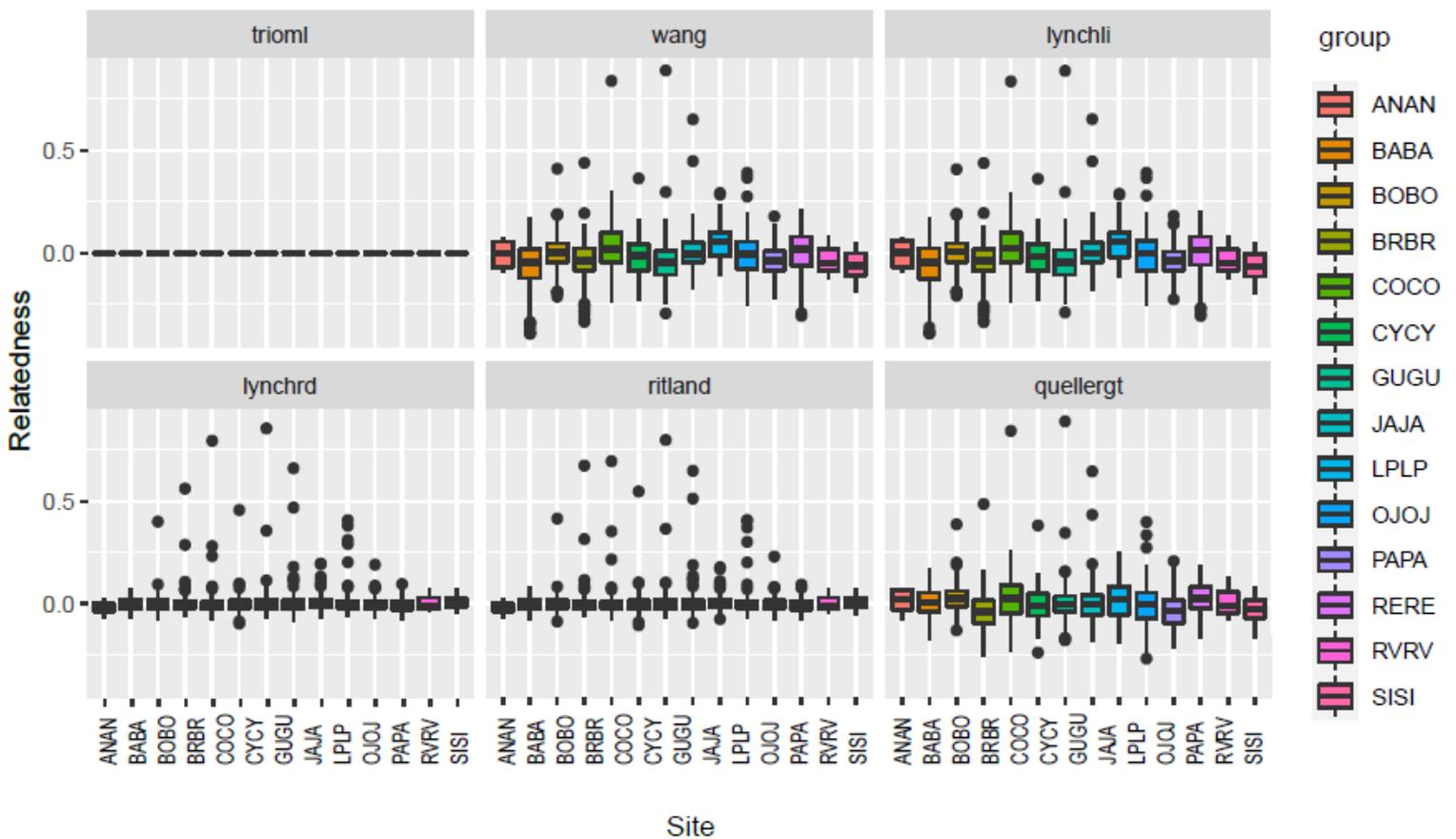


Figura 8. Diagrama de caja representando la estimación de parentesco entre los individuos de *Sphyrna lewini* de cada sitio del POT, obtenida mediante el programa Related, usando varios estimadores (Wang, Lynchli, Lynchrd, Ritland y Quellertg). Cada caja representa la comparación de cada individuo contra el resto de los individuos del mismo sitio. Los valores cercanos a cero indican que no existe relación familiar alguna, y los outliers representados por los puntos negros, representan una estimación entre dos individuos que tienen una relación familiar próxima. AN (Animas), BA (Bajo), BO (Boca), BR (BRUNO), CO (Coco), CY (Coyote), GU (Guatemala), JA (Jalisco), LP (La Paz), OJ (Ojochal), PA (Panama), RE (Reforma), RV (Revillagigedo), SI (Sipicate).

En cuanto a las relaciones familiares entre sitios, únicamente fue posible detectar una, entre un individuo de Isla del Coco y un individuo de Coyote (Tabla 4). A pesar de ser la única relación familiar identificada entre sitios de este estudio, es de suma importancia ya que establece una clara conectividad entre una zona de agregación de adultos y un área de crianza. El individuo identificado como CR-417, es una hembra juvenil de *S. lewini* capturada en el sitio de Coyote, en la costa de Costa Rica en 2017, la cual tiene un valor de parentesco de 0.8791 (Wang) con un macho capturado en 2008 en Isla del Coco. Dada la diferencia temporal entre las capturas de ambos individuos, la relación familiar más probable es de padre-hija

Tabla 3. Relaciones familiares más relevantes entre individuos de *Sphyrna lewini* del mismo sitio, estimado con el programa Related. Cada fila representa una relación familiar, y esta designada por el sitio, seguido por el código de identificación de cada individuo. (Ej. Boca= Boca de Camichin- MEX-014 = ID individual). Se muestran los valores para todos los estimadores considerados y el valor correspondiente. En negritas, se muestran las relaciones familiares más cercanos siendo estos hermanos directos.

Ind1 ID	Ind2 ID	Sitio	Estimador	Valor
BOCA_MEX-014	BOCA_MEX-016	BOCA	wang	0.4113
BRUNO_MEX-100	BRUNO_MEX-109	BRUNO	wang	0.4404
LAPAZ_MEX-212	LAPAZ_MEX-222	LAPAZ	wang	0.2849
LAPAZ_MEX-220	LAPAZ_MEX-224	LAPAZ	wang	0.293
JALIS_MEX-274	JALIS_MEX-275	JALIS	wang	0.4484
JALIS_MEX-282	JALIS_MEX-283	JALIS	wang	0.6524
GUA_GUA-353	GUA_GUA-372	GUA	wang	0.8904
GUA_GUA-361	GUA_GUA-362	GUA	wang	0.2978
COYO_CR-403	COYO_CR-420	COYOTE	wang	0.364
OJO_CR-578	OJO_CR-593	OJOCHAL	wang	0.3915
OJO_CR-580	OJO_CR-593	OJOCHAL	wang	0.2759
OJO_CR-582	OJO_CR-586	OJOCHAL	wang	0.3674
COCO_CR-635	COCO_CR-636	COCO	wang	0.8396
COCO_CR-637	COCO_CR-645	COCO	wang	0.2982
BOCA_MEX-014	BOCA_MEX-016	BOCA	lynchli	0.4089
BRUNO_MEX-100	BRUNO_MEX-109	BRUNO	lynchli	0.4389
LAPAZ_MEX-212	LAPAZ_MEX-222	LAPAZ	lynchli	0.2847
LAPAZ_MEX-220	LAPAZ_MEX-224	LAPAZ	lynchli	0.289
JALIS_MEX-274	JALIS_MEX-275	JALIS	lynchli	0.4475
JALIS_MEX-282	JALIS_MEX-283	JALIS	lynchli	0.6531
GUA_GUA-353	GUA_GUA-372	GUA	lynchli	0.8886
GUA_GUA-361	GUA_GUA-362	GUA	lynchli	0.2975
COYO_CR-403	COYO_CR-420	COYOTE	lynchli	0.3618
OJO_CR-578	OJO_CR-593	OJOCHAL	lynchli	0.3918
OJO_CR-580	OJO_CR-593	OJOCHAL	lynchli	0.2804
OJO_CR-582	OJO_CR-586	OJOCHAL	lynchli	0.3661
COCO_CR-635	COCO_CR-636	COCO	lynchli	0.8372
COCO_CR-637	COCO_CR-645	COCO	lynchli	0.2975
BOCA_MEX-014	BOCA_MEX-016	BOCA	lynchrd	0.4016
BRUNO_MEX-100	BRUNO_MEX-109	BRUNO	lynchrd	0.5626
BRUNO_MEX-101	BRUNO_MEX-103	BRUNO	lynchrd	0.2882
JALIS_MEX-274	JALIS_MEX-275	JALIS	lynchrd	0.4698
JALIS_MEX-282	JALIS_MEX-283	JALIS	lynchrd	0.6615
GUA_GUA-353	GUA_GUA-372	GUA	lynchrd	0.8557
GUA_GUA-361	GUA_GUA-362	GUA	lynchrd	0.3571

Continuación Tabla 3.

