

Phylogeography of the purple snail *Plicopurpura pansa* along the Mexican Pacific coast

Filogeografía del caracol púrpura *Plicopurpura pansa* a lo largo de la costa del Pacífico mexicano

Felipe J López-Chávez^{1,3*}, Omar Chassin-Noria², Patricia Ríos-Chávez², Víctor Rocha-Ramírez³, Rodrigo Macip-Ríos⁴, Ken Oyama^{3,4}

¹ Centro de Estudios en Zoología, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, Km 15.5 Carretera a Nogales, predio Las Agujas, Zapopan, Jalisco, México.

² Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Gral. Francisco J. Múgica s/n, Ciudad Universitaria, CP 58030 Morelia, Michoacán, México.

³ Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Morelia, Antigua Carretera a Pátzcuaro No.8701, Col. Ex Hacienda de San José de la Huerta, CP 58190 Morelia, Michoacán, México.

⁴ Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad Morelia, Universidad Nacional Autónoma de México, Antigua Carretera a Pátzcuaro No. 8701, Col. Ex Hacienda de San José de la Huerta, CP 58190 Morelia, Michoacán, México.

* Corresponding author. E-mail: fjlopezch@gmail.com

ABSTRACT. The purple snail *Plicopurpura pansa* is a common member of the rocky intertidal community of the Tropical Eastern Pacific. It has a free-living larva that is dispersed by marine currents. We analyzed the demographic (historic), genetic, and phylogeographic structure of *P. pansa* using a fragment of the cytochrome *b* gene (687 bp). Data were analyzed by analysis of molecular variance, nested clade analysis (NCA), and a mismatch distribution analysis under the expanding population hypothesis. A total of 219 organisms were collected from 16 localities along the Mexican Pacific coast and one in Costa Rica. We obtained a total of 92 haplotypes. Genetic differences among Mexican populations were low. The Clarión Island population was significantly different from 6 of the Mexican populations studied. This result was attributed to the fact that Clarión is an oceanic island and the currents veer offshore most of the year. Haplotype network and mismatch distribution analyses indicated that the Mexican populations are undergoing expansion. The NCA confirmed a contiguous range expansion of haplotypes and this result may be related to the time that larvae spend in marine currents and to the effect of natural barriers, such as gyres, in Central America and the Isthmus of Tehuantepec.

Key words: cytochrome *b*, haplotype diversity, nucleotide diversity, Muricidae, *Plicopurpura pansa*.

RESUMEN. El caracol púrpura *Plicopurpura pansa* habita la zona intermareal a lo largo de la costa tropical del océano Pacífico. Tiene una larva de vida libre que es dispersada por las corrientes marinas. En este trabajo se analizó la estructura filogeográfica, genética y demográfica (histórica) de *P. pansa* utilizando un fragmento del citocromo *b* (687 pb). Los datos se analizaron mediante el análisis de varianza molecular, el análisis de clados anidados y una distribución de diferencias pareadas (*mismatch*), considerando una hipótesis de especie en expansión. En total se recolectaron 219 organismos de 16 localidades del Pacífico mexicano y una de Costa Rica. Obtuvimos 92 haplotipos. Las diferencias genéticas entre las poblaciones mexicanas fueron bajas. La población de isla Clarión difirió significativamente de 6 de las poblaciones mexicanas estudiadas. Este resultado fue atribuido al hecho de que la isla Clarión es oceánica y las corrientes que llevan a las larvas se desvían de la costa. La red de haplotipos y los análisis de distribución de diferencias pareadas indicaron que las poblaciones mexicanas están en un proceso de expansión. El análisis de clados anidados confirmó una expansión contigua de los haplotipos. Este resultado puede estar relacionado con el tiempo que pasan las larvas en las corrientes y con el efecto de las barreras naturales como giros en América Central y en el istmo de Tehuantepec.

Palabras clave: citocromo *b*, diversidad haplotípica, diversidad nucleotídica, Muricidae, *Plicopurpura pansa*.

INTRODUCTION

Phylogeography examines the intraspecific lineage relationships throughout the species' distribution area (Avice 2000). Research in this area is highly valuable because it supports studies on genetic differentiation of closely or distantly

INTRODUCCIÓN

La filogeografía analiza las relaciones entre los linajes intraespecíficos a lo largo de la distribución de las especies (Avice 2000). Las investigaciones en esta área son importantes dado que apoyan los estudios sobre diferenciación

related populations (Wiley and Lieberman 2011). The phylogeographic structure in animals appears to be influenced by two main factors: dispersion capacity and gamete dispersal. For benthic invertebrates, larval dispersal seems to be the main factor affecting gene flow and consequently isolation between populations.

