

Variabilidad mitocondrial del dorado *Coryphaena hippurus* en poblaciones del Pacífico

Mitochondrial variability of dolphinfish *Coryphaena hippurus* populations in the Pacific Ocean

A Rocha-Olivares^{1*}, M Bobadilla-Jiménez¹, S Ortega-García², N Saavedra-Sotelo¹, JR Sandoval-Castillo¹

¹ Laboratorio de Ecología Molecular, Departamento de Oceanografía Biológica, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Km 107 Carretera Tijuana-Ensenada, Ensenada, CP 22860, Baja California, México. * E-mail: arocha@cicese.mx

² Departamento de Pesquerías, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR-IPN), Playa El Conchalito s/n, La Paz, CP 23000, Baja California Sur, México.

Resumen

Los patrones de estructura genética en las poblaciones marinas están asociados a una variedad de mecanismos de dispersión y de escalas espaciales. Las especies pelágicas migratorias, como el dorado *Coryphaena hippurus*, reafirman la noción de un medio ambiente marino abierto y continuo. Muchos estudios han mostrado que las especies pelágicas oceánicas tienden a ser homogéneas genéticamente a grandes escalas geográficas, sólo existiendo diferenciación entre sus límites de distribución o entre cuencas oceánicas. En este trabajo presentamos resultados que indican heterogeneidad genética del dorado a escalas geográficas menores a las predichas por las generalizaciones anteriores. Patrones de restricción (RFLPs) del gen mitocondrial NADH1 produjeron niveles de estructura genética altamente significativos ($\Phi_{ST} = 0.029$, $P = 0.004$, AMOVA) entre peces de Baja California Sur (BCS), Sinaloa y Hawai, consistentes con frecuencias haplotípicas heterogéneas ($P = 0.014$, prueba exacta de diferenciación genética) y con una menor diversidad molecular en los peces muestreados en BCS.

Palabras clave: dorado, NADH1, ADN mitocondrial, estructura genética, RFLPs.

Abstract

Patterns of genetic structure among marine populations involve a variety of dispersal mechanisms and spatial scales. Pelagic species, such as the dolphinfish *Coryphaena hippurus*, epitomize the open and continuous nature of the marine environment due to their extensive migrations. Many studies have revealed that oceanic pelagic species tend to be genetically homogeneous over local and often extended geographic scales and only show levels of differentiation among extreme localities or ocean basins. Here we present genetic data suggesting genetic heterogeneity in the dolphinfish at geographic scales much smaller than those predicted by those generalizations. Mitochondrial NADH1 gene RFLPs revealed a highly significant ($\Phi_{ST} = 0.029$, $P = 0.004$, AMOVA) molecular genetic structure among fish from Baja California Sur (BCS), Sinaloa and Hawaii, consistent with heterogeneous haplotype frequencies ($P = 0.014$, exact test of genetic differentiation) and a depressed molecular diversity in fish sampled off BCS.

Key words: dolphinfish, NADH1, mitochondrial DNA, genetic structure, RFLPs.

Introducción

La diversidad de hábitats ocupados por las poblaciones de peces marinos se extiende desde aguas costeras intermareales hasta los giros oceánicos oligotróficos. Como consecuencia, no existe un paradigma general que explique los patrones de conectividad entre poblaciones alopátricas (Smith y Fujio 1982). La genética poblacional ha sido una forma indirecta pero poderosa de estudiar la conectividad marina, particularmente en la evaluación de influencias históricas (Dawson *et al.* 2001) y en el descubrimiento de barreras crípticas a la dispersión y libre entrecruzamiento (Sandoval-Castillo *et al.* 2004). Se han hecho esfuerzos considerables para entender los procesos pasivos, activos e históricos que determinan la dispersión y retención de algunas especies relativamente sedentarias como los peces demersales (Buonaccorsi *et al.* 2002) y arrecifales

Introduction

The diverse habitats occupied by marine fishes extend from coastal intertidal to oligotrophic waters of central oceanic gyres. Consequently, there is no general paradigm explaining connectivity patterns among allopatric populations (Smith and Fujio 1982). Population genetics has been an indirect yet powerful approach in the study of marine connectivity, particularly in assessing the influence of historical factors (Dawson *et al.* 2001) and in uncovering cryptic barriers to dispersal and free interbreeding (Sandoval-Castillo *et al.* 2004). Considerable efforts have been devoted to understand passive, active and historical processes involved in the dispersal and retention of some species, such as demersal (Buonaccorsi *et al.* 2002) and coral reef (Taylor and Hellberg 2003) fishes. These processes are fundamental in the design and implementation of marine

(Taylor y Hellberg 2003). Dichos procesos son de suma importancia en el diseño e implementación de reservas marinas para la protección de poblaciones amenazadas por la sobreexplotación y la degradación de hábitat (Palumbi 2003). Una perspectiva muy diferente emerge de los patrones de diferenciación genética de especies pelágicas altamente migratorias y con amplias distribuciones geográficas (Graves 1996). Aunque las fuerzas fundamentales que determinan su arquitectura genética no son diferentes de sus contrapartes sésiles, los peces migratorios y ampliamente distribuidos comparten características biológicas que pueden limitar la diferenciación genética entre localidades distantes tales como: (1) grandes grupos de organismos desovantes, lo que puede limitar los efectos de la deriva génica; (2) ausencia de barreras para la migración, que permite algunas veces movimientos transoceánicos e inclusive interoceánicos; y (3) capacidad intrínseca de dispersión a grandes distancias, permitiendo altos niveles de flujo genético por transporte pasivo (en etapas tempranas de vida) pero principalmente por migración activa de adultos a grandes distancias (Jorgensen *et al.* 2005). Sin embargo, estas expectativas a veces se encuentran con datos contradictorios que ponen en duda su aplicabilidad universal e implican la existencia de factores especie-específicos o regionales que limitan la conectividad y el flujo genético en especies pelágicas y que ocasionan la formación de una estructura genética poblacional (Graves 1996).

El dorado *Coryphaena hippurus* L. es un pez pelágico de distribución tropical y subtropical de gran importancia tanto para la pesca comercial como para la deportiva (Oxenford 1999). Los dorados son peces de rápido crecimiento (Massutí *et al.* 1999) y voraces depredadores visuales diurnos que se alimentan de otros teleosteos y cefalópodos (Oxenford y Hunte 1999). Están muy bien adaptados morfo-fisiológicamente para maniobrar y nadar rápidamente (Brill 1996). Su resistencia y agresividad la hacen una especie muy atractiva en la pesca deportiva (Harper *et al.* 2000). El dorado es también una especie valorada para consumo humano, por lo que se ha desarrollado tecnología de acuicultura para su producción en cautiverio (Lee y Ostrowski 2001). El hábitat del dorado son las aguas epipelágicas tropicales y subtropicales en donde tienden agregarse alrededor de objetos flotantes. Dicho comportamiento ha sido aprovechado en pesquerías comerciales en las que se utilizan artefactos flotantes para la agregación de peces (Deudero *et al.* 1999).