COYO_CR-403	COYO_CR-420	COYOTE	lynchrd	0.4581
OJO_CR-578	OJO_CR-593	OJOCHAL	lynchrd	0.4088
OJO_CR-580	OJO_CR-593	OJOCHAL	lynchrd	0.3123
OJO_CR-582	OJO_CR-583	OJOCHAL	lynchrd	0.2926
OJO_CR-582	OJO_CR-586	OJOCHAL	lynchrd	0.3813
COCO_CR-635	COCO_CR-636	COCO	lynchrd	0.7958
COCO_CR-642	COCO_CR-643	COCO	lynchrd	0.282
BOCA_MEX-014	BOCA_MEX-016	BOCA	ritland	0.4164
BRUNO_MEX-100	BRUNO_MEX-109	BRUNO	ritland	0.6747
BRUNO_MEX-101	BRUNO_MEX-103	BRUNO	ritland	0.3162
JALIS_MEX-274	JALIS_MEX-275	JALIS	ritland	0.5135
JALIS_MEX-282	JALIS_MEX-283	JALIS	ritland	0.6492
GUA_GUA-353	GUA_GUA-372	GUA	ritland	0.7993
GUA_GUA-361	GUA_GUA-362	GUA	ritland	0.3666
COYO_CR-403	COYO_CR-420	COYOTE	ritland	0.5486
OJO_CR-578	OJO_CR-593	OJOCHAL	ritland	0.408
OJO_CR-580	OJO_CR-593	OJOCHAL	ritland	0.3028
OJO_CR-582	OJO_CR-583	OJOCHAL	ritland	0.3727
OJO_CR-582	OJO_CR-586	OJOCHAL	ritland	0.4072
COCO_CR-635	COCO_CR-636	COCO	ritland	0.6958
COCO_CR-642	COCO_CR-643	COCO	ritland	0.3539
BOCA_MEX-014	BOCA_MEX-016	BOCA	quellert	0.3884
BRUNO_MEX-100	BRUNO_MEX-109	BRUNO	quellert	0.4872
LAPAZ_MEX-212	LAPAZ_MEX-222	LAPAZ	quellert	0.2536
LAPAZ_MEX-220	LAPAZ_MEX-224	LAPAZ	quellert	0.2542
JALIS_MEX-274	JALIS_MEX-275	JALIS	quellert	0.4349
JALIS_MEX-282	JALIS_MEX-283	JALIS	quellert	0.6466
GUA_GUA-353	GUA_GUA-372	GUA	quellert	0.8903
GUA_GUA-361	GUA_GUA-362	GUA	quellert	0.3465
COYO_CR-403	COYO_CR-420	COYOTE	quellert	0.3827
OJO_CR-578	OJO_CR-593	OJOCHAL	quellert	0.3998
OJO_CR-580	OJO_CR-593	OJOCHAL	quellert	0.2744
OJO_CR-582	OJO_CR-586	OJOCHAL	quellert	0.3362
COCO_CR-635	COCO_CR-636	COCO	quellert	0.8439
COCO_CR-637	COCO_CR-645	COCO	quellert	0.2639

Tabla 4. Relaciones familiares de *Sphyrna lewini* encontradas entre diferentes sitios del POT. Se encontró una sola relación familiar, entre un individuo de Coyote y otro de Isla del Coco. La relación padre-hijo esta soportado por todos los estimadores considerados.

Ind.1 ID	Ind.2 ID	Sitios	Estimador	Valor
COYO_CR-417	COCO_CR-313	COYO-COCO	wang	0.8781
COYO_CR-417	COCO_CR-313	COYO-COCO	lynchli	0.8758
COYO_CR-417	COCO_CR-313	COYO-COCO	lynchrdr	0.8455
COYO_CR-417	COCO_CR-313	COYO-COCO	ritland	0.7964
COYO_CR-417	COCO_CR-313	COYO-COCO	quellergt	0.8696

Como último resultado, el árbol de máxima verosimilitud (MV), creado con SNPs neutrales y bajo selección usando la herramienta RAxML, nos indica la genealogía de los individuos colectados, siendo esta una descripción de como evolutivamente está funcionando la población. El centro del árbol genealógico corresponde al origen ancestral y lo más alejado del centro corresponden a los organismos más derivados. Por lo tanto, el tiburón más basal corresponde al individuo MEX-001 colectad en Las Animas, Baja California Sur, México (Figura 9).

De igual manera, muestra que los tiburones derivados de la genealogía corresponden también a México, pero al sitio de Boca de Camichín, Nayarit (Figura 9). Dentro de la genealogía, destacan aquellos individuos que poseen alguno de los SNPs bajo selección, denotados con puntos rojos e identificados anteriormente por lo que poseen un valor de soporte mayor del 90%, lo que hace que esos individuos sean genéticamente diferentes al resto. Coincidentemente, muchos de los individuos que poseen SNPs bajo selección, son aquellos identificados como padre-hijo, hermanos directos y medios hermanos en los análisis de parentesco.

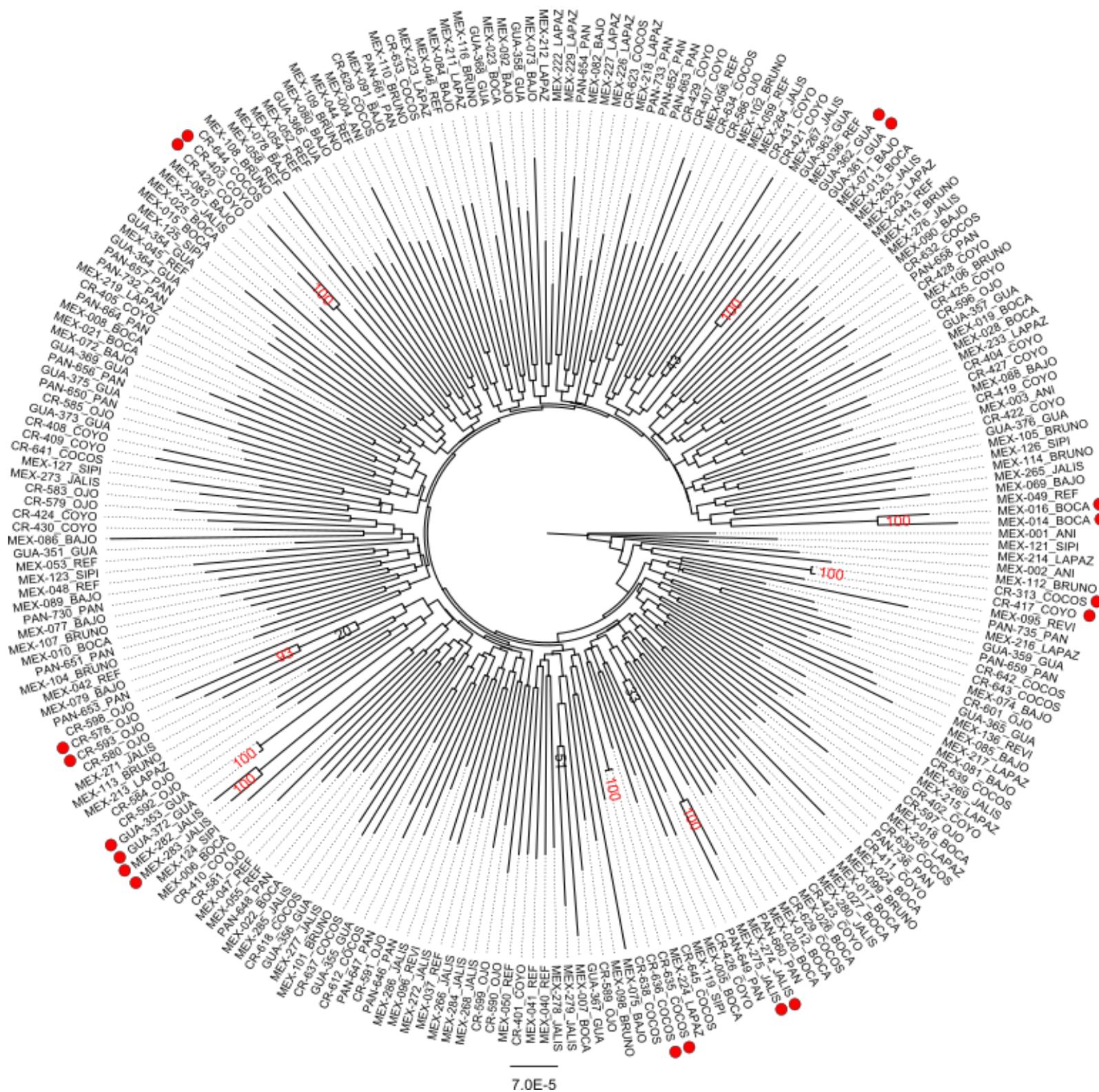


Figura 9. Árbol genealógico de máxima verosimilitud de 239 individuos de *Sphyrna lewini* del POT creado con la herramienta RAxML, contemplando 3987 SNPs tanto neutrales como bajo selección positiva. El centro del árbol representa el origen ancestral, y conforme los individuos se alejan del centro son los más derivados. En puntos rojos se identifican los individuos que presentan SNPs bajo selección positiva, y en la base de las ramificaciones se muestran los valores de soporte en color rojo superiores al 90%.

DISCUSIÓN

Los resultados de la estructura poblacional de *Sphyrna lewini* en el POT, claramente indican panmixia, lo que quiere decir que el apareamiento en toda la región es aleatorio y no hay señales de diferenciación en la población. A pesar de considerar diversas áreas de crianza y zonas de agregación de adultos alejadas entre sí, es evidente que la firma genética nuclear es sumamente similar para todos los sitios y que existe un constante flujo genético entre toda el área de estudio.

A diferencia de la hipótesis planteada, la cual establecía que, dentro de la región, existiría una diferenciación entre diferentes regiones del POT, no se detectaron subpoblaciones o distinción entre los sitios de México y Centroamérica y la ligera estructura mostrada en análisis como el DAPC, es simplemente artefactual e influenciada por el propio método. Este resultado llama la atención considerando la variabilidad de condiciones oceanográficas y a la presencia de barreras biogeográficas a lo largo de la costa, principalmente la barrera de Centroamérica (Briggs, 1974) que separa las provincias Mexicana y de Panamá. Así como las barreras pelágicas entre la costa y las islas oceánicas del POT (Hastings, 2000).

No obstante, a pesar de las barreras biogeográficas si existen ciertas similitudes del hábitat, donde existen manglares, lagunas costeras y marismas, lo que puede ser una de las razones que permitan esta homogeneidad poblacional, conectividad y movimiento entre diferentes zonas, tanto áreas de crianza como en zona de agregación de adultos, lo que derive en la panmixia observada en la región (Duncan *et al.* 2006). Otros autores ya han identificado este tipo de falta de estructura en regiones contiguas, que va relacionada a los movimientos relativamente cortos a través de márgenes continentales o regiones cercanas, y que únicamente han mostrado diferencias genéticas y estructuración a través de cuencas oceánicas, siendo estas barreras crípticas y geográficas, una de las principales originadores de estructura en la especie (Ovenden, *et al.* 2009; Daly-Engel, *et al.* 2012; Green *et al.* 2022, Elizondo *et al.* 2022).