The movement of benthic invertebrate larvae is mainly driven by marine currents (Kurihara 2007, Salas et al. 2010), and gene flow is promoted when currents connect populations separated by hundreds of kilometers (Ospina-Guerrero et al. 2008, Van den Broeck et al. 2008). Larval dispersal is also influenced by the time larvae spend in open waters (Paulay and Meyer 2006) or whether the organisms show direct or larval development (Lee and Boulding 2009, Sánchez et al. 2011). Habitat availability is another factor that affects species distribution, since organisms will settle in specific habitats along their distribution range (Kirkendale and Meyer 2004, Elligson and Krug 2006, Crandall et al. 2008).

Phylogeographic studies have been based on the quantification of haplotype and nucleotide diversity using mitochondrial DNA. The common markers in rocky intertidal gastropod species are cytochrome *c* oxidase subunit I (COI), cytochrome *b*, or both (Lee and Boulding 2007, Crandall et al. 2008, Van den Broeck et al. 2008, Haupt et al. 2013, Espinoza et al. 2015, Nuñez et al. 2015). Comparative studies with cytochrome *b* showed nucleotide and haplotype variation in species with planktonic larvae and in those with direct development (Table 1). Snail species from the same genus but with different (larval or direct) types of development pathways (*Littorina* spp.) showed higher haplotype and nucleotide diversity in planktonic species. Nevertheless, other comparative studies between east and west coast populations of *Nucella lima* and *Siphonaria lessoni* showed opposite results in their haplotype and nucleotide diversity depending on the region they inhabit (Cox et al. 2014, Nuñez et al. 2015).

The purple snail *Plicopurpura pansa* (Gould 1853) is a rocky intertidal gastropod from the Tropical Eastern Pacific that spawns in the spring. It is distributed from Baja California Sur, Mexico, to the north of Peru (Keen 1971). The purple snail is an economically important species along the western coast of Mexico since it is used to dye fibers by local people in Oaxaca and Guerrero (Castillo-Rodríguez and Amezcua-Linares 1992). Chávez and Michel (2006) proposed that *P. pansa* larvae could be part of the plankton for up to four months, from the egg stage to the time when the first recruits are seen. The larvae of *P. pansa* have their own type of movement by velum contractions, shifting from surface to bottom currents.

In this study, we analyzed the genetic and phylogeographic structure of *P. pansa* and its historic demographic events in the Tropical Eastern Pacific. Since *P. pansa* originated as a result of the rise of the Isthmus of Panama (Collins et al. 1996), and since its larvae spend a long time in the

genética entre poblaciones distantes o cercanas (Wiley y Lieberman 2011). La estructura filogeográfica en animales puede estar relacionada con dos factores: capacidad de dispersión y dispersión de gametos. En los invertebrados bentónicos, la dispersión de las larvas parece ser el factor principal que afecta el flujo génico y, por consiguiente, el aislamiento entre poblaciones.

Las corrientes marinas actúan como el principal dispersor de larvas de invertebrados bentónicos (Kurihara 2007, Salas et al. 2010) y pueden conectar poblaciones separadas por cientos de kilómetros, lo cual promueve el flujo génico (Ospina-Guerrero et al. 2008, Van den Broeck et al. 2008). La dispersión de las larvas también es influenciada por el tiempo que permanece la larva en el plancton (Paulay y Meyer 2006), así como por el tipo de desarrollo que presentan los organismos, ya sea directo o larvario (Lee y Boulding 2009, Sánchez et al. 2011). La disponibilidad de hábitat es otro factor que define la distribución de las especies, ya que los organismos se establecen en hábitats específicos a lo largo de su distribución (Kirkendale y Meyer 2004, Elligson y Krug 2006, Crandall et al. 2008).