La abundancia y reproducción estacional de *C. hippurus* ha sido asociada a su conducta migratoria en diversas regiones del mundo, como en el Pacífico central (Hawái) (Kraul 1999), el Pacífico oriental (Lasso y Zapata 1999), el Atlántico occidental y el Caribe (Arocha *et al.* 1999, Rivera y Appeldoorn 2000), y el Mediterráneo (Massutí y Morales-Nin 1995). Estudios de marcado y recaptura realizados en Australia han mostrado el gran potencial de dispersión del dorado de hasta 440 km a una velocidad estimada de 20 km día⁻¹. Sin embargo, dichos estudios han mostrado también que la especie exhibe rangos hogareños limitados, ya que la mayoría de los individuos

reserves and for the protection of populations threatened by overexploitation or habitat degradation (Palumbi 2003). A very different perspective emerges from the patterns of genetic differentiation of widely distributed and highly migratory pelagic species (Graves 1996). Even though the fundamental forces shaping their genetic architecture are no different from those of their more sessile counterparts, migratory and widely distributed fish share biological attributes that may prevent genetic differentiation among distant localities, such as: (1) large spawning aggregations, which may limit the effects of random genetic drift; (2) absence of apparent barriers to migration, which manifest in trans- and sometimes inter-oceanic movements; and (3) an intrinsic ability for large-scale dispersal, allowing high levels of gene flow through passive transport (during early life history stages) but mainly through large-scale active adult migrations (Jorgensen *et al.* 2005). These expectations, however, are sometimes met with contradictory data casting doubts on their universal applicability and implying the existence of species-specific or regional factors that limit connectivity and gene flow and promote genetic structure in pelagic species (Graves 1996).

The dolphinfish *Coryphaena hippurus* L. is a tropical and subtropical pelagic species of great importance to commercial and sport fisheries (Oxenford 1999). These fast-growing (Massutí *et al.* 1999) and voracious visual predators feed on other teleosts and cephalopods during the day (Oxenford and Hunte 1999). Their morphology and physiology are highly adapted for fast swimming and maneuverability (Brill 1996), and its aggressive tackle makes it valuable in sport fishing (Harper *et al.* 2000). Dolphinfish is also valued for human consumption and there have been efforts to develop aquaculture technology to raise it in captivity (Lee and Ostrowski 2001). Its habitat consists of tropical and subtropical epipelagic waters where they tend to aggregate around floating objects. This behavior has been exploited in commercial fisheries, using artificial fish aggregating devices to attract them (Deudero *et al.* 1999).

The seasonal abundance and reproduction of *C. hippurus* has been associated with its migratory behavior in many regions of the world, such as in the central Pacific (Hawái) (Kraul 1999), the eastern Pacific (Lasso and Zapata 1999), the western Atlantic and Caribbean (Arocha *et al.* 1999, Rivera and Appeldoorn 2000), and the Mediterranean (Massutí and Morales-Nin 1995). Mark and recapture studies in Australia have shown the large potential for long-range dispersal of dolphinfishes, up to 440 km at estimated speeds of 20 km per day; however, they have also shown that most fishes exhibit limited home ranges, since most of the marked individuals were caught around the same drifting object where they were originally tagged (Kingsford and Defries 1999). Moreover, even though females are capable of prolific spawning all year long in captivity, the seasonal abundance and partial spawning of populations in the Pacific Ocean (e.g., García-Melgar 1995) suggest that either spawning is more temporally and spatially constrained or that their larvae are subject to discrete periods of

fueron recapturados alrededor de los mismos objetos flotantes donde fueron originalmente marcados (Kingsford y Defries 1999). Además, si bien las hembras en cautiverio son capaces de desovar prolíficamente a lo largo del año, la abundancia estacional y desoves parciales documentados en el Pacífico oriental (e.g., García-Melgar 1995) sugieren que las frezas en vida libre están más limitadas temporal y espacialmente, o bien que las larvas están sujetas a periodos discretos de mayor supervivencia, de tal suerte que la abundancia estacional puede depender tanto de las tasas de supervivencia de cada cohorte como de los cambios en el régimen de temperatura superficial (Kraul 1999).

Tanto los rangos hogareños restringidos como los pulsos demográficos temporal y espacialmente localizados pueden favorecer la existencia de una estructura poblacional en stocks diferenciados y de heterogeneidad genética, lo cual ha sido sugerido por diferencias en la dinámica poblacional de la especie en aguas mexicanas (Beltrán-Pimienta 2000) así como en el Mediterráneo (Cimmaruta *et al.* 1998; pero ver Pla y Pujolar 1999), el sureste de los Estados Unidos de América (Oxenford 1999), y entre muestras de Hawai y Taiwán (Herzig 1990). En este artículo se evaluaron los niveles de variabilidad genética y conectividad entre poblaciones a dos escalas espaciales, una regional (Pacífico oriental) y una oceánica (entre Pacífico oriental y central), usando polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs) del gen mitocondrial NADH1. Estos resultados podrán ser utilizados para diseñar medidas más adecuadas en el manejo de este recurso pelágico, actualmente reservado para la pesca deportiva en las aguas territoriales mexicanas.

Materiales y métodos

De la pesca deportiva en cuatro localidades de México y del mercado de mariscos de la isla Oahu (Hawai) se recolectaron muestras de tejido (muscular y hepático) de *C. hippurus* que se preservaron en etanol al 95% hasta su análisis en laboratorio (tabla 1). Se extrajo y purificó el ADN genómico total a partir de la digestión del tejido con proteinasa K, la precipitación proteica con cloruro de litio, y la extracción

increased survivorship, such that seasonal abundance may be a function of cohort survival and changes in the sea surface temperature regime (Kraul 1999).

The possibility of restricted home ranges and of temporally and spatially constrained demographic pulses are factors that may increase the potential for stock structure and genetic heterogeneity; this has been suggested by differences in population dynamics in Mexican waters (Beltrán-Pimienta 2000) and detected in the Mediterranean (Cimmaruta *et al.* 1998, but see Pla and Pujolar 1999), in the southeastern United States (Oxenford 1999), and between samples from Hawaii and Taiwan (Herzig 1990). In this paper we assess the levels of molecular genetic variability and connectivity among populations at two spatial scales, a regional scale (eastern Pacific) and an oceanic scale (between the central and eastern Pacific), using restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) of the NADH1 mitochondrial (mt) gene. These results may be used to design better management plans for this pelagic resource, at present reserved for the sport fishing industry in Mexican waters.

Material and methods

Tissue samples (muscle and liver) of *C. hippurus* were collected from recreational fisheries at four localities in Mexico and from the fish market in Oahu (Hawaii), and preserved in 95% ethanol until molecular analyses (table 1). Total genomic DNA was extracted using standard proteinase K digestion and purified by lithium chloride salting-out, followed by organic extraction using chloroform-isoamyl alcohol and subsequent ethanol precipitation with the addition of ammonium acetate. The entire NADH1 mt gene was amplified with primers L3324 GCTCTACGTGATCTGAGTTCAG and H4716 TACATGTTTGGGGTATGGGC (Wingrove 2000), using Hot-Start *Taq* Mastermix® according to manufacturer protocols (Qiagen, Valencia, California). Among mtDNA protein coding genes, it is one of the fast evolving (Lopez *et al.* 1997). The PCR thermal cycling consisted of an initial *Taq* activation of 15 min at 95°C, followed by 35 cycles of 95°C for 55 sec, 50°C for 45 sec and 72°C for 90 sec, and a final incubation at

Tabla 1. Datos de las muestras de *Coryphaena hippurus* analizadas y sus niveles de diversidad genética mitocondrial haplotípica (*h*) y nucleotídica (π) (nd = no disponible).