Originalmente se consideró, que al estar las zonas de agregación de adultos muy alejadas entre si (Ej. El Bajo/Revillagigedo/Isla del Coco), estos adultos originarían estructura en las áreas de crianza cercanas, y que se podría observar con la resolución de los SNPs ya que como Ketchum *et al.* (2014), Nalesso *et al.* (2019), Aldana-Moreno *et al.* (2019) y Huepel *et al.* (2020), encontraron mediante el uso de telemetría acústica, los adultos de *S.lewini* permanecen gran parte del tiempo en sus respectivas zonas de agregación de adultos y no hacen migraciones muy extensas.

Adicionalmente, al no haber registros de movimientos de *S. lewini* entre sitios como Revillagigedo e Isla del Coco, la hipótesis de una diferenciación entre regiones era plausible. Sin embargo, puede que haya más zonas de agregación de adultos aún desconocidas, que actúen como intermediarios entre México y Centroamérica, lo que ha originado la homogeneidad genética de la especie en la región.

A pesar de no haber registros de movimientos entre zonas de agregación de adultos entre México y Centroamérica, al haber registros de movimientos interinsulares entre varias islas oceánicas como Isla de Coco (Costa Rica), Malpelo (Colombia) y Galápagos (Ecuador)(Ketchum *et al.* 2014a). Por lo tanto es muy probable que sitios fuera de nuestra área de estudio como las antes mencionadas y sus respectivas áreas de crianza en las zonas costeras de Colombia y Ecuador, al ser parte del mismo margen continental y región biogeográfica, formen parte de la misma población identificada en este estudio para el POT (Hearn, *et al.* 2010; Bessudo *et al.* 2011; Ketchum *et al.* 2014b; Nalesso *et al.* 2019). Adicionalmente, la utilización de un mayor número de marcadores moleculares arroja resultados interesantes en comparación a investigaciones previas, como por ejemplo Elizondo *et al.* (2022), donde los autores determinaron dos grupos discretos entre México y Centroamérica (utilizando marcadores uniparentales) justo como se estableció en la hipótesis de este estudio. Esto refuerza la metodología de utilizar diferentes marcadores moleculares para entender de mejor manera la dinámica poblacional de la especie en el POT.

Adicionalmente se estableció la posibilidad de que en el POT existieran varias subpoblaciones causadas por bajo flujo genético y deriva génica, lo que ocasionaría divergencia poblacional (Nance *et al.* 2011), lo que es refutado en este estudio. A pesar de no haber identificado ningún tipo de subpoblación con SNPs en el área de estudio, la posibilidad de deriva génica y otras fuerzas evolutivas como la selección actuando sobre la población, son una realidad como se discutirá más adelante.

En cuanto al tamaño poblacional efectivo (N_e), la estimación realizada nos da una idea general de cómo están las poblaciones en los diferentes sitios. Con valores de N_e que van desde los 1737 individuos para El Bajo y 44 para Guatemala, la variación entre sitios es muy grande. Es particularmente difícil utilizar los valores de N_e como una estimación poblacional real, ya que el cálculo está basado en poblaciones idealizadas. Sin embargo, es una buena referencia para contrastar entre sitio en los cuales se utilizó un número similar de N y poder comparar este valor con otros estudios y otros métodos de estimación poblacional (Caballero, 1994). Nance *et al.* (2011), estimaron N_e para La Paz utilizando microsatélites, obteniendo un valor de 435.51, siendo este valor muy cercano a 403.5 estimados mediante la utilización de SNPs en este estudio. Por otro lado, un estudio previo estimó el tamaño poblacional utilizando el modelo de captura y recaptura de Jolly-Seber en La Reforma, obteniendo un tamaño poblacional de 1922 individuos para el año 2016, nuevamente siendo este valor cercano a los 1675.8 estimados en este estudio (Rodríguez Arana, 2018). La baja tasa mutacional en tiburones, junto con la baja diversidad genética de *S. lewini* en la región, son factores que influyen en la determinación de N_e . De igual manera, bajos valores de N_e , pueden ser indicadores de diferenciación poblacional, aunque esto no fue lo observado en este estudio (Nance, *et al.* 2011, Castillo-Olguin, *et al.* 2012).

Para el análisis de parentesco, aunque se encontraron pocas relaciones familiares dentro de los individuos del mismo sitio, estas resultaron algunas predecibles y otras inesperadas sumamente interesantes. La identificación de hermanos directos en áreas de crianza como la de Guatemala (Tabla 3. GUA-353 y GUA-372), realmente no es muy sorprendente, ya que, en varios de los sitios considerados como áreas

de crianza en este estudio, el muestreo de los organismos neonatos se hizo en fechas consecutivas, por lo que la probabilidad de encontrar hermanos directos dentro del mismo sitio, durante las mismas fechas de captura eran generalmente buenas.

De hecho, se esperaba encontrar más relaciones de este nivel de parentesco en otros sitios, donde se realizaron esfuerzos de muestreo aceptables y con buenas capturas. Sin embargo, la relación familiar más abundante fue la de medios hermanos, donde identificamos en Boca de Camichín, San Bruno, La Paz, Jalisco, Coyote y Ojochal, lo cual es consistente con otros estudios que igualmente muestran la relación de medios hermanos como la más abundante (Green, *et al.* 2022).

Al ser individuos de tallas semejantes, capturados durante la misma temporada en áreas de crianza específicas, muchos de los individuos identificados como medios hermanos son parte de la misma cohorte, lo que indica que son de padres diferentes. En este contexto, es posible explicar estos resultados ya que podría suceder de dos maneras: en primer lugar, que un macho se haya apareado con más de una hembra en la zona de agregación de adultos, y que ambas hembras hayan tenido a sus crías en la misma área de crianza, lo que sería ciertamente posible ya que las hembras presentan filopatría a las áreas de crianza (Duncan, *et al.* 2006, Nalesso *et al.* 2019; Elizondo *et al.* 2022).

La segunda opción, y la más probable, es que los medios hermanos se den mediante paternidad múltiple; significando, que una hembra se aparee con más de un macho y la camada contenga progenie de diferentes padres, los cuales nacen al mismo tiempo en un área de crianza. La paternidad múltiple por poliandría ha sido registrada para *S. lewini* por Green *et al.* (2017), y es una estrategia que puede proporcionar ciertas ventajas para la especie, como una mayor diversidad y variabilidad genética, disminución en la endogamia y un aumento en el tamaño poblacional efectivo, al proveer una oportunidad de que un mayor número de machos se aparee con un mayor número de hembras.

Un resultado interesante de medios hermanos, se obtuvo en el sitio Ojochal, en donde el individuo CR-593, resultó ser medio hermano del individuo CR-578 y también de CR-580. Sin embargo, estos dos últimos, no tiene relación familiar entre sí. Esto puede ser un caso combinado de ambas de las situaciones antes mencionadas, como lo es la paternidad múltiple por poliandria, una hembra se aparea con al menos dos machos y resultan dos individuos como medios hermanos, y por otro lado, uno de esos machos se aparea con otra hembra diferente que tiene a sus crías en la misma área de crianza.

A pesar de que estas inferencias pueden ser o no ciertas, existen relaciones familiares que demuestran la conectividad entre áreas de crianza y zonas de agregación de adultos, como es el caso de dos hermanos directos, CR-635 y CR-636, a los que se le tomó la biopsia durante la misma expedición, en sitios diferentes de Isla del Coco. Lo interesante de lo anterior, es que Isla del Coco es una de las zonas de agregación de adultos más importantes del POT y uno de los pocos lugares donde se ha observado el apareamiento de *S. lewini* (Salinas de León, *et al.* 2017). Identificar la presencia de hermanos directos, es un indicativo de la importancia del sitio, ya que ambos individuos nacieron al mismo tiempo en un área de crianza no identificada, y posteriormente convergieron simultáneamente en la misma zona de agregación de adultos, algo que no había sido registrado con anterioridad. Esto reforzando la alta probabilidad de parentesco entre individuos dentro del mismo sitio encontrada por Elizondo *et al.* (2022).

El descubrimiento más relevante en cuanto al análisis parentesco entre sitios, corresponde a los individuos CR-417 y CR-313 (Tabla 5). El código de identificación CR-313, corresponde a un individuo macho, al cual se le tomó una biopsia en Isla del Coco en el año 2008, y el individuo identificado como CR-417, es una hembra a la cual se le tomó la biopsia en el área de crianza de Coyote en 2017. Dado el valor del estimador de parentesco 0.8781 (Wang), la relación familiar entre ambos individuos puede ser hermanos directos o padre-hijo. Basados en el tiempo transcurrido entre la toma de ambas muestras, la interpretación más adecuada es que se trate de padre-hija, y este sea la primera evidencia de conectividad para la

especie en Centroamérica, entre una zona de agregación de adultos (Isla del Coco) y un área de crianza (Coyote). Lo anterior refuerza la alta probabilidad de parentesco entre individuos dentro de la misma área de crianza encontrada por Elizondo et al. (2022) Esta información, se suma a la relación padre-hijo de varios individuos de la especie identificada por Quintanilla *et al.* (2015), estableciendo una conectividad entre áreas de crianza en la costa del Pacífico Colombiano y el área de agregación de adultos de Malpelo, Colombia, también en el POT.

Por último, el árbol de MV muestra resultados muy interesantes sobre los organismos más antiguos y los más recientes en la genealogía de *S. lewini* de los 239 individuos muestreados. Es interesante que el individuo más antiguo y los más recientes correspondan a México, aunque esto puede ser influencia de que el mayor número de individuos y sitios de la muestra corresponden a ese país. Como establece Duncan *et al.* (2006), la especie tiene sus orígenes filogeográficos en el Indo-Pacífico, por lo que el resto de las poblaciones de *S. lewini* a nivel mundial tienen en esa zona su origen ancestral. Esto significa que el linaje genético de los individuos más antiguos dentro de la genealogía presentada, puede ser un indicador de la ascendencia más antiguas del POT. Dicha ascendencia puede estar más relacionada con otras poblaciones más antiguas como la de Hawái en el Pacífico Central e Indo Pacífico, siendo estas poblaciones la relación filogenética más próxima a la población del POT (Duncan *et al.* 2006; Daley-Engel *et al.* 2012; Hadi, *et al.* 2020).