Los estudios filogeográficos se han centrado en la cuantificación de la diversidad haplotípica y nucleotídica con la ayuda del ADN mitocondrial. Los marcadores más comunes usados para estudios de la filogeografía de gasterópodos de la zona intermareal rocosa son el citocromo *c* oxidasa subunidad I (COI), citocromo *b* ó ambos (Lee y Boulding 2007, Crandall et al. 2008, Van den Broeck et al. 2008, Haupt et al. 2013, Espinoza et al. 2015, Nuñez et al. 2015). Los estudios comparativos en los cuales se ha utilizado el citocromo *b* mostraron variación tanto nucleotídica como haplotípica en especies con larva planctónica y en especies con desarrollo directo (Tabla 1). Las especies del mismo género y con diferente forma de desarrollo (*Littorina* spp.) muestran una diferencia marcada entre ellas, y la diversidad haplotípica y nucleotídica es mayor en las especies de larva planctónica. Sin embargo, en otros estudios comparativos entre *Nucella lima* y *Siphonaria lessoni* se registraron resultados diferentes con respecto a su diversidad haplotípica y nucleotídica, dependiendo del sitio en donde se encontraban, ya sea en la costa este u oeste (Cox et al. 2014, Nuñez et al. 2015).

El caracol púrpura, *Plicopurpura pansa* (Gould 1853) habita la zona intermareal rocosa del Pacífico Oriental Tropical y se reproduce durante la primavera. Se distribuye desde el sur de Baja California Sur, México, hasta el norte del Perú (Keen 1971). El caracol púrpura es una especie económica-mente importante en la costa oeste de México, ya que produce un tinte que es utilizado por los habitantes de Oaxaca y Guerrero (Castillo-Rodríguez y Amezcua-Linares 1992). Chávez y Michel (2006) propusieron que las larvas de *P. pansa* pueden estar presentes en el plancton por un periodo de hasta cuatro meses, desde el momento en que los huevos son puestos hasta que son vistos los primeros reclutas. Las larvas de *P. pansa* presentan su propio tipo de movimiento

Table 1. Comparison of haplotype (h) and nucleotide (π) diversity of rocky intertidal shelled mollusks and other planktonic invertebrates when cytochrome b (Cyt b) was used: bp = DNA base pairs used for the analyses, ND6 = NADH dehydrogenase subunit 6, and COI = cytochrome c oxidase subunit I.

Table 1. Comparación de diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π) de moluscos intermareales y otras especies de invertebrados planctónicos cuando se usó el citocromo b (Cyt b) como marcador: bp = pares de bases del ADN usado, ND6 = NADH deshidrogenasa subunidad 6, y COI = citocromo c oxidasa subunidad I.

Species	h	π	Gene	Fragment size (bp)	Development	Reference
<i>Littorina sikkana</i>	0.10	0.0003	Cyt b	414	Direct	Lee and Boulding (2009)
<i>Littorina subrotundata</i>	0.30	0.001	Cyt b	414	Direct	Lee and Boulding (2009)
<i>Littorina scutulata</i>	0.39	0.003	Cyt b	414	Planktonic	Lee and Boulding (2009)
<i>Littorina plena</i>	0.77	0.006	Cyt b	414	Planktonic	Lee and Boulding (2009)
<i>Littorina keenae</i>	0.81	0.003	ND6/Cyt b	762	Planktonic	Lee and Boulding (2007)
<i>Tectarius striatus</i>	0.87	–	Cyt b /COI	482/511	Planktonic	Van den Broeck <i>et al.</i> (2008)
<i>Plicopurpura pansa</i>	0.92	0.004	Cyt b	687	Planktonic	This paper
Cyt b average	0.75	0.0038				
Overall range	0.39–0.92	0.001–0.21				
Overall average	0.785	0.0051				
<i>Cerastoderma edule</i> (bivalve)	0.799	0.0071	Cyt b	305	Planktonic	Martínez <i>et al.</i> (2015)
<i>Rivulus cylindraceus</i> (Pisces)	0.83	0.0118	Cyt b	754	Planktonic	Ponce de León <i>et al.</i> (2014)
<i>Leuresthes tenuis</i> (Pisces)	0.15	0.0004	Cyt b	392	Planktonic	Byrne <i>et al.</i> (2013)
<i>Pseudocalanus minutus</i> (copepod)	0.58	0.0065	Cyt b	163	Holozooplankton	Arbaakke <i>et al.</i> (2014)
<i>Pseudocalanus moultoni</i>	0.76	0.0065	Cyt b	163	Holozooplankton	Arbaakke <i>et al.</i> (2014)
<i>Pseudocalanus elongates</i>	0.40	0.0065	Cyt b	163	Holozooplankton	Arbaakke <i>et al.</i> (2014)
<i>Pseudocalanus acusoes</i>	0.36	0.0022	Cyt b	163	Holozooplankton	Arbaakke <i>et al.</i> (2014)
<i>Pseudocalanus newmani</i>	0.51	0.0034	Cyt b	163	Holozooplankton	Arbaakke <i>et al.</i> (2014)
<i>Mnemiopsis leydii</i> (Ctenophora)	0.70	0.0040	Cyt b	361	Holozooplankton	Bayha <i>et al.</i> (2015)