Table 1. Samples of *Coryphaena hippurus* and levels of mitochondrial haplotype (*h*) and nucleotide (π) genetic diversity (nd = not available).

Localidad	Coordenadas geográficas	Año de recolección	<i>n</i>	Longitud furcal (cm)	Número de haplotipos	<i>h</i> (SE)	π (%)
Los Cabos, BCS*	22°53' N, 109°54' W	2004	67	47–143	11	0.6119 (0.052)	0.4106
Mazatlán, Sinaloa	23°12' N, 106°26' W	2003/2004	42	69–128	9	0.7305 (0.059)	0.7009
Oahu, Hawai	21°18' N, 157°49' W	2004	48	nd	12	0.7748 (0.049)	0.7629

* Incluye muestras recolectadas en La Paz (24°05' N, 110°11' W, *n* = 21) y Punta Lobos (23°29' N, 110°13' W, *n* = 15).

orgánica con cloroformo-alcohol isoamílico, para ser finalmente precipitado con etanol en presencia de acetato de amonio. El gen mitocondrial NADH1 se amplificó por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los cebadores L3324 5' GCTCTACGTGATCTGAGTTCAG 3' y H4716 5' TACATGTTTGGGGTATGGGC 3' (Wingrove 2000) utilizando HotStart *Taq* Mastermix® de acuerdo al protocolo del fabricante (Qiagen, Valencia, California). Entre los genes que codifican proteínas mitocondriales, éste es uno de los que poseen tasas de evolución mayores (Lopez *et al.* 1997). La PCR se realizó con el siguiente perfil de termociclado: activación inicial de la *Taq* de 15 min a 95°C, seguida de 35 ciclos de 95°C por 55 segundos, 50°C por 45 segundos, y 72°C por 90 segundos, e incubación final a 72°C por 5 min. Posteriormente, las amplificaciones se confirmaron por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. Los productos de la PCR fueron digeridos con cinco endonucleasas de restricción (*Alu* I, *Hae* III, *Rsa* I, *Scr*FI y *Dpn* II) siguiendo las indicaciones del fabricante (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts). Los fragmentos de restricción fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida (29:1) al 6%, teñidos con bromuro de etidio (0.25 µg L⁻¹) y posteriormente fotografiados para su análisis. Los tamaños de los fragmentos en pares de bases (pb) fueron determinados con el programa 1D versión 2.03 (Kodak, New Haven, Connecticut).

Los sitios de restricción fueron mapeados con secuencias ortólogas obtenidas del Genbank (AF272056, AF272058, AF290386, AF290388 y AF272059) y los patrones de restricción de cada enzima se combinaron en un haplotipo compuesto para cada organismo. Se calculó la distancia interhaplotípica a partir de la presencia o ausencia de los sitios de restricción de acuerdo a Nei y Miller (1990, ec. 4). Se estimaron las diversidades haplotípica y nucleotídica de acuerdo a Nei (Nei 1987, ec. 8.4 y 10.14) y la divergencia nucleotídica siguiendo a Nei y Tajima (Nei y Tajima 1981, ec. 22). Estos análisis se realizaron con el programa REAP 4.0 (McElroy *et al.* 1992). Se realizó una prueba exacta de homogeneidad en la distribución de haplotipos para la cual se estimó la significancia estadística mediante simulaciones Monte Carlo de acuerdo con Raymond y Rousset (1995). Se calcularon índices de fijación F_{ST} y su análogo molecular Φ_{ST} a partir de un análisis de varianza molecular (AMOVA), usando una matriz de distancias interhaplotípicas como distancias euclidianas (Excoffier *et al.* 1992). Se estimaron los niveles de flujo genético (Nm) a partir de los índices de fijación (Cockerham y Weir 1993, Slatkin 1995). Para estos análisis se utilizó el programa Arlequin 2.0 (Schneider *et al.* 1999) estimándose la significancia estadística por métodos exactos (Guo y Thompson 1992). Finalmente, se reconstruyeron árboles filogenéticos en la forma de una red de mínima expansión (MSN) y de un filograma "Neighbor-Joining" (NJ, Saitou y Nei 1987) usando el número de diferencias en sitios de restricción entre cada haplotipo y la distancia de Nei y Tajima con los programas Arlequin 2.0 y Mega 2.1 (Kumar *et al.* 2001), respectivamente.

72°C for 5 min. After a 1.5% agarose electrophoresis to confirm proper amplification, PCR products were digested with five restriction endonucleases (*Alu* I, *Hae* III, *Rsa* I, *Scr*FI and *Dpn* II) following the manufacturer protocols (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts). Restriction fragments were electrophoresed in 6% polyacrylamide (29:1) gels, stained with ethidium bromide (0.25 µg L⁻¹), and subsequently photographed digitally for image analyses. Fragment sizes in base pairs (bp) were computed with the program 1D ver. 2.03 (Kodak, New Haven, Connecticut).

Restriction site mapping was made using orthologous sequences from Genbank (AF272056, AF272058, AF290386, AF290388 and AF272059), and individual restriction patterns for separate enzymes were combined in a composite haplotype for each organism. The presence or absence of restriction sites was used to compute inter-haplotype genetic distances following Nei and Miller (1990, eq. 4). Haplotype and nucleotide diversities were calculated according to Nei (1987, eq. 8.4 and 10.14) and nucleotide divergence following Nei and Tajima (1981, eq. 22). These analyses were made using the program REAP 4.0 (McElroy *et al.* 1992). We applied an exact test of haplotype homogeneity among samples and the statistical significance was estimated via 1000 Markov Chain Monte Carlo simulations as proposed by Raymond and Rousset (1995). We computed fixation indices F_{ST} and their molecular analogue Φ_{ST} through an analysis of molecular variance (AMOVA), using a matrix of inter-haplotype restriction site differences as Euclidean distances (Excoffier *et al.* 1992). The levels of gene flow (Nm) were estimated indirectly from linearized fixation indices (Cockerham and Weir 1993, Slatkin 1995). These analyses were computed using the program Arlequin 2.0 (Schneider *et al.* 1999) and statistical significance was estimated using exact methods (Guo and Thompson 1992). Finally, a minimum spanning network (MSN) and a neighbor-joining (Saitou and Nei 1987) phylogenetic tree were reconstructed using the number of different restriction sites and Nei and Tajima's metric distance with the programs Arlequin 2.0 and Mega 2.1 (Kumar *et al.* 2001), respectively.