La diferenciación en las poblaciones mundiales de *S. lewini*, está ligada principalmente a las barreras biogeográficas, como continentes y cuencas oceánicas, como el levantamiento de Istmo de Panamá hace tres millones de años y no ha permitido el contacto entre las poblaciones del POT con las de Atlántico, haciéndolas genéticamente diferentes (Daley-Engel *et al.* 2012). Sin embargo, no siempre es requerido este tipo de barreras biogeográficas tan evidentes para causar diferenciación genética dentro de una especie, ya que situaciones ambientales y otras fuerzas evolutivas, puede generan grandes cambios en áreas comunicadas y cercanas. Por ejemplo, Quattro *et al.* (2005), al identificar una especie críptica de *S.*

lewini, en las costas de las Carolinas en Estados Unidos, encontraron que se diferencia genética y fenotípicamente de la población del Atlántico Oeste. Esto es relevante, ya que dentro de nuestra genealogía (Figura 9), encontramos individuos, muchos de estos con relaciones familiares cercanas, con valores de soporte muy alto que los hacen diferentes del resto de los individuos. Esto quiere decir, que existe algo en el genoma de ciertos individuos, identificado mediante marcadores moleculares que están siendo seleccionados positivamente, que están diferenciando a dichos individuos del resto de sus conespecíficos de la muestra en un 100% en muchos casos (Narum y Hess, 2011).

Hasta el momento no fue posible identificar a que genes corresponden dichos fragmentos que han sido seleccionados naturalmente, para poder identificar la naturaleza biológica de dicha selección, ya que aún no está publicado el genoma de la especie en su totalidad. Sin embargo, algo ha estado siendo seleccionado en ciertos individuos durante varias generaciones, que los ha estado haciendo diferentes del resto, a ellos y a sus hermanos directos (Ej. CR-635 y CR-636), medios hermanos (Ej. CR-593 y CR-578), o progenie directa (CR-313 y CR-417). Probablemente el caso más evidente de esta diferenciación es el caso de los medios hermanos MEX-014 y MEX-016, los cuales corresponden al sitio de Boca de Camichin, Nayarit, México, que tienen un valor de soporte del 100% de diferencia respecto a los demás, y están situados en el extremo más derivado del árbol genealógico, lo que quiere decir que tienen la información genética más reciente. La interpretación de dichos genes seleccionados requiere mucha cautela, ya que al no saber a qué corresponde o que codifica dicha información, no podemos hacer inferencias con precisión de lo que está sucediendo en la naturaleza, como, por ejemplo, alguna adaptación a cambios ambientales o mayor tolerancia a alguna característica oceanográfica. Sin embargo, es evidencia de que procesos microevolutivos están sucediendo en la población de *S. lewini* en el POT (Momigliano *et al.* 2017).

CONCLUSIONES

Sphyrna lewini tiene una población panmíctica en el Pacífico Oriental Tropical, por lo cual existe un constante flujo de genes en toda la región, y la hipótesis planteada suponiendo una diferenciación genética entre México y Centroamérica se rechaza. La presencia de neonatos a lo largo de toda la costa del Pacífico de México, Guatemala, Costa Rica y Panamá, basadas en los muestreos realizados para este estudio, es indicador de que la región cuenta con características geográficas y oceanográficas idóneas para albergar áreas de crianza de la especie, que están comunicadas entre sí, permitiendo el libre movimiento de los individuos, aunque con poblaciones muy reducidas demostradas con un bajo tamaño poblacional efectivo para toda la región. Existe una conectividad genética directa entre la zona de agregación de adultos de Isla del Coco y el sitio costero Coyote, Costa Rica, lo que la hace un área de crianza prioritaria para la especie, siendo esta la primera evidencia de conectividad utilizando SNPs como marcadores moleculares, entre una zona de agregación de adultos y un área de crianza para la especie en México y Centroamérica. Existe la presencia de genes que están siendo seleccionados naturalmente, y están ocasionando diferencias entre los individuos poseedores de dichos genes y el resto, lo que indica procesos micro evolutivos de dichos individuos dentro del POT. La identificación de más áreas de crianza y de su conectividad con otras zonas de agregación de adultos es fundamental para la conservación del tiburón martillo, con la cual se pueden establecer medidas de manejo más adecuadas a su ciclo de vida y al uso de hábitats críticos.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

Es importante observar como diferentes marcadores moleculares pueden expresar diferentes características de la misma especie. Durante este trabajo, se identificaron dos áreas de crianza prioritarias para la *S. lewini*: la primera mediante el uso de ADN mitocondrial, en La Reforma, México, y la segunda mediante la identificación de conectividad genética directa entre una zona de agregación de adultos con un área de crianza en Costa Rica. Esto enfatiza lo importante que es la utilización de todas las herramientas posibles, ya que un solo método o herramienta, puede no ser suficiente.

Mediante los resultados obtenidos en este estudio, podemos apoyar las conclusiones de otros trabajos, particularmente en aquellos en donde se establece que *Sphyrna lewini* es una especie en la que su estructura poblacional, está influenciada principalmente por las hembras de la especie, ya que son filopátricas y usan áreas de crianza específicas como La Reforma y Coyote. Por otro lado, la conectividad y flujo genético, están siendo impulsados por los machos, que viajan entre varias zonas de agregación de adultos generando la panmixia observada en la región (Duncan *et al.* 2006; Daley-Engel *et al.* 2012; Quintanilla *et al.* 2015; Green *et al.* 2017; Green *et al.* 2019; Hadi, *et al.* 2020; Elizondo *et al.* 2022).

Se identificaron relaciones familiares entre individuos del mismo sitio así como entre sitios, y se identificaron procesos evolutivos que están sucediendo actualmente en ciertos individuos de la especie en el POT, lo cual solo refuerza todos los argumentos proporcionados por muchos autores, en donde el POT es una zona fundamental para esta especie en peligro crítico de extinción, y que cada vez más estudios, demuestran la baja diversidad genética y el bajo tamaño poblacional

efectivo (Beaumont *et al.* 2004; Quattro *et al.* 2005; Nance *et al.* 2011; Nalesso *et al.* 2019).

El uso de marcadores moleculares ha sido constantemente probado, como una herramienta sumamente poderosa al momento de estudiar el pasado y presente de las poblaciones marinas (Dudgeon *et al.* 2012). Este trabajo, es evidencia de ello, al poder identificar áreas de crianza y conectividad entre zonas de agregación de la especie, que otras técnicas como la telemetría, no han sido suficiente para este objetivo.

Para especies como *Sphyrna lewini*, es fundamental generar más conocimiento a nivel poblacional tanto en la región, como a nivel oceánico, para poder tomar medidas efectivas de manejo, que muchas veces no es posible tomar por falta de información contundente o bajos números de muestras que simplemente no aportan datos suficientes. La amplia cobertura de marcadores moleculares como los SNPs, y el sin fin de herramientas, programas y análisis posible hoy en día, proporcionan los medios adecuados para finalmente crear un panorama de la especie, que nos permita tomar las decisiones correctas para su conservación.

RECOMENDACIONE E IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN

La vulnerabilidad de *Sphyrna lewini* no es debatible, por lo que se requieren medidas inmediatas para su manejo y conservación en el POT. El escenario ideal para la especie sería obtener un nivel de protección absoluta, como el que tienen otras especies como el tiburón blanco, el tiburón ballena y las especies de móbulas en aguas mexicanas, en el cual la especie esté protegida contra todo tipo de explotación extractiva. Siendo una especie de importancia comercial, cuyas capturas se dan en conjunto con muchas otras especies de elasmobranquios, algunas medidas más factibles serian la prohibición a la pesca en ciertas áreas,

como las áreas de crianza, tallas mínimas de captura, siendo esta 1.5m, para poder permitir a los organismos neonatos y juveniles desplazarse y darles la posibilidad de llegar a la edad reproductiva, así como cuotas máximas por número de individuos, ya que en la actualidad, se pueden extraer del tamaño que sea y la cantidad de individuos es ilimitada. Para muchas especies marinas, la creación de áreas marinas protegidas ha sido un paso fundamental para su conservación, y a largo plazo lo puede ser también para *Sphyrna lewini*. Sin embargo, al ser una especie panmíctica en la región, que se mueve dentro y fuera de estas áreas, los esfuerzos de conservación tienen que estar dirigidos a limitar, restringir o prohibir la extracción pesquera.

La identificación de áreas de crianza como La Reforma y Coyote, son excelentes ejemplos de áreas que deberían estar protegidas, por su importancia para el ciclo de vida de *S. lewini*, así como de muchas otras especies. La creación y protección de refugios pesqueros y rutas migratorias son una estrategia de manejo fundamental tanto para proteger el recurso, como aprovecharlo de manera sustentable.