plankton and are found in the continuous rocky intertidal habitat of the Pacific coast, with only some gaps of sandy beaches in northern Central America (Hurtado et al. 2007), we expected to find ancestral haplotypes in the southern populations and derived haplotypes in the northern populations in its eastern Pacific distribution.

MATERIALS AND METHODS

A total of 219 organisms of *P. pansa* were collected in 2006 from 16 locations on the Pacific coast of Mexico and one in Costa Rica (Fig. 1). Since *P. pansa* shares distribution with *Plicopurpura columellaris* and there seems to be hybridization, we found some individuals with phenotypic characters of both species; however, only those that were pure *P. pansa* were collected. Organisms were collected by hand. A small part of the snail foot was sliced and preserved in 95% ethanol for future genetic analyses.

DNA extraction was conducted using the phenol–chloroform–alcohol method (Palumbi 1996) from a 200-mg tissue sample. A 687-bp DNA fragment of the cytochrome *b* gene was amplified using the primers 14,841 and 15,573 (Anderson et al. 1981). We did not use any other marker because in earlier studies this marker showed enough resolution to identify the genetic and phylogeographic structure in vertebrates and invertebrates (Nicolas et al. 2012, Yong et al. 2015; see Table 1). PCR amplification was performed in a 25- μ L volume containing 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 0.36 μ M of each primer, 1 \times buffer (10 \times buffer contains 500 mM KCl and 100 mM tris HCl [pH 8.3]), 1 unit of Taq, 1 \times BSA, and 50 to 200 ng DNA template. Thermal cycling conditions were the following: initial 1 min of DNA denaturation at 95 °C, followed by 35 cycles of 1 min at 95 °C, 1 min at 50 °C, and 1 min at 72 °C, and then a final extension cycle of 5 min at 72 °C. PCR products were visualized using electrophoresis through a 0.8% low-melting-point agarose gel stained with ethidium bromide. PCR products were cleaned using the QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA). Sequencing reaction was performed in both directions using the ABI PRISM Big-Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to manufacturer recommendations. Sequences were generated in both directions on an ABI 3100-Avant (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) automated DNA sequencer.

Sequence editing and alignment was performed with Sequencher 4.7 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI). For coding regions, alignments were refined by eye to translated sequences to confirm reading frame conservation and checked for premature stop codons. Nucleotide diversity (π) and haplotype diversity (*h*) were estimated with Arlequin 3.11 (Excoffier et al. 2005). Genetic diversity distribution among populations was quantified using analysis of molecular variance (AMOVA; Excoffier et al. 1992) and performed by Arlequin 3.11 (Excoffier et al. 2005). We looked for

por medio de las contracciones del velo, y pueden moverse de las corrientes superficiales a las corrientes submarinas.

En el presente estudio analizamos la estructura genética y filogeográfica de *P. pansa* y los eventos demográficos a lo largo del Pacífico Oriental Tropical. Ya que *P. pansa* surge como resultado del levantamiento del istmo de Panamá (Collins et al. 1996) y que las larvas permanecen mucho tiempo en el plancton y habitan la zona intermareal rocosa casi continua en la costa tropical del Pacífico, con excepción de algunas zonas arenosas en la parte norte de América Central (Hurtado et al. 2007), esperamos encontrar haplotipos ancestrales en las poblaciones sureñas y haplotipos derivados en las poblaciones norteñas de su distribución en el Pacífico oriental.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolectamos un total de 219 individuos de *P. pansa* durante 2006 en 16 localidades en la costa mexicana del Pacífico y una en Costa Rica (Fig. 1). *Plicopurpura pansa* comparte distribución con *Plicopurpura columellaris* y parece haber hibridación entre estas dos especies, ya que hemos encontrado individuos con características fenotípicas de ambas especies; por lo tanto, recolectamos sólo aquellos especímenes que fueran *P. pansa* puros. Los organismos se recolectaron a mano. Una porción pequeña del pie fue desprendida y preservada en etanol al 95% para su posterior análisis en el laboratorio.