Results

We analyzed 157 fish from which the entire NADH1 gene was successfully amplified (ca. 1400 bp) and digested for RFLPs. A total of 38 restriction sites were scored for all enzymes; the number varied from 4 in *Dpn* I to 11 in *Scr*FI. Nucleotide polymorphisms at these sites produced 20 NADH1 composite haplotypes one of which (Ch1) was found in 78 (49.7%) of the fish, predominating in all regions (table 2). The next most abundant haplotype differing by only one restriction site occurred in about 24% of the samples. Most haplotypes (60%) were private, occurring in only one of the regions at low frequencies (table 2). The combination of two predominant and many rare haplotypes resulted in moderately high haplotype diversities (table 1). The samples from Baja California Sur (BCS: La Paz, Los Cabos and Punta Lobos) were genetically

Resultados

Se analizaron 157 muestras a las cuales se amplificó el gen NADH1 (alrededor de 1400 pb) y se digirió exitosamente. Se encontraron 38 sitios de restricción en todas las enzimas cuyo número varió entre 4 sitios para *Dpn* I y 11 para *Scr*FI. Los polimorfismos nucleotídicos produjeron 20 haplotipos compuestos del gen NADH1, uno de los cuales (Ch1) se encontró en 78 peces (49.7%), predominando en todas las regiones (tabla 2). El siguiente haplotipo más abundante, que difirió en sólo un sitio de restricción, ocurrió en 24% de las muestras. La mayoría de los haplotipos (60%) fueron privados, ocurriendo en sólo una de las regiones en bajas frecuencias (tabla 2). La combinación de dos haplotipos predominantes y muchos raros resultó en una alta diversidad haplotípica (tabla 1). Las muestras provenientes de Baja California Sur (BCS: La Paz, Los Cabos y Punta Lobos) fueron genéticamente indistinguibles ($\Phi_{ST} = -0.013$, $p = 0.66$, AMOVA), por lo que se agruparon en una muestra de BCS en los análisis sucesivos para incrementar el tamaño de muestra y el poder estadístico de las pruebas de diferenciación (tabla 1). Las muestras de BCS fueron mucho menos diversas tanto a nivel haplotípico como nucleotídico (tabla 1), como resultado de una sobre dominancia (84%) de los dos haplotipos más abundantes en comparación con las otras dos localidades (65–67%) (tabla 2). La frecuencia de haplotipos entre las tres localidades fue significativamente heterogénea ($P = 0.014$, prueba exacta). Asimismo, la proporción de varianza genética molecular explicada por la estructura genética fue pequeña pero altamente significativa ($\Phi_{ST} = 0.029$, $P = 0.004$, AMOVA); sin embargo, el índice de fijación basado en frecuencias haplotípicas no fue significativamente diferente de cero ($F_{ST} = 0.005$, $P = 0.21$). Las comparaciones pareadas consistentemente identificaron como significativa a la diferenciación entre BCS y Mazatlán, pero la diferencia entre BCS y Hawai sólo fue significativa en la prueba exacta mientras que el Φ_{ST} entre Hawai y Mazatlán no fue significativo (tabla 3). Los niveles de flujo genético entre las regiones fueron: $N_m = 9$ ($\Phi_{ST} = 0.053$, BCS/Mazatlán), $N_m = 37$ ($\Phi_{ST} = 0.013$, BCS/

Tabla 2. Haplotipos compuestos de RFLPs del gen NADH1 mitocondrial de *Coryphaena hippurus*, obtenidos por digestión con las endonucleasas de restricción *Alu* I, *Hae* III, *Rsa* I, *Scr*FI y *Dpn* II.

Table 2. RFLP mitochondrial NADH1 composite haplotypes of *Coryphaena hippurus*, obtained from digestions using *Alu* I, *Hae* III, *Rsa* I, *Scr*FI and *Dpn* II restriction endonucleases.

Nombre	Haplotipo compuesto	BCS	Mazatlán	Oahu
Ch1	AAAAA	38	20	20
Ch2	AAAAB	18	8	11
Ch3	AAAAC	0	1	1
Ch4	AAAAD	1	0	0
Ch5	AAABA	0	5	2
Ch6	AAABB	0	3	0
Ch7	AABAA	0	0	3
Ch8	AACAB	2	0	0
Ch9	AACAC	0	0	1
Ch10	AADAA	1	0	0
Ch11	AAEAA	1	0	0
Ch12	AAFAA	0	0	1
Ch13	ABAAA	0	0	1
Ch14	BAAAA	0	2	2
Ch15	BAAAB	0	0	1
Ch16	BABAA	1	1	2
Ch17	CAAAA	2	1	3
Ch18	CAAAB	1	0	0
Ch19	CAABA	1	1	0
Ch20	DAAAA	1	0	0

indistinguishable ($\Phi_{ST} = -0.013$, $p = 0.66$, AMOVA); therefore, they were grouped into a single BCS sample in subsequent analyses to increase the sample size and the statistical power of the differentiation tests (table 1). Samples from BCS produced considerably smaller haplotype and nucleotide diversities (table 1), resulting from the over-dominance (84%) of the two most abundant haplotypes relative to the other two localities (65–67%) (table 2). The frequency of haplotypes among the three localities was significantly heterogeneous ($P = 0.014$, exact test of genetic differentiation). Likewise, the proportion of the molecular genetic variance explained by the genetic structure was small but highly significant ($\Phi_{ST} = 0.029$, $P = 0.004$, AMOVA), though the fixation index based on haplotype frequencies alone was not significantly different from zero ($F_{ST} = 0.005$, $P = 0.21$). Pairwise comparisons consistently identified the significant genetic distinction between BCS and Mazatlán, but distinction between BCS and Hawaii was only detected as significant in the exact test, whereas the molecular fixation index analog between Hawaii and Mazatlán was marginally non-significant (table 3). The levels of gene flow

Tabla 3. Resultados de las pruebas pareadas de diferenciación genética: pruebas exactas (valores p - abajo izquierda) y AMOVA (Φ_{ST} /valores p - arriba derecha) ($\alpha = 0.017$, para las tres comparaciones después de la corrección de Bonferroni).

Table 3. Pairwise tests of genetic differentiation: exact tests (p values - bottom left) and AMOVA (Φ_{ST} / p values - top right) ($\alpha = 0.017$, for all three comparisons after Bonferroni correction).

exact Φ_{ST}	BCS	Mazatlán	Hawai
BCS		0.053/ 0.0033	0.013/ 0.1117
Mazatlán	0.0057		0.026/ 0.0532
Hawai	0.0302	0.4106	

Hawaii), y $N_m = 19$ ($\Phi_{ST} = 0.026$, Mazatlán/Hawaii). Se detectaron diferencias topológicas entre las reconstrucciones filogenéticas MSN (fig. 1a) y el filograma NJ (fig. 1b). Por ejemplo, del clado [Ch3, 8, 9] conectado a Ch2 en el filograma, sólo [Ch3, 9] permanecen unidos y Ch8 se conecta directamente a Ch2 en el MSN. No obstante, la mayor parte de las relaciones son congruentes entre ambas reconstrucciones, en particular los haplotipos más abundantes (Ch1 y Ch2) aparecen como ancestrales. Otro aspecto relevante es la filogenia con forma de estrella del MSN (fig. 1a). La distribución geográfica de los linajes mitocondriales reveló una ausencia de patrones filogeográficos, con la posible excepción de la preponderancia del linaje divergente que comprende los haplotipos Ch5, 6 y 19 y del cual nueve de las copias se encuentran en Mazatlán (fig. 1), aunque sólo el Ch6 es exclusivo de esta localidad. El MSN y el filograma también revelaron que la mayoría de los haplotipos de BCS, con excepción de Ch8 y 19, se encuentran poco diferenciados, difiriendo en sólo uno o dos sitios de restricción, lo cual explica la poca diversidad nucleotídica observada en estos peces y la singularidad genética de esta muestra.