REFERENCIAS

- Abdul-Muneer, P. M. (2014). Application of microsatellite markers in conservation genetics and fisheries management: recent advances in population structure analysis and conservation strategies. *Genetics research international*, 2014.
- Alain Vignal, Denis Milan, Magali Sancristobal, André Eggen. (2002). A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution*, BioMed Central, 2002, 34 (3), pp.275-305.
- Aldana-Moreno, A., Hoyos-Padilla, E. M., González-Armas, R., Galván-Magaña, F., Hearn, A., Klimley, A. P., ... & Ketchum, J. T. (2020). Residency and diel movement patterns of the endangered scalloped hammerhead *Sphyrna lewini* in the Revillagigedo National Park. *Journal of Fish Biology*, 96(2), 543-548.
- Alejo-Plata, C., Gómez-Márquez, J. L., Ramos, S., & Herrera, E. (2007). Presencia de neonatos y juveniles del tiburón martillo *Sphyrna lewini* (Griffith & Smith, 1834) y del tiburón sedoso *Carcharhinus falciformis* (Müller & Henle, 1839) en la costa de Oaxaca, México. *Revista de biología marina y oceanografía*, 42(3), 403-413.
- Álvarez Borrego, S. (1983). The Gulf of California, p. 427-449 In: *Estuaries and enclosed seas* (B.H.Ketchum, eds.). Elsevier Sci. Publ. Co., Amsterdam.
- Amezcuca, F. & B. Bellgrah. (2014). *Fisheries Management of Mexican and Central American Estuaries*. *Estuaries of the World*. Editorail Springer. 213 pp
- Amos, W., & Harwood, J. (1998). Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 353(1366), 177-186.
- Anislado Tolentino .V. (2000). Ecología pesquera del tiburón martillo *Sphyrna lewini* (Griffith y Smith, 1834) en el litoral del estado de Michoacán, México. Tesis de Maestría en Ciencias, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, 115 pp.
- Anislado V., C Robinson. (2001). Edad y crecimiento del tiburón martillo *Sphyrna lewini* (Griffith y Smith, 1834) en el Pacífico central de México. *Cienc. Mar.* 27 (4): 501 – 520.
- Anuario Estadístico de Pesca. CONAPESCA, 2015-2017.
<https://acuasesor.conapesca.gob.mx/anuario.php>

- Aranguren-Méndez, J. A., Román-Bravo, R., Isea, W., Villasmil, Y., & Jordana, J. (2005). Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión (Microsatellites (STR's), ADN Molecular Markers for Excellency for conservation programs: A review).
- Arreguín-Sánchez, F., Arcos H., E. (2011). La pesca en México: estado de la explotación y uso de los ecosistemas. *Hidrobiológica* 21(3): 431-462.
- Bailleul, D., Meckenzie, A., Sacchi O., y S. Arnaud. (2018). Large-scale genetic panmixia on the blue shark (*Prionace glauca*): A single worldwide population, or genetic lag-time effect of the “grey zone” of differentiation?. *Evolutionary Applications*. 614-630p.
- Balbar, A. C., & Metaxas, A. (2019). The current application of ecological connectivity in the design of marine protected areas. *Global Ecology and Conservation*, 17, e00569.
- Barnes, M. A., & Turner, C. R. (2016). The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*, 17(1), 1-17.
- Bass, AJ. (1978). Problems in studies of sharks in the Southwest Indian Ocean. In: Hodgson ES, Mathewson RF (eds) *Sensory biology of sharks, skates and rays*. Office of Naval Research, Department of the Navy, Arlington, VA, p 545–594.
- Baum, J., Clarke, S., Domingo, A., Ducrocq, M., Lamónaca, A.F., Gaibor, N., Graham, R., Jorgensen, S., Kotas, J.E., Medina, E., Martinez-Ortiz, J., Monzini Taccone di Sitizano, J., Morales, M.R., Navarro, S.S., Pérez-Jiménez, J.C., Ruiz, C., Smith, W., Valenti, S.V. & Vooren, (2019). *Sphyrna lewini*. The IUCN Red List of Threatened Species.
- Baum, J.K. & Myers, R.A. (2004). Shifting baselines and the decline of pelagic sharks in the Gulf of Mexico. *Ecology Letters* 7:135–45.
- Beaumont, M. A. (2005). Adaptation and speciation: what can F_{st} tell us?. *Trends in ecology & evolution*, 20(8), 435-440.
- Beaumont, M. A., & Balding, D. J. (2004). Identifying adaptive genetic divergence among populations from genome scans. *Molecular ecology*, 13(4), 969-980.
- Beger, M., Grantham, H. S., Pressey, R. L., Wilson, K. A., Peterson, E. L., Dorfman, D., ... & Possingham, H. P. (2010). Conservation planning for connectivity across marine, freshwater, and terrestrial realms. *Biological Conservation*, 143(3), 565-575.
- Begg, G., Friedland, K & J. Pearce. (1999). Stock identification and its role in stock assessment and fisheries management. An overview. *Fisheries Research*, 43 1-8.

- Bejarano-Álvarez, M., Galvan-Magana, F., & Ochoa-Baez, R. I. (2011). Reproductive biology of the scalloped hammerhead shark *Sphyrna lewini* (Chondrichthyes: Sphyrnidae) off south-west Mexico. *aqua: International Journal of Ichthyology*, 17(1), 11-23.
- Bernañ, G., Ripa, P. y J. Herguera. (2001). Variabilidad Oceanografica y climática en el bajo Golfo de California: Influencias del Trópico y Pacífico Norte. *Ciencias Marinas*. 27(4): 595-617.
- Bernard, A. M., Feldheim, K. A., Heithaus, M. R., Wintner, S. P., Wetherbee, B. M., & Shivji, M. S. (2016). Global population genetic dynamics of a highly migratory, apex predator shark. *Molecular Ecology*, 25(21), 5312-5329.
- Bessudo, S., Soler, G. A., Klimley, A. P., Ketchum, J. T., Hearn, A., & Arauz, R. (2011). Residency of the scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*) at Malpelo Island and evidence of migration to other islands in the Eastern Tropical Pacific. *Environmental Biology of Fishes*, 91(2), 165-176.
- Bonaccorso, E., Ordóñez-Garza, N., Pazmiño, D.A. (2021). International fisheries threaten globally endangered sharks in the Eastern Tropical Pacific Ocean: the case of the Fu Yuan Yu Leng 999 reefer vessel seized within the Galápagos Marine Reserve. *Sci Rep* 11, 14959 (2021).
- Bonfil, R. (1997). Status of shark resources in the Southern Gulf of México and Caribbean: Implications for management. *Fisheries Research (Amsterdam)* 29, 101-117 pp.
- 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(3), 161-173.
- Branstetter, S. (1991). Early life-history implications of selected carcharhinoid and lamnoid sharks of the Northwest Atlantic, p. 17-28. In: *Elasmobranchs as living resources: advanced in biology, Ecology, systematics, and the status of the fisheries* (H.L. Pratt Jr., S.H. Gruber, and Taniuchi, eds.). NOAA Tech. Rep. NMFS 90.
- Brattstrom, B.H. (1992). Biogeography of the Islas Revillagigedo, Mexico. *Journal of Biogeography* 17, 177-183.
- Briggs, J. C. (1974). Operation of zoogeographic barriers. *Systematic Biology*, 23(2), 248-256.
- Bush, A. & K, Holland. (2002). Food limitation in a nursery area: estimates of daily ration in juvenile scalloped hammerheads, *Sphyrna lewini* (Griffith and Smith, 1834) in

Kane'ohe Bay, O'ahu, Hawai. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 278:157-178.

Caballero, A. (1994). Review article: Developments in the prediction of effective population size. *Heredity* 73: 657-679.

Camhi, M. (1998). *Sharks and their relatives: ecology and conservation* (No. 20). IUCN.

Castillo-Olguín, E., Uribe-Alcocer, M., & Díaz-Jaimes, P. (2012). Assessment of the population genetic structure of *Sphyrna lewini* to identify conservation units in the Mexican Pacific. *Ciencias Marinas*, 38(4).

Catalano, G., Crobe, V., Ferrari, A., Baino, R., Massi, D., Titone, A., ... & Cariani, A. (2022). Strongly structured populations and reproductive habitat fragmentation increase the vulnerability of the Mediterranean starry ray *Raja asterias* (Elasmobranchii, Rajidae). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 32(1), 66-84.

Chao, A. (1987). Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. *Biometrics*, 783-791.

Chin, A., Kyne, P. M., Walker, T. I., & McAULEY, R. B. (2010). An integrated risk assessment for climate change: analysing the vulnerability of sharks and rays on Australia's Great Barrier Reef. *Global change biology*, 16(7), 1936-1953.

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(1), 201-211.

Coiraton, C., Amezcua, F., & Ketchum, J. T. (2020). New insights into the migration patterns of the scalloped hammerhead shark *Sphyrna lewini* based on vertebral microchemistry. *Marine Biology*, 167(5), 1-18.

CONAPESCA-INP. (2004). Plan de acción nacional para el manejo y conservación de tiburones, rayas y especies afines en México, 80 pp. Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca e Instituto Nacional de la Pesca, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Mazatlán.

Corrigan, S., Lowther, A. D., Beheregaray, L. B., Bruce, B. D., Cliff, G., Duffy, C. A., ... & Rogers, P. J. (2018). Population connectivity of the highly migratory shortfin mako (*Isurus oxyrinchus* Rafinesque 1810) and implications for management in the Southern Hemisphere. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 6, 187.

Daly-Engel, T. S., Seraphin, K. D., Holland, K. N., Coffey, J. P., Nance, H. A., Toonen, R. J., & Bowen, B. W. (2012). Global phylogeography with mixed-marker analysis

reveals male-mediated dispersal in the endangered scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*). *PLoS One*, 7(1), e29986.

Davey, J., Hohenlohe, P., Etter, P. et al. (2011). Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nat Rev Genet* 12, 499–510.

Dimens, P. (2016). Population structure of a migratory small coastal shark, the blacknose shark *Carcharhinus acronotus*, across cryptic barriers to gene flow. Master of Science Thesis, Texas A&M University-Corpus Christi.

DOF. 2007. NORMA Oficial Mexicana NOM-029-PESC-2006, Pesca responsable de tiburones y rayas. Especificaciones para su aprovechamiento. SEGOB.

DOF. 2014. NORMA Oficial Mexicana NOM-049-SAG/PESC-2014, Que determina el procedimiento para establecer zonas de refugio para los recursos pesqueros en aguas de jurisdicción federal de los Estados Unidos Mexicanos. SEGOB.

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

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

Dudgeon, C. L., Blower, D. C., Broderick, D., Giles, J. L., Holmes, B. J., Kashiwagi, T., ... & Ovenden, J. R. (2012). A review of the application of molecular genetics for fisheries management and conservation of sharks and rays. *Journal of fish biology*, 80(5), 1789-1843.

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

Duncan, K. M., Martin, A. P., Bowen, B. W., & De Couet, H. G. (2006b). Global phylogeography of the scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*). *Molecular ecology*, 15(8), 2239-2251.7

Earl, D. A., & VonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation genetics resources*, 4, 359-361.