El ADN fue extraído de una muestra de tejido de aproximadamente 200 mg mediante el protocolo de fenol–cloroformo–alcohol (Palumbi 1996). Se amplificó un fragmento de ADN de 687 pb del gen del citocromo *b* utilizando los iniciadores 14,841 y 15,573 (Anderson et al. 1981). No utilizamos otro marcador ya que en estudios anteriores este marcador mostró suficiente resolución para identificar la estructura genética y filogeográfica de invertebrados y vertebrados (Nicolas et al. 2012, Yong et al. 2015; ver Tabla 1). La amplificación por PCR se desarrolló en un volumen de 25 μ L con 0.2 mM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, 0.36 μ M de cada iniciador, amortiguador 1 \times (el amortiguador 10 \times contiene 500 mM KCl y 100 mM tris HCl [pH 8.3]), 1 unidad de Taq, BSA 1 \times y de 50 a 200 ng de ADN. Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: una desnaturalización inicial del ADN a 95 °C por 1 min, seguido de 35 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 50 °C y 1 min a 72 °C, y una extensión final de 5 min a 72 °C. Los productos de la PCR se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% teñidos con bromuro de etidio. Los productos de la PCR se limpiaron con el QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Valencia, CA, EUA). Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en ambas direcciones con el kit de secuenciación ABI PRISM Big-Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Las secuencias se generaron en ambas direcciones en un secuenciador automático ABI 3100-Avant (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