Discusión

Los niveles de variabilidad y de estructura genética detectados con loci nucleares aloenzimáticos (Gyllensten 1985, Ward *et al.* 1994) y microsatelitales (DeWoody y Avise 2000) han revelado ciertas tendencias en peces marinos y dulceacuícolas. Los peces marinos poseen mayores niveles de heterocigosidad, particularmente en loci microsatelitales hipervariables (DeWoody y Avise 2000), pero niveles de estructura genética significativamente menores (expresados como G_{ST} multilocus) puesto que intercambian de 10 a 100 veces más migrantes por generación que los peces dulceacuícolas (Ward *et al.* 1994). Dichas tendencias son atribuibles a diferencias en tamaño efectivo poblacional y a la ausencia de barreras para la dispersión en el medio ambiente marino. El océano representa un hábitat continuo e ilimitado y pocas especies manifiestan este hecho mejor que las comunidades oceánicas pelágicas que son habitadas por peces migratorios como los escómbridos (atunes), istiofóridos (picudos) y corifénidos (dorado), entre otros.

Al igual que la gran mayoría de peces marinos, las especies pelágicas poseen larvas planctónicas que son acarreadas pasivamente por corrientes oceánicas. Esta dispersión, aunada al movimiento activo de adultos, genera altos niveles de conectividad a escalas espaciales mayores que las de especies costeras (Bowen y Grant 1997). No obstante, en el caso del dorado que puede desarrollarse en un juvenil de 16.5 cm de longitud furcal en alrededor de 50 días (Massutí *et al.* 1999), el rápido crecimiento permite suponer que su permanencia meropláctónica es lo suficientemente corta para limitar su tiempo a la deriva. Por ello no se espera que las corrientes oceánicas tengan un papel preponderante en el flujo genético.

La movilidad de las especies de peces pelágicos refleja la aparente naturaleza abierta y sin barreras del océano, que se contrapone a la noción de poblaciones geográficamente

among regions were: $N_m = 9$ ($\Phi_{ST} = 0.053$, BCS/Mazatlán), $N_m = 37$ ($\Phi_{ST} = 0.013$, BCS/Hawaii), and $N_m = 19$ ($\Phi_{ST} = 0.026$, Mazatlán/Hawaii). There were topological differences between the phylogenetic reconstructions represented as a MSN (fig. 1a) and neighbor-joining phylogram (fig. 1b). For instance, of the [Ch3, 8, 9] clade connected to Ch2 in the phylogram, only [Ch3, 9] remain together and Ch8 is directly connected to Ch2 in the MSN. Most relationships, however, were congruent between reconstructions, particularly placing the most abundant haplotypes (Ch1 and Ch2) as ancestral to others. Another relevant feature is the star-shaped MSN (fig. 1a). Analysis of the geographic distribution of mitochondrial lineages revealed no phylogeographic patterns, with the possible exception of the preponderance of the divergent lineage comprising haplotypes Ch5, 6 and 19, of which nine copies were found in Mazatlán (fig. 1), even though only Ch6 is exclusive to this locality. The MSN and phylogram also revealed that most haplotypes found in BCS, except for Ch8 and 19, are very closely related, differing by only one or two restriction sites, which explains the small nucleotide diversity observed among these fish and the genetic singularity of this sample.

Discussion

Levels of genetic structure and variability based on the genetic study of allozyme protein coding (Gyllensten 1985, Ward *et al.* 1994) and hypervariable non-coding (microsatellites, DeWoody and Avise 2000) nuclear loci reveal some general trends among marine and freshwater fishes. Namely, marine fish populations possess higher levels of heterocigosity, particularly at hypervariable microsatellites (DeWoody and Avise 2000), but significantly smaller degrees of genetic structure (expressed as multilocus G_{ST}), with marine subpopulations exchanging 10 to 100 times more migrants per generation than freshwater counterparts (Ward *et al.* 1994). These trends are attributable to differences in effective population sizes and the absence of barriers to dispersal in the marine environment. The marine realm does represent a much more continuous and boundless habitat and few species manifest this better than the oceanic pelagic communities, where migratory fish such as scombrids (tunas), istiophorids (billfishes), coryphaenids (dolphinfish) and others thrive.

Like most marine fishes, pelagic species possess planktonic larvae that are passively entrained by ocean currents. This dispersal and the active movement of adults bring about very high levels of connectivity at larger spatial scales than their more coastal counterparts (Bowen and Grant 1997). On the other hand, dolphinfishes can grow into a 16.5-cm fork-length juveniles in about 50 days (Massutí *et al.* 1999). This rapid growth implies that the meroplanktonic phase may be short and limit their long-range dispersal by passive drift. Thus, ocean currents are not expected to play a predominant role in their gene flow.

estructuradas con niveles de flujo genético limitados. Varios estudios han revelado patrones de diferenciación en los que las especies oceánicas tienden a ser genéticamente homogéneas a escalas geográficas regionales y frecuentemente mucho mayores, mostrando diferenciación solamente entre poblaciones extremas o entre cuencas oceánicas (e.g., Alvarado-Bremer *et al.* 1998, Reeb *et al.* 2000, Broughton *et al.* 2002, Pujolar *et al.* 2003). Inclusive en ausencia de altos niveles de flujo genético, la existencia de poblaciones de gran tamaño puede impedir o retrasar la diferenciación por efecto de deriva génica (Ely *et al.* 2005). La evidencia de heterogeneidad insospechada puede responder a diferencias en tipos de análisis, tipos de marcador genético (Buonaccorsi *et al.* 2001) o inclusive a la posible influencia de caracteres no relacionados, como el sexo o la edad de los especímenes. Por ejemplo, Gold y Richardson (1998) encontraron altos niveles de flujo genético en la macarela *Scomberomorus cavalla* desde Yucatán (México) hasta Carolina del Norte (EUA), así como niveles bajos de heterogeneidad, pero no encontraron índices de fijación (F_{ST}) significativos entre haplotipos mitocondriales del Golfo de México y del Atlántico. Por otra parte, descubrieron evidencia discordante entre el ADNmt y un locus aloenzimático nuclear, encontrando que la variación mitocondrial era independiente del sexo y de la edad de los peces mientras que la del locus *PEPA-2a* se relacionaba con dichos factores. Estos resultados explicaron por qué esta proteína daba evidencias de heterogeneidad genética dentro del Golfo de México en respuesta a diferencias demográficas entre las poblaciones (Gold y Richardson 1998). Un estudio posterior basado en loci microsatelitales hipervariables corroboró dicha conclusión (Broughton *et al.* 2002).

Los genes mitocondriales con mayores tasas de evolución molecular (Lopez *et al.* 1997), que incluyen los que codifican las subunidades de la Nicotinamida Deshidrogenasa (NADH1, 2, 5 y 6), han sido exitosamente utilizados para elucidar relaciones filogenéticas y estructura poblacional en especies de peces pelágicos como macarelas (Banford *et al.* 1999) y anchovetas (Bembo *et al.* 1996), así como de otros teleosteos marinos y dulceacuícolas (Kocher *et al.* 1995, Toline y Baker 1995, Patton *et al.* 1997, Birstein *et al.* 2002, Klett y Meyer 2002, Mateos *et al.* 2002).