- Elizondo-Sancho, M., Rodríguez-Arriatti, Y., Albertazzi, F. J., Bonilla-Salazar, A., Arauz-Naranjo, D., Arauz, R., ... & Hernández, S. (2022). Population structure and genetic connectivity of the scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*) across nursery grounds from the Eastern Tropical Pacific: Implications for management and conservation. *Plos one*, *17*(12), e0264879.
- Espinoza, M., Díaz, E., Angulo, A., Hernández, S., & Clarke, T. M. (2018). Chondrichthyan diversity, conservation status, and management challenges in Costa Rica. *Frontiers in Marine Science*, *5*, 85.
- Estupiñán-Montaña, C., Galván-Magaña, F., Elorriaga-Verplancken, F., Zetina-Rejón, M. J., Sánchez-González, A., Polo-Silva, C. J., ... & Delgado-Huertas, A. (2021). Ontogenetic feeding ecology of the scalloped hammerhead shark *Sphyrna lewini* in the Colombian Eastern Tropical Pacific. *Marine Ecology Progress Series*, *663*, 127-143.
- Estupiñán-Montaña, C., Tamburin, E., & Delgado-Huertas, A. (2021b). Stable isotope evidence for movements of hammerhead sharks *Sphyrna lewini*, connecting two natural protected areas in the Colombian Pacific. *Marine Biodiversity*, *51*(5), 1-8.
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*, *14*(8), 2611-2620.
- Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S. (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* *1*: 47-50.
- Falush, D. Stephens, M & J. Pritchard. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, Aug *164*(4): 1567-87
- Félix-López, D. G., Bolaño-Martínez, N., Díaz-Jaimes, P., Oñate-González, E. C., Ramírez-Pérez, J. S., García-Rodríguez, E., ... & Saavedra-Sotelo, N. C. (2019). Possible female philopatry of the smooth hammerhead shark *Sphyrna zygaena* revealed by genetic structure patterns. *Journal of Fish Biology*, *94*(4), 671-679.
- Ferretti, F., Myers, R. A., Serena, F., & Lotze, H. K. (2008). Loss of large predatory sharks from the Mediterranean Sea. *Conservation Biology*, *22*(4), 952-964.
- Fiedler, P. y L. Talley. (2006). Hydrography of the eastern tropical Pacific: A review. *Progress in Oceanography*, Volume *69*, Issue 2-4, 143-180.

- Field, I. C., Meekan, M. G., Buckworth, R. C., & Bradshaw, C. J. (2009). Susceptibility of sharks, rays and chimaeras to global extinction. *Advances in marine biology*, 56, 275-363.
- Flores-Cárdenas, F. (2011). Vulnerabilidad del Sistema Lagunar Santa María-La Reforma (Sinaloa) asociada a las dimensiones humanas y variabilidad climática: 1-66 (Doctoral dissertation, M. Sc. Thesis, Universidad Autónoma de Sinaloa, Mazatlán, Mexico).
- Foll, M., & Gaggiotti, O. (2008). A genome-scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: a Bayesian perspective. *Genetics*, 180(2), 977-993.
- Fondon, John W., III & Garner, Harold R. (2004). Molecular origins of rapid and continuous morphological evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (52): 18058
- Freeland, J. (2005). Molecular markers in ecology. *Molecular Ecology*'.(Ed. H. Kirk.) pp, 31-62.
- Freitas, R. H. A. D., Rosa, R. S., Wetherbee, B. M., & Gruber, S. H. (2009). Population size and survivorship for juvenile lemon sharks (*Negaprion brevirostris*) on their nursery grounds at a marine protected area in Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 7(2), 205-212.
- Furlong-Estrada, E., Galván-Magaña, F., & Tovar-Ávila, J. (2017). Use of the productivity and susceptibility analysis and a rapid management-risk assessment to evaluate the vulnerability of sharks caught off the west coast of Baja California Sur, Mexico. *Fisheries Research*, 194, 197-208.
- Furlong-Estrada, E., Tovar-Ávila, J., & Ríos-Jara, E. (2014). Evaluación de riesgo ecológico de la pesca artesanal para los tiburones capturados en la entrada del Golfo de California. *Hidrobiológica*, 24(2), 83-97.
- Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S., & Hurst, G. D. D. (2009). Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular ecology*, 18(22), 4541-4550.
- Gibson, G., & Muse, S. V. (2004). *Précis de génomique*. De Boeck Supérieur
- González, E. G. (2003). Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia*, 59(2-3), 377-388.
- Green, M. & Sambrook, J. (2012). *Molecular cloning. A laboratory manual*. (4th ed.) New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Green, M. E. (2019). *Testing expectations of connectivity and breeding biology among shark species in a tropical hot spot: the Indo-Pacific* (Doctoral dissertation, University of Tasmania).
- Green, M.E., Appleyard, S.A., White, W. (2017) Variability in multiple paternity rates for grey reef sharks (*Carcharhinus amblyrhynchos*) and scalloped hammerheads (*Sphyrna lewini*). *Sci Rep* 7, 1528.
- Green, M. E., Appleyard, S. A., White, W. T., Tracey, S. R., Heupel, M. R., & Ovenden, J. R. (2022). Updated connectivity assessment for the scalloped hammerhead (*Sphyrna lewini*) in Pacific and Indian Oceans using a multi-marker genetic approach. *Fisheries Research*, 251, 106305.
- Grigg, W. & R. Hey. (1992). Paleooceanography of the Tropical Eastern Pacific Ocean. *Science* (New York, N.Y.). 255. 172-8. 10.1126/science.255.5041.172.
- Grover, A., & Sharma, P. C. (2016). Development and use of molecular markers: past and present. *Critical reviews in biotechnology*, 36(2), 290-302.
- Guzmán, H. M., Beaver, C. E., & Díaz-Ferguson, E. (2021). Novel Insights Into the Genetic Population Connectivity of Transient Whale Sharks (*Rhincodon typus*) in Pacific Panama Provide Crucial Data for Conservation Efforts. *Frontiers in Marine Science*, 8, 744109.
- Guzmán, H. M., & Cortés, J. (1993). Arrecifes coralinos del Pacífico oriental tropical: revisión y perspectivas. *Revista de Biología Tropical*, 535-557.
- Hadi, S., Andayani, N., Muttaqin, E., Simeon, B. M., Ichsan, M., Subhan, B., & Madduppa, H. (2020). Genetic connectivity of the scalloped hammerhead shark *Sphyrna lewini* across Indonesia and the Western Indian Ocean. *PloS one*, 15(10), e0230763.
- Hammerschlag, N., Gutowsky, L. F., Rider, M. J., Roemer, R., & Gallagher, A. J. (2022). Urban sharks: Residency patterns of marine top predators in relation to a coastal metropolis. *Marine Ecology Progress Series*, 691, 1-17.
- Hancock, J. (1999). Microsatellites and other simple sequence: genomic context and mutational mechanisms. En: Goldstein D., Schlotterer C. (eds.). *Microsatellites evolution and applications*, Oxford University Press, New York, pp. 1-10.
- Hare, M. P., Nunney, L., Schwartz, M. K., Ruzzante, D. E., Burford, M., Waples, R. S., ... & Palstra, F. (2011). Understanding and estimating effective population size for practical application in marine species management. *Conservation Biology*, 25(3), 438-449.

- Harrison, R. G., & Larson, E. L. (2014). Hybridization, introgression, and the nature of species boundaries. *Journal of Heredity*, 105(S1), 795-809.
- Hastings, P. A. (2000). Biogeography of the tropical eastern Pacific: distribution and phylogeny of chaenopsid fishes. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 128(3), 319-335.
- Hearn, A., Ketchum, J., Klimley, A. P., Espinoza, E., & Penaherrera, C. (2010). Hotspots within hotspots? hammerhead shark movements around wolf island, galapagos marine reserve. *Marine Biology*, 157, 1899-1915.
- Heupel, M. R., & Simpfendorfer, C. A. (2008). Movement and distribution of young bull sharks *Carcharhinus leucas* in a variable estuarine environment. *Aquatic Biology*, 1(3), 277-289.
- Heupel, M. R., Carlson, J. K., & Simpfendorfer, C. A. (2007). Shark nursery areas: concepts, definition, characterization and assumptions. *Marine ecology progress series*, 337, 287-297.
- Hilborn, R., Quinn, T., Schindler, D. & D. Rogers. (2003). Biocomplexity and fisheries sustainability. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 100, 6564-6568.
- Holland, K. N., Wetherbee, B. M., Lowe, C. G., & Meyer, C. G. (1999). Movements of tiger sharks (*Galeocerdo cuvier*) in coastal Hawaiian waters. *Marine Biology*, 134(4), 665-673.
- Holmes BJ, Pepperell JP, Griffiths SP, Jaine FRA, Tibbetts IR, Bennett MB. (2014) Tiger shark (*Galeocerdo cuvier*) movement patterns and habitat
- Holsinger, K. E., & Weir, B. S. (2009). Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting FST. *Nature Reviews Genetics*, 10(9), 639-650.
- Holsinger, Kent E & Bruce S. Weir .(2009). Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting FST. *Nat Rev Genet*. 10 (9): 639–650.
- Hoyos-Padilla E.M., Ketchum J.T., Klimley A.P., & Galvan-Magana, F. (2014). Ontogenetic migration of a female scalloped hammerhead shark *Sphyrna lewini* in the Gulf of California. *Animal Biotelemetry* 2 (1): 17.
- Hueter, R.E. 1994. Bycatch and catch-release mortality of small sharks in the gulf coast nursery grounds of Tampa Bay and Charlotte Harbor. Final report. NOAA/NMFS/MARFIN Project NA17FF0378-01. 183 pp.