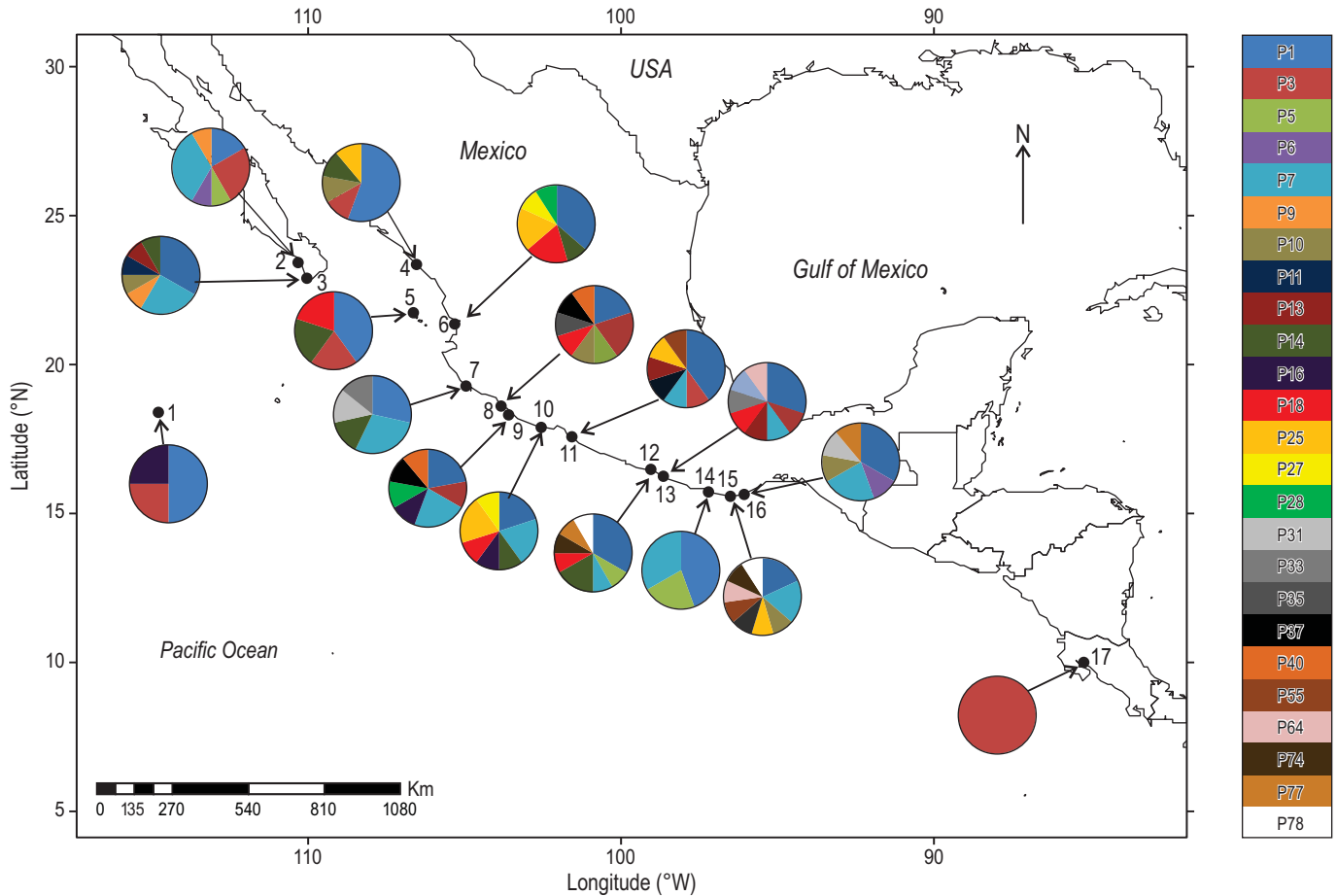


Figure 1. Sample sites and haplotype distribution among populations of *Plicopurpura pansa*. Private alleles are not shown.

Figura 1. Sitios de muestreo y distribución de haplotipos de las poblaciones de *Plicopurpura pansa*. No se muestran los alelos privados.

1. Isla Clarión, 2. Pescadero, 3. Cabo San Lucas, 4. Mazatlán, 5. Isla María Madre, 6. Platanitos, 7. Tenacatita, 8. Faro de Bucerías, 9. San Juan de Alima, 10. Peñitas, 11. Barra de Potosí, 12. Playa Ventura, 13. Punta Maldonado, 14. Carrizalillo, 15. Puerto Ángel, 16. Huatulco, 17. Costa Rica.

differences among populations with pairwise F_{ST} values (taking into consideration each sampling site as a single population) to see how haplotypes related to each other among populations.

A haplotype network was constructed using maximum parsimony and the median-joining algorithm with the software Network (Bandelt et al. 1999). Fu's F_S and Tajima's D tests were performed in order to detect population expansion or constriction with Arlequin 3.11 (Excoffier et al. 2005). We tested the fit of the observed and expected nucleotide site pairwise difference distributions with the constant population model in order to obtain an estimate of initial and final Θ as was calculated for T. Those parameters were necessary to get the population growth-decline model implemented in Arlequin 3.11 (Excoffier et al. 2005). Harpending's raggedness index was calculated to test for goodness of fit of the data in the mismatch analysis.

We analyzed the demographic history of mtDNA clades among the Mexican Pacific coast samples by nested

La edición de las secuencias se llevó a cabo con el programa de computación Sequencher 4.7 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI). Para la codificación de regiones, los alineamientos fueron ajustados visualmente y se tradujeron las secuencias para confirmar que se conservara el marco de lectura y verificar la ausencia de codones de terminación prematuros. La diversidad nucleotídica (π) y diversidad haplotípica (h) fueron estimadas con el paquete Arlequin 3.11 (Excoffier et al. 2005). La distribución de la diversidad genética entre las poblaciones fue cuantificada utilizando un análisis de varianza molecular (AMOVA; Excoffier et al. 1992) en Arlequin 3.11 (Excoffier et al. 2005). Buscamos diferencias entre poblaciones con un análisis por pares de los valores de F_{ST} (tomando a cada sitio de muestreo como una población) para ver cómo se relacionaban los haplotipos entre las poblaciones.

Construimos una red de haplotipos utilizando el método de máxima parsimonia y el algoritmo de unión por medianas (*median joining*) del programa de computación Network

clade analysis (NCA) using ANeCA (Panchal 2007), TCS (Clement et al. 2000), and GeoDis (Posada et al. 2000). To test for geographical barriers in the gene flow, we used Monmonier's algorithm implemented in BARRIER 2.2 (Manni et al. 2004), which includes the Delaunay triangulation (Watson 1992, Brouns et al. 2003) that creates a connectivity network among populations. All statistical analyses were interpreted using $\alpha = 0.05$.