Es difícil identificar de inmediato cuáles factores son responsables de la heterogeneidad observada en el dorado; sin embargo, no hay razón para sospechar que los resultados aquí obtenidos se deban a sesgos en la naturaleza de las muestras. Todos los organismos muestreados poseen tallas similares y aunque no se tienen datos de los organismos de Hawai, éstos representan peces de tamaño comercial reclutados a la pesquería, al igual que los mexicanos. Desafortunadamente, pocos estudios han examinado la estructura genética de las poblaciones de dorado. En el Mediterráneo, Cimmaruta *et al.* (1998) encontraron evidencia de dos subpoblaciones diferenciadas utilizando electroforesis de aloenzimas. Estos resultados no pudieron ser corroborados por Pla y Pujolar (1999), quienes utilizaron también loci aloenzimáticos y encontraron una sola

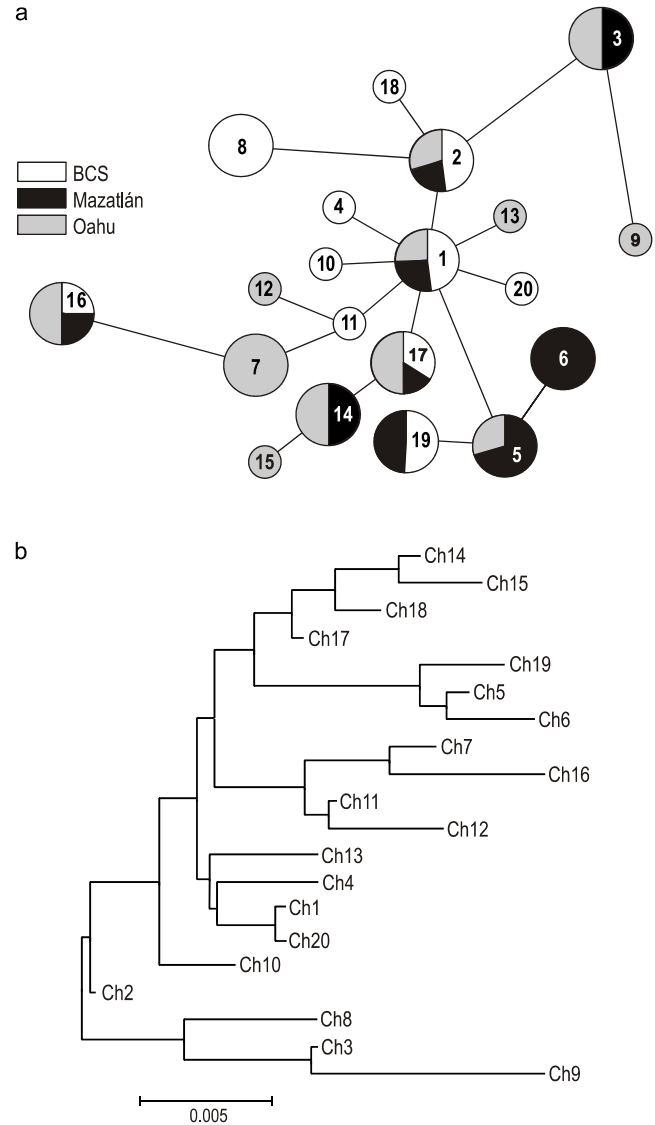


Figura 1. Reconstrucciones filogenéticas de haplotipos del gen mitocondrial NADH1 de *Coryphaena hippurus*. (a) Red de mínima expansión en la que el origen geográfico de los haplotipos compartidos se indica en la leyenda. Los círculos pequeños representan haplotipos privados y la longitud de las ramas representa uno (cortas) o dos (largas) sitios de restricción separando a los haplotipos. (b) Filograma *neighbor-joining* reconstruido utilizando una matriz de distancias inter haplotípicas de Nei y Tajima (1981). Los haplotipos se encuentran nombrados como en la tabla 2.

Figure 1. Phylogenetic reconstructions of mitochondrial NADH1 haplotypes of *Coryphaena hippurus*. (a) Minimum spanning network in which the geographic origin of shared haplotypes is indicated according to the legend. Smaller circles represent private haplotypes and length branches represent one (short) or two (long) restriction site differences. (b) Unrooted neighbor-joining phylogram reconstructed using a matrix of inter-haplotype distances according to Nei and Tajima (1981). Haplotype numbers are those of table 2.

The vagility of pelagic fishes epitomizes the open and barrier-free nature of the marine environment, which counters the notion of geographically structured populations with limited gene flow. Many studies have revealed a pattern where oceanic pelagic species tend to be genetically homogeneous

población panmíctica desde las islas de Mallorca (España) y Sicilia (Italia) en el Mediterráneo occidental hasta las Islas Canarias (España) en el Atlántico oriental. En el mar Caribe, Oxenford y Hunte (1986) utilizaron caracteres de la historia de vida para identificar dos stocks de dorado en la región, así como genotipos de 16 loci polimórficos aloenzimáticos, de un total de 55 analizados, de los cuales uno (*IDHP-2**) mostró evidencia de diferenciación entre Miami, Florida (EUA), y Barbados, coincidiendo con la diferenciación fenotípica detectada (Oxenford y Hunte 1986, Oxenford 1999). Finalmente, en un estudio encaminado a desarrollar nuevos métodos de marcaje de dorado, Herzig (1990) secuenció 201 pb del gen mitocondrial citocromo *b* que revelaron diferencias entre peces capturados en Hawai y los provenientes de Taiwan. Aunque no fue un estudio de genética poblacional, los resultados de Herzig sugieren que existe un potencial real para la diferenciación genética entre las poblaciones de dorado del Pacífico. En México, estudios comparativos de biología pesquera sugieren esta posibilidad (Beltrán-Pimienta 2000). Los resultados del presente trabajo apoyan este hecho, aunque requieren de mayor esfuerzo para ser corroborados con muestras adicionales y un mayor número de marcadores genéticos.

Agradecimientos

Agradecemos a M Zúñiga (CICIMAR), J Hyde, E Lynn y R Vetter (NMFS-NOAA) su ayuda en la recolección de muestras, y a R Chapman (SCDNR) por compartir generosamente cebadores e información no publicada. Este artículo deriva parcialmente de la tesis de licenciatura de M Bobadilla-Jiménez llevada a cabo en CICESE bajo la dirección de A Rocha-Olivares. Este proyecto recibió apoyo de la Sociedad Cooperativa Pesquera Ejidal Punta Lobos y del Consejo Estatal de Pesca y Acuicultura de Baja California Sur, mismo que agradecemos cordialmente. El financiamiento provino del proyecto sectorial SAGARPA- CONACYT-2003-C01-42. Agradecemos cordialmente las críticas constructivas de dos árbitros anónimos.