- Hull, K. L., Asbury, T. A., da Silva, C., Dicken, M., Veríssimo, A., Farrell, E. D., ... & Bester-van der Merwe, A. E. (2019). Strong genetic isolation despite wide distribution in a commercially exploited coastal shark. *Hydrobiologia*, 838(1), 121-137.
- J.W. Davey, P.A. Hohenlohe, P.D. Etter, J.Q. Boone, J.M. Catchen, M.L. Blaxter (2011) Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing, *Nat. Rev. Genet.* 499–510
- Jaccoud, D., Peng, K., Feinstein, D., & Kilian, A. (2001). Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic acids research*, 29(4), e25-e25.
- Jakobsson, M., & Rosenberg, N. A. (2007). CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23(14), 1801-1806.
- Jolly, G. M. (1965). Explicit estimates from capture-recapture data with both death and immigration-stochastic model. *Biometrika*, 52(1/2), 225-247.
- Jombart, Thibaut & Devillard, Sébastien & Balloux, Francois. (2010). Discriminant analysis of principal components: A new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC genetics*. 11. 94. 10.1186/1471-2156-11-94.
- Jorgensen, S.J., P. Klimley & A.F. Muhlia-Melo. (2009). Scalloped hammerhead shark *Sphynra lewini*, utilizes deep-water, hypoxic zone in the Gulf of California. *Journal of Fish Biology*. 74, 1682-1687.
- Jorgensen, Salvador & Reeb, Carol & Chapple, Taylor & Anderson, Scot & Perle, Christopher & van sommeran, Sean & Fritz-Cope, Callaghan & Brown, Adam & Klimley, A. & Block, Barbara. (2009b). Philopatry and migration of Pacific white sharks. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*. 277. 679-88. 10.1098/rspb.2009.1155.
- Karl, S. A., Castro, A. L. F., Lopez, J. A., Charvet, P., & Burgess, G. H. (2011). Phylogeography and conservation of the bull shark (*Carcharhinus leucas*) inferred from mitochondrial and microsatellite DNA. *Conservation Genetics*, 12(2), 371-382.
- Katona S., Baxter B., Brazier O., Kraus S., Perkins J., Whitehead H. (1979) Identification of Humpback Whales by Fluke Photographs. In: Winn H.E., Olla B.L. (eds) *Behavior of Marine Animals*. Springer, Boston, MA
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., Drummond, A. (2012). *Genetic Basic: an integrated and extendable desktop*

software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.

Kelly, R. P., Port, J. A., Yamahara, K. M., & Crowder, L. B. (2014). Using environmental DNA to census marine fishes in a large mesocosm. *PloS one*, 9(1), e86175.

ISO 690

Ketchum, J. T., Hearn, A., Klimley, A. P., Peñaherrera, C., Espinoza, E., Bessudo, S., ... & Arauz, R. (2014). Inter-island movements of scalloped hammerhead sharks (*Sphyrna lewini*) and seasonal connectivity in a marine protected area of the eastern tropical Pacific. *Marine Biology*, 161(4), 939-951.

Ketchum, J. T., Hearn, A., Klimley, A. P., Espinoza, E., Peñaherrera, C., & Largier, J. L. (2014b). Seasonal changes in movements and habitat preferences of the scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*) while refuging near an oceanic island. *Marine Biology*, 161, 755-767.

Khlestkina, E. K., & Salina, E. A. (2006). SNP markers: methods of analysis, ways of development, and comparison on an example of common wheat. *Russian Journal of Genetics*, 42(6), 585-594.

Kilian, A., Wenzl, P., Huttner, E., Carling, J., Xia, L., Blois, H., ... & Uszynski, G. (2012). Diversity arrays technology: a generic genome profiling technology on open platforms. In *Data production and analysis in population genomics* (pp. 67-89). Humana Press, Totowa, NJ.

Klimley, A. P. (1987). The determinants of sexual segregation in the scalloped hammerhead shark, *Sphyrna lewini*. *Environmental Biology of Fishes*, 18(1), 27-40.

Klimley, A. P. (1993). Highly directional swimming by scalloped hammerhead sharks, *Sphyrna lewini*, and subsurface irradiance, temperature, bathymetry, and geomagnetic field. *Marine Biology*, 117(1), 1-22.

Klimley, A. P., & Butler, S. B. (1988). Immigration and emigration of a pelagic fish assemblage to seamounts in the Gulf of California related to water mass movements using satellite imagery. *Marine ecology progress series. Oldendorf*, 49(1), 11-20.

Klimley, A. P., Richert, J. E., & Jorgensen, S. J. (2005). The home of blue water fish: Rather than singly inhabiting the trackless ocean, pelagic fish species travel together in groups, which migrate between hidden, productive oases. *American Scientist*, 93(1), 42-49.

- Kohler, N. E., & Turner, P. A. (2001). Shark tagging: a review of conventional methods and studies. In *The behavior and sensory biology of elasmobranch fishes: an anthology in memory of Donald Richard Nelson* (pp. 191-224). Springer, Dordrecht.
- Kraemer, P., & Gerlach, G. (2017). Demerelate: calculating interindividual relatedness for kinship analysis based on codominant diploid genetic markers using R. *Molecular Ecology Resources*, 17(6), 1371-1377.
- Krosby, M., Tewksbury, J., Haddad, N. M., & Hoekstra, J. (2010). Ecological connectivity for a changing climate. *Conservation Biology*, 24(6), 1686-1689.
- Lankford R.R. 1977. Coastal lagoons of Mexico, their origin and classification. *Estuarine processes* 2:182-215.
- Lara-Lizardi, F., Hoyos-Padilla, M., Hearn, A., Klimley, A. P., Galván-Magaña, F., Arauz, R., ... & Ketchum, J. T. (2020). Shark movements in the Revillagigedo Archipelago and connectivity with the Eastern Tropical Pacific. bioRxiv.
- Lavín, M. F., & Marinone, S. G. (2003). An overview of the physical oceanography of the Gulf of California. *Nonlinear processes in geophysical fluid dynamics*, 173-204.
- Lavín, M. F., Fiedler, P. C., Amador, J. A., Ballance, L. T., Färber-Lorda, J., & Mestas-Núñez, A. M. (2006). A review of eastern tropical Pacific oceanography: Summary. *Progress in Oceanography*, 69(2-4), 391-398.
- LLuch Cota, S., Pa´res-Sierra, A. Magaña Rueda, V y F. Arreguín-Sanchez. (2010). Changing climate in the Gulf of California. *Progress in Oceanography* 87, 114-126, Editorial ELSEVIER.
- Lopez J., Hernandez, N. & E. Herrera. (2012). Efectos de la pesca de arrastre del camarón en el Golfo de California. CIBNOR Unidad Sonora, 15-25.
- Lotterhos, K. E., & Whitlock, M. C. (2014). Evaluation of demographic history and neutral parameterization on the performance of FST outlier tests. *Molecular ecology*, 23(9), 2178-2192.
- Lowe, W. H., & Allendorf, F. W. (2010). What can genetics tell us about population connectivity?. *Molecular ecology*, 19(15), 3038-3051.
- Lowe, W. H., & Allendorf, F. W. (2010). What can genetics tell us about population connectivity?. *Molecular ecology*, 19(15), 3038-3051.
- Maguire, J. (2006). The state of world highly migratory, straddling and other high seas fishery resources and associated species (No. 495). Food & Agriculture Org.

- Martínez-Candelas, I. A., Pérez-Jiménez, J. C., Espinoza-Tenorio, A., McClenachan, L., & Méndez-Loeza, I. (2020). Use of historical data to assess changes in the vulnerability of sharks. *Fisheries Research*, 226, 105526.
- Meirmans, P. G., & Hedrick, P. W. (2011). Assessing population structure: FST and related measures. *Molecular ecology resources*, 11(1), 5-18.
- Mijangos, J. L., Gruber, B., Berry, O., Pacioni, C., & Georges, A. (2022). dartR v2: An accessible genetic analysis platform for conservation, ecology and agriculture. *Methods in Ecology and Evolution*, 13(10), 2150-2158.
- Momigliano, P., Harcourt, R., Robbins, W. D., Jaiteh, V., Mahardika, G. N., Sembiring, A., & Stow, A. (2017). Genetic structure and signatures of selection in grey reef sharks (*Carcharhinus amblyrhynchos*). *Heredity*, 119(3), 142-153.
- Morin, P. A., Luikart, G., & Wayne, R. K. (2004). SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in ecology & evolution*, 19(4), 208-216.
- Morin, P. A., Martien, K. K., & Taylor, B. L. (2009). Assessing statistical power of SNPs for population structure and conservation studies. *Molecular Ecology Resources*, 9(1), 66-73.
- Myers, R. A., Baum, J. K., Shepherd, T. D., Powers, S. P., & Peterson, C. H. (2007). Cascading effects of the loss of apex predatory sharks from a coastal ocean. *Science*, 315(5820), 1846-1850.
- Nalesso, E., Hearn, A., Sosa-Nishizaki, O., Steiner, T., Antoniou, A., Reid, A., ... & Arauz, R. (2019). Movements of scalloped hammerhead sharks (*Sphyrna lewini*) at Cocos Island, Costa Rica and between oceanic islands in the Eastern Tropical Pacific. *PLoS one*, 14(3), e0213741.
- Nance, H. A., Klimley, P., Galván-Magaña, F., Martínez-Ortíz, J., & Marko, P. B. (2011). Demographic processes underlying subtle patterns of population structure in the scalloped hammerhead shark, *Sphyrna lewini*. *Plos One*, 6(7), e21459
- Narum, S. R., & Hess, J. E. (2011). Comparison of FST outlier tests for SNP loci under selection. *Molecular ecology resources*, 11, 184-194.
- Nasby-Lucas, N., & Domeier, M. L. (2012). Use of photo identification to describe a white shark aggregation at Guadalupe Island, Mexico. *Global Perspectives on the Biology and Life History of the White Shark*. (Ed. ML Domeier.) pp, 381-392.
- Nixon, A. N. (2020). *A Shark Conservationists Toolbox: Current DNA Methods and Techniques Aiding in the Conservation of Sharks*. NSU Works.