Referencias

- Alvarado-Bremer JR, Stequert B, Robertson NW, Ely B. 1998. Genetic evidence for inter-oceanic subdivision of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) populations. *Mar. Biol.* 132(4): 547–557.
- Arocha F, Marciano LA, Larez A, Altuve D, Alio J. 1999. The fishery, demographic size structure and oocyte development of dolphinfish, *Coryphaena hippurus*, in Venezuela and adjacent waters. *Sci. Mar.* 63(3–4): 401–409.
- Banford HM, Bermingham E, Collette BB, McCafferty SS. 1999. Phylogenetic systematics of the *Scomberomorus regalis* (Teleostei: Scombridae) species group: Molecules, morphology and biogeography of Spanish mackerels. *Copeia* (3): 596–613.
- Beltrán-Pimienta R. 2000. Contribución al conocimiento de la pesquería y la biología poblacional del dorado (*Coryphaena hippurus*, Linnaeus 1758) de las costas de Sinaloa, Nayarit y Baja California Sur, México, durante 1997. Tesis de maestría, Facultad de Ingeniería Pesquera, Universidad Autónoma de Nayarit, México.
- over local and often extended geographic scales and only show levels of differentiation among extreme localities or oceanic basins (e.g., Alvarado Bremer *et al.* 1998, Reeb *et al.* 2000, Broughton *et al.* 2002, Pujolar *et al.* 2003). Even in the absence of high levels of gene flow, large population sizes may prevent or retard genetic differentiation (Ely *et al.* 2005). Evidence of unsuspected heterogeneity may be dependent on the analyses performed, on the genetic marker used (Buonaccorsi *et al.* 2001) or even on the influence of seemingly unrelated features such as sex and age. For example, in the pelagic king mackerel *Scomberomorus cavalla*, Gold and Richardson (1998) found evidence of high levels of gene flow in fish from the Yucatan Peninsula (Mexico) to the coast of North Carolina (USA), in which homogeneity tests indicated some level of heterogeneity in mtDNA haplotypes between the Gulf of Mexico and Atlantic samples but non-significant fixation indices (F_{ST}) for the same comparisons. On the other hand, the authors observed discordant variation between mtDNA and a nuclear (allozyme) locus, finding that while mtDNA was independent of sex or age of fish the allozyme locus *PEPA-2a* was not, which explained why previous results based on this protein suggested the existence of genetic heterogeneity within the Gulf of Mexico due to demographic variation (Gold and Richardson 1998). A later study based on hypervariable nuclear microsatellite loci corroborated this conclusion (Broughton *et al.* 2002).
- Mitochondrial genes with high rates of molecular evolution (Lopez *et al.* 1997), including those coding for the nicotinamide dehydrogenase subunits (NADH1, 2, 5 and 6), have been successfully used to elucidate phylogenetic relationships and population structure in pelagic fishes such as mackerels (Banford *et al.* 1999) and anchovies (Bembo *et al.* 1996), as well as other marine and freshwater teleosts (Kocher *et al.* 1995, Toline and Baker 1995, Patton *et al.* 1997, Birstein *et al.* 2002, Klett and Meyer 2002, Mateos *et al.* 2002).
- It is difficult at present to ascertain which factors are responsible for the significant heterogeneity found in our dolphinfish samples; however, we have no reason to suspect that our results are caused by sampling biases. All regional samples possess comparable length ranges. Even though we do not have data for the Hawaiian specimens, these were commercial-sized organisms fully recruited to the fishery, as were the fish from Mexico. Unfortunately, few studies have examined the genetic structure of dolphinfish populations. In the Mediterranean, Cimmaruta *et al.* (1998) found evidence of two differentiated subpopulations using allozyme electrophoresis, but these results were not corroborated by Pla and Pujolar (1999), who reported a single panmictic population from the islands of Majorca (Spain) and Sicily (Italy) in the western Mediterranean and the Canary Islands (Spain) in the eastern Atlantic, also using allozyme electrophoresis. In the Caribbean Sea (central-west Atlantic), Oxenford and Hunte (1986) used traditional life-history characters to identify two dolphinfish stocks in the region as well as genotypes from 16 polymorphic loci, of 55 scored, of which only one (*IDHP-2**) showed some

- Bembo DG, Carvalho GR, Snow M, Cingolani N, Pitcher TJ. 1996. Stock discrimination among European anchovies, *Engraulis encrasicolus*, by means of PCR-amplified mitochondrial DNA analysis. *Fish. Bull.* 94(1): 31–40.
- Birstein VJ, Doukakis P, DeSalle R. 2002. Molecular phylogeny of Acipenseridae: Nonmonophyly of Scaphirhynchinae. *Copeia* (2): 287–301.
- Bowen BW, Grant WS. 1997. Phylogeography of the sardines (*Sardinops* spp.): Assessing biogeographic models and population histories in temperate upwelling zones. *Evolution* 51(5): 1601–1610.
- Brill RW. 1996. Selective advantages conferred by the high performance physiology of tunas, billfishes, and dolphin fish. *Comp. Biochem. Physiol. A* 113(1): 3–15.
- Broughton RE, Stewart LB, Gold JR. 2002. Microsatellite variation suggests substantial gene flow between king mackerel (*Scomberomorus cavalla*) in the western Atlantic Ocean and Gulf of Mexico. *Fish. Res.* 54(3): 305–316.
- Buonaccorsi VP, McDowell JR, Graves JE. 2001. Reconciling patterns of inter-ocean molecular variance from four classes of molecular markers in blue marlin (*Makaira nigricans*). *Mol. Ecol.* 10(5): 1179–1196.
- Buonaccorsi VP, Kimbrell C, Lynn EA, Vetter RD. 2002. Population structure of copper rockfish (*Sebastes caurinus*) reflects postglacial colonization and contemporary patterns of larval dispersal. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59(8): 1374–1384.
- Cimmaruta R, Iaconelli M, Nascetti G, Bullini L. 1998. Genetic diversity in Mediterranean large pelagic fish populations. *Biol. Mar. Mediterr.* 5(3): 300–310.
- Cockerham CC, Weir BS. 1993. Estimation of gene flow from *F*-statistics. *Evolution* 47(3): 855–863.
- Dawson MN, Staton JL, Jacobs DK. 2001. Phylogeography of the tidewater goby, *Eucyclogobius newberryi* (Teleostei, Gobiidae), in coastal California. *Evolution* 55(6): 1167–1179.
- Deudero S, Merella P, Morales-Nin B, Massutí E, Alemany F. 1999. Fish communities associated with FADs. *Sci. Mar.* 63 (3–4): 199–207.
- DeWoody JA, Avise JC. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *J. Fish Biol.* 56(3): 461–473.
- Ely B, Viñas J, Alvarado-Bremer JR, Black D, Lucas L, Covello K, Labrie AV, Thelen E. 2005. Consequences of the historical demography on the global population structure of two highly migratory cosmopolitan marine fishes: the yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) and the skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *BMC Evol. Biol.* 5(19): doi: 10.1186/1471-2148-1185-1119.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131(2): 479–491.
- García-Melgar CG. 1995. Ciclo de reproducción del dorado *Coryphaena hippurus* (Linnaeus 1758, Pisces: Coryphaenidae) en el área de los Cabos, BCS, México. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California Sur México.
- Gold JR, Richardson LR. 1998. Mitochondrial DNA diversification and population structure in fishes from the Gulf of Mexico and western Atlantic. *J. Hered.* 89(5): 404–414.
- Graves JE. 1996. Conservation genetics of fishes in the pelagic marine realm. In: Avise JC, Hamrick JL (eds.), *Conservation Genetics: Case Histories from Nature*. Chapman & Hall, New York, pp. 335–366.
- Guo S, Thompson E. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48: 361–372.
- Gyllensten U. 1985. The genetic structure of fish: Differences in the intraspecific distribution of biochemical genetic variation between evidence of differentiation between Miami and Barbados, coinciding with the phenotypic demarcation (Oxenford and Hunte 1986, Oxenford 1999). In a study aiming to develop new genetic methods for tagging dolphinfish, Herzig (1990) sequenced 201 bp of the mitochondrial cytochrome *b* gene, which revealed differences between fish caught in Hawaii and those from Taiwan. Even though it was not a population genetics study, Herzig's results suggest that there may be a real potential for genetic differentiation among Pacific dolphinfish populations. In Mexico, comparative fishery biology studies also suggest this possibility (Beltrán-Pimienta 2000). Our results further support this possibility, but they need to be corroborated with additional samples and a larger number of genetic markers.
- ### Acknowledgements
- We are grateful to M Zúñiga (CICIMAR), J Hyde, E Lynn and R Vetter (NMFS-NOAA) for help in sample collection and to R Chapman (SCDNR) for his generous sharing of primers and unpublished information. Part of this paper is partially derived from the undergraduate thesis research of M Bobadilla, carried out at CICESE under the supervision of A Rocha-Olivares. This project was supported by the Sociedad Cooperativa Pesquera Ejidal Punta Lobos and the Consejo Estatal de Pesca y Acuicultura de Baja California Sur, whom we gratefully acknowledge. Funding was provided by the grant SAGARPA-CONACYT-2003-C01-42. We are grateful to two anonymous reviewers for their constructive criticisms.
-
- marine, anadromous and freshwater fishes. *J. Fish Biol.* 26: 691–699.
- Harper DE, Bohnsack JA, Lockwood BR. 2000. Recreational fisheries in Biscayne National Park, Florida, 1976–1991. *Mar. Fish. Rev.* 62(1): 8–24.
- Herzig CE. 1990. Mitochondrial DNA used to track the dispersal of a preferred menu item in Waikiki restaurants: Mahimahi as an example of genetic tagging with mtDNA. *Pac. Sci.* 44(2): 186–187.
- Jorgensen HBH, Hansen MM, Bekkevold D, Ruzzante DE, Loeschcke V. 2005. Marine landscapes and population genetic structure of herring (*Clupea harengus* L.) in the Baltic Sea. *Mol. Ecol.* 14(10): 3219–3234.
- Kingsford MJ, Defries A. 1999. The ecology of and fishery for *Coryphaena* spp. in the waters around Australia and New Zealand. *Sci. Mar.* 63(3–4): 267–275.
- Klett V, Meyer A. 2002. What, if anything, is a Tilapia? Mitochondrial ND2 phylogeny of tilapiines and the evolution of parental care systems in the African cichlid fishes. *Mol. Biol. Evol.* 19(6): 865–883.
- Kocher TD, Conroy JA, McKaye KR, Stauffer JR Jr., Lockwood SF. 1995. Evolution of NADH dehydrogenase subunit 2 in East African cichlid fish. *Mol. Phylogenet. Evol.* 4(4): 420–432.
- Kraul S. 1999. Seasonal abundance of the dolphinfish, *Coryphaena hippurus*, in Hawaii and the Tropical Pacific Ocean. *Sci. Mar.* 63(3–4): 261–266.
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. 2001. MEGA 2: Molecular Evolutionary Genetic Analysis software. *Bioinformatics* 17(12): 1244–1245.

- Lasso J, Zapata L. 1999. Fisheries and biology of *Coryphaena hippurus* (Pisces: Coryphaenidae) in the Pacific coast of Colombia and Panama. *Sci. Mar.* 63 (3-4): 387-399.
- Lee CS, Ostrowski AC. 2001. Current status of marine finfish larviculture in the United States. *Aquaculture* 200(1-2): 89-109.
- Lopez JV, Culver M, Stephens JC, Johnson WE, O'Brien SJ. 1997. Rates of nuclear and cytoplasmic mitochondrial DNA sequence divergence in mammals. *Mol. Biol. Evol.* 14(3): 277-286.
- Massutí E, Morales-Nin B. 1995. Seasonality and reproduction of dolphin-fish (*Coryphaena hippurus*) in the western Mediterranean. *Sci. Mar.* 59(3-4): 357-364.
- Massutí E, Morales-Nin B, Moranta J. 1999. Otolith microstructure, age, and growth patterns of dolphin, *Coryphaena hippurus*, in the western Mediterranean. *Fish. Bull.* 97(4): 891-899.
- Mateos M, Sanjur OI, Vrijenhoek RC. 2002. Historical biogeography of the livebearing fish genus *Poeciliopsis* (Poeciliidae: Cyprinodontiformes). *Evolution* 56(5): 972-984.
- McElroy D, Moran P, Bermingham E, Kornfield I. 1992. The restriction enzyme analysis package (REAP). *Heredity* 83: 157-158.
- Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia Univ. Press, New York, 512 pp.
- Nei M, Tajima F. 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics* 97: 145-163.
- Nei M, Miller J. 1990. A simple method for estimating average number of nucleotide substitutions in and between populations from restriction data. *Genetics* 125: 873-879.
- Oxenford HA. 1999. Biology of the dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) in the western central Atlantic: A review. *Sci. Mar.* 63(3-4): 277-301.
- Oxenford HA, Hunte W. 1986. A preliminary investigation of the stock structure of the dolphin, *Coryphaena hippurus*, in the western central Atlantic. *Fish. Bull.* 84(2): 451-460.
- Oxenford HA, Hunte W. 1999. Feeding habits of the dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) in the eastern Caribbean. *Sci. Mar.* 63(3-4): 303-315.
- Palumbi SR. 2003. Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecol. Appl.* 13(1): S146-S158.
- Patton JC, Gallaway BJ, Fechhelm RG, Cronin MA. 1997. Genetic variation of microsatellite and mitochondrial DNA markers in broad whitefish (*Coregonus nasus*) in the Colville and Sagavanirktok rivers in northern Alaska. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54(7): 1548-1556.
- Pla C, Pujolar JM. 1999. Genetic homogeneity of dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) in the western Mediterranean and the eastern Atlantic. *Sci. Mar.* 63(3-4): 337-341.
- Pujolar JM, Roldan MI, Pla C. 2003. Genetic analysis of tuna populations, *Thunnus thynnus thynnus* and *T. alalunga*. *Mar. Biol.* 143(3): 613-621.
- Raymond M, Rousset F. 1995. GENEPOP (version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* 86: 248-249.
- Reeb CA, Arcangeli L, Block BA. 2000. Structure and migration corridors in Pacific populations of the swordfish *Xiphias gladius*, as inferred through analyses of mitochondrial DNA. *Mar. Biol.* 136(6): 1123-1131.
- Rivera A, Appeldoorn RS. 2000. Age and growth of dolphinfish, *Coryphaena hippurus*, off Puerto Rico. *Fish. Bull.* 98(2): 345-352.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Sandoval-Castillo JR, Rocha-Olivares A, Villavicencio-Garayzar C, Balart E. 2004. Cryptic isolation of Gulf of California shovelnose guitarfish evidenced by mitochondrial DNA. *Mar. Biol.* 145(5): 983-988.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L. 1999. Arlequin ver 2.0: A software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva, Switzerland.
- Slatkin M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139(1): 457-462.
- Smith PJ, Fujio Y. 1982. Genetic variation in marine teleosts: High variability in habitat specialists and low variability in habitat generalists. *Mar. Biol.* 69(1): 7-20.
- Taylor MS, Hellberg ME. 2003. Genetic evidence for local retention of pelagic larvae in a Caribbean reef fish. *Science* 299 (5603): 107-109.
- Toline CA, Baker AJ. 1995. Mitochondrial DNA variation and population genetic structure of the northern redbelly dace (*Phoxinus eos*). *Mol. Ecol.* 4(6): 745-753.
- Ward RD, Woodwark M, Skibinski DOF. (1994). A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. *J. Fish Biol.* 44(2): 213-232.
- Wingrove RS. 2000. The population structure of dolphin, *Coryphaena hippurus* L. 1758, in the western central Atlantic, Gulf of Mexico and eastern Caribbean Sea inferred from mitochondrial DNA variation. M.Sc. thesis, Department of Biology, College of Charleston.

Recibido en marzo de 2006;
aceptado en junio de 2006.