- NOM-029-PESC-2006, Pesca responsable de tiburones y rayas, especificaciones para su aprovechamiento. Diario Oficial de la Federación, Primera Sección, 14
- Oliver, S., Braccini, M., Newman, S. J., & Harvey, E. S. (2015). Global patterns in the bycatch of sharks and rays. *Marine Policy*, 54, 86-97.
- Oppen, M. J. V., Rico, C., Turner, G. F., & Hewitt, G. M. (2000). Extensive homoplasy, nonstepwise mutations, and shared ancestral polymorphism at a complex microsatellite locus in Lake Malawi cichlids. *Molecular Biology and Evolution*, 17(4), 489-498.
- Ovenden, J. R. (2013). Crinkles in connectivity: combining genetics and other types of biological data to estimate movement and interbreeding between populations. *Marine and Freshwater Research*, 64(3), 201-207.
- Papastamatiou YP, Meyer CG, Carvalho F, Dale JJ, Hutchinson MR, Holland KN. (2013). Telemetry and random walk models reveal complex patterns of partial migration in a large marine predator. *Ecol. Soc. Am.* 94, 2595–2606.
- Pauly, D., Alder, J., Bennett, E., Christensen, V., Tyedmers, P., & Watson, R. 2003. The future for fisheries. *Science*, 302(5649), 1359-1361.
- Pérez-Jimenez J.C. (2014). Historical records reveal potential extirpation of four hammerhead sharks (*Sphyrna* spp.) in Mexican Pacific waters. *Fish Biol Fisheries*. DOI 10.1007/s11160-014-9353.
- Peterson BK, Weber JN, Kay EH, Fisher HS, Hoekstra HE . (2012). Double Digest RADseq: An Inexpensive Method for De Novo SNP Discovery and Genotyping in Model and Non-Model Species. *PLoS ONE* 7(5): e37135.
- Pew, J., Muir, P. H., Wang, J., & Frasier, T. R. (2015). related: an R package for analysing pairwise relatedness from codominant molecular markers. *Molecular ecology resources*, 15(3), 557-561.
- Pirog, A., Ravigné, V., Fontaine, M. C., Rieux, A., Gilabert, A., Cliff, G., ... & Magalon, H. (2019). Population structure, connectivity, and demographic history of an apex marine predator, the bull shark *Carcharhinus leucas*. *Ecology and evolution*, 9(23), 12980-13000.
- Posada, D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256.
- Pradel, R. (1996). Utilization of Capture-Mark-Recapture for the study of recruitment and population growth rate. *Biometrics* 52, 703-709.

- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.
- Prus, K. (2013). Behavior and conservation of scalloped hammerheads (*Sphyrna lewini*) in the Eastern Tropical Pacific. Natural Sciences. Paper, 1.
- Puechmaille, S. J. (2016). The program structure does not reliably recover the correct population structure when sampling is uneven: subsampling and new estimators alleviate the problem. *Molecular ecology resources*, 16(3), 608-627.
- Pujolar, J. M., Schiavina, M., Di Franco, A., Melià, P., Guidetti, P., Gatto, M., ... & Zane, L. (2013). Understanding the effectiveness of marine protected areas using genetic connectivity patterns and Lagrangian simulations. *Diversity and Distributions*, 19(12), 1531-1542.
- Quattro, J. M., Stoner, D. S., Driggers, W. B., Anderson, C. A., Priede, K. A., Hoppmann, E. C., ... & Grady, J. M. (2006). Genetic evidence of cryptic speciation within hammerhead sharks (Genus *Sphyrna*). *Marine Biology*, 148(5), 1143-1155.
- Quintanilla, S., Gómez A., Mariño, C., Sorzano, C., Bessudo, S., Soler, G., Bernal J., Caballero, S. (2015). Conservation Genetics of the Scalloped Hammerhead Shark in the Pacific Coast of Colombia, *Journal of Heredity*, Volume 106, Issue S1, Pages 448–458.
- Ramírez-Macías, D., Vázquez-Haikin, A., & Vázquez-Juárez, R. (2012). Whale shark *Rhincodon typus* populations along the west coast of the Gulf of California and implications for management. *Endangered Species Research*, 18(2), 115-128.
- Ramírez-Macías, D., Vázquez-Juárez, R., Galván-Magaña, F., & Munguía-Vega, A. (2007). Variations of the mitochondrial control region sequence in whale sharks (*Rhincodon typus*) from the Gulf of California, Mexico. *Fisheries Research*, 84(1), 87-95.
- Rangel-Morales, J. M., Rosales-López, L. P., Díaz-Jaimes, P., Amezcua-Martínez, F., Ketchum, J. T., Hoyos-Padilla, M., & Corgos, A. (2022). Regional philopatry of scalloped hammerhead sharks (*Sphyrna lewini*) to nursery areas in the Mexican Pacific. *Hydrobiologia*, 1-17.
- Rice, W. R. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223-225.
- Rigby, C.L., Dulvy, N.K., Barreto, R., Carlson, J., Fernando, D., Fordham, S., Francis, M.P., Herman, K., Jabado, R.W., Liu, K.M., Marshall, A., Pacoureaux, N., Romanov, E., Sherley, R.B. & Winker, H. 2019. *Sphyrna lewini*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2019: e.T39385A2918526. Accessed on 28 March 2023.

- Rodriguez Arana, J. (2017). Movimientos, conectividad genética y tamaño poblacional del tiburón martillo *Sphyrna lewini* en sus áreas de crianza al sur del Golfo de California. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. La Paz, BCS.
- Rodríguez-Valencia, J. A. (2007). La conectividad demográfica y el diseño de redes de áreas de conservación en el Golfo de California. WWF.
- Rosa, R., Baptista, M., Lopes, V. M., Pegado, M. R., Ricardo Paula, J., Trübenbach, K., ... & Repolho, T. (2014). Early-life exposure to climate change impairs tropical shark survival. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1793), 20141738.
- Rosende-Pereiro, A., & Corgos, A. (2018). Pilot acoustic tracking study on young of the year scalloped hammerhead sharks, *Sphyrna lewini*, within a coastal nursery area in Jalisco, Mexico. *Latin american journal of aquatic research*, 46(4), 645-659.
- Rowe, G., Sweet, M., & Beebee, T. (2017). An introduction to molecular ecology. Oxford University Press.
- Sala, E., Aburto-Oropeza, O., Reza, M., Paredes, G., & López-Lemus, L. G. (2004). Fishing down coastal food webs in the Gulf of California. *Fisheries*, 29(3), 19-25.
- Salinas-de-León, P., Hoyos-Padilla, E. M., & Pochet, F. (2017). First observation on the mating behaviour of the endangered scalloped hammerhead shark *Sphyrna lewini* in the Tropical Eastern Pacific. *Environmental Biology of Fishes*, 100(12), 1603-1608.
- Salomón-Aguilar, C. A., Villavicencio-Garayzar, C. J., & Reyes-Bonilla, H. (2009). Shark breeding grounds and seasons in the Gulf of California: fishery management and conservation strategy. *Ciencias Marinas*, 35(4).
- Salzburger, W., Ewing, G. B. & Haeseler, A. (2011). The performance of phylogenetic algorithms in estimating haplotype genealogies with migration. *Molecular Ecology* 20: 1952-1963.
- Smith, W. D., Bizzarro, J. J., & Cailliet, G. M. (2009). La pesca artesanal de elasmobranquios en la costa oriental de Baja California, México: Características y consideraciones de manejo. *Ciencias Marinas*, 35(2), 209-236.
- Spalding, M., Helen E. Fox, Gerald R. Allen, Nick Davidson. (2007). Marine Ecoregions of the World: A Bioregionalization of Coastal and Shelf Areas .BioscienceVol. 57 No. 7 pp. 573–583.

- Speed C.W., I.C. Field, Meekan, M.J. & Bradshaw, C.J.A. (2010). Complexities of coastal shark movements and their implications for management. *Marine Ecology Progress Series* 408: 275–293.
- Speed, C. W., Meekan, M. G., Field, I. C., McMahon, C. R., Harcourt, R. G., Stevens, J. D., ... & Bradshaw, C. J. A. (2016). Reef shark movements relative to a coastal marine protected area. *Regional Studies in Marine Science*, 3, 58-66.
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312-1313.
- Stevens, J. D., & Lyle, J. M. (1989). Biology of three hammerhead sharks (*Eusphyra blochii*, *Sphyrna mokarran* and *S. lewini*) from northern Australia. *Marine and Freshwater Research*, 40(2), 129-146.
- Thomas R., B. & D Holland, J. & M., Edward. (2012). Wildlife tracking technology options and cost considerations. *Wildlife Research*. 38. 653-663. 10.1071/WR10211.
- Tom L. Jenkins, Jamie R. Stevens. (2018). Assessing connectivity between MPAs: Selecting taxa and translating genetic data to inform policy, *Marine Policy*, Volume 94, Pages 165-173, ISSN 0308-597X.
- Torres-Huerta A.M., Villavicencio-Garayzar C., and Corro-Espinoza, D. (2008). Reproductive biology of the scalloped hammerhead shark *Sphyrna lewini* Griffith & Smith (Sphyrnidae) in the Gulf of California. *Hidrobiologica* 18:227–238.
- Trejo Ramírez, A. 2017. Caracterización de la bahía de la paz, baja california sur, México, como una posible área de crianza del tiburón bironche, *Rhizoprionodon longurio* (Jordan & Gilbert, 1882). Tesis de Maestría, CICIMAR-IPN.
- Vazques, A. (2018). Estructura genética mediante SNPS en bancos de almeja generosa (*Panopea globosa*; Dall 1898) del Alto Golfo de California. Tesis de maestría. CIBNOR, La Paz. BCS.
- Vignal, A., Milan, D., SanCristobal, M., & Eggen, A. (2002). A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution*, 34(3), 275-305.
- Wang, X. T. (2002). KITH-AND-KIN RATIONALITY IN RISKY CHOICES THEORETICAL MODELLING AND. *Risky Transactions: Trust, Kinship and Ethnicity*.
- Waples R. (2010). Spatial-temporal stratifications in natural populations and how they affect understanding and estimation of effective population size. *Molecular Ecology Resources*, 10, 785–796.

- White, W. T., Bartron, C., & Potter, I. C. (2008). Catch composition and reproductive biology of *Sphyrna lewini* (Griffith & Smith)(Carcharhiniformes, Sphyrnidae) in Indonesian waters. *Journal of Fish Biology*, 72(7), 1675-1689.
- Whitney NM, Crow GL. (2007) Reproductive biology of the tiger shark (*Galeocerdo cuvier*) in Hawaii. *Mar. Biol.* 151, 63–70.
- Wright, S. (1931). Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, 16(2), 97.
- Wyrcki, K. (1965). Surface currents of the eastern tropical Pacific Ocean. IATTC Report.
- Zanella, I., López-Garro, A., & Cure, K. (2019). Golfo Dulce: critical habitat and nursery9 area for juvenile scalloped hammerhead sharks *Sphyrna lewini* in the Eastern Tropical Pacific Seascape. *Environmental biology of fishes*, 102(10), 1291-1300.