RESULTS

A 687-bp fragment of mitochondrial cytochrome *b* was sequenced from each of the 216 individuals collected along 3,000 km of coastline from Pescadero, Baja California Sur, to Huatulco, Oaxaca (Fig. 1), with an extra 3 samples from Costa Rica. We found a total of 92 haplotypes (GenBank accession numbers KF372880-KF372966 and KF372969-KF372973). The percent average of C was 17.16%, T was 40.59%, A was 24.72%, and G was 17.52%. Variation of C, T, A, and G content among populations was below 0.16%. In the 687-bp fragment we recognized 98 polymorphic sites, of which 46 were informative and 52 were singleton variable sites. Without considering Costa Rica ($h = 0.6$) because of the small sample size, haplotype diversity ranged from 0.87 to 0.98 and nucleotide diversity ranged from 0.002 to 0.06 (Table 2). Twenty-six haplotypes were shared with at least one other population, and 66 were private.

The AMOVA showed that the overall Φ_{ST} result across all samples was -0.004 ($P = 0.6$). When F_{ST} values were examined among pairs of populations, the Clarión Island population was significantly different from 6 of the other 15 Mexican populations studied (Table 3)—the Costa Rica population was not considered here due to the small number of samples. The haplotype network was constructed with TCS since the one done with Network did not show significant differences and we decided to leave the one obtained by NCA. It exhibits two major star-like polytomies with two central high frequency haplotypes (haplotypes P1, $n = 47$, and P7, $n = 23$; Fig. 2). Fu's F_S test for all sites showed negative and significant results (Table 2), as we expected for populations that have undergone recent demographic changes in ecological times. The mismatch distribution analysis showed a unimodal representation for all populations (Fig. 3), fitting to the sudden expansion model concordance with a raggedness index ($r = 0.0128$, $P = 0.85$).

Four levels were present in the mtDNA haplotype NCA of *P. pansa* (Fig. 2). Of the 92 haplotypes, 38 were first step clades, 16 second step clades, 7 third step clades, 3 fourth step clades, and 1 fifth step clade (total haplotype network, Fig. 2). Three of all the clades presented restricted gene flow with isolation by distance; these were 1-11, 2-11, and 3-3. The total haplotype network showed a contiguous range expansion.

Our analyses conducted with BARRIER 2.2 showed four barriers when F_{ST} and G_{ST} data were used. The results

(Bandelt et al. 1999). Se obtuvieron los valores de F_S de Fu y D de Tajima para detectar expansión o contracción poblacional con Arlequin 3.11 (Excoffier et al. 2005). Probamos el ajuste de las diferencias en la distribución entre pares de nucleótidos con el modelo 'constante poblacional' para obtener una Θ inicial y final, así como valores de T. Estos parámetros fueron necesarios para correr el modelo de crecimiento-declive de la población implementado en Arlequin 3.11 (Excoffier et al. 2005). Calculamos el índice de irregularidad (*raggedness*) de Harpending para probar el ajuste de los datos del análisis de diferencias pareadas.

Analizamos la historia demográfica de los clados del ADNmt entre las muestras del Pacífico mexicano con un análisis de clados anidados (NCA por sus siglas en inglés) con la ayuda de ANeCA (Panchal 2007), TCS (Clement et al. 2000) y GeoDis (Posada et al. 2000). Para probar las barreras al flujo de genes, utilizamos el algoritmo de Monmonier implementado en BARRIER 2.2 (Manni et al. 2004), el cual incluye una triangulación de Delaunay (Watson 1992, Brouns et al. 2003) que crea una red de conexiones entre las poblaciones. Todos los análisis estadísticos se interpretaron con un $\alpha = 0.05$

RESULTADOS

Secuenciamos un fragmento de 687 pb del gen del citocromo *b* de cada uno de los 216 individuos recolectados a lo largo de 3,000 km de la línea de costa de México, desde Pescadero, Baja California Sur, hasta Huatulco, Oaxaca (Fig. 1), además de 3 muestras de Costa Rica. Encontramos 92 haplotipos (números de acceso del GenBank KF372880-KF372966 y KF372969-KF372973). El promedio del porcentaje para C fue 17.16%, para T fue 40.59%, para A fue 24.72% y para G fue 17.52%. La variación del contenido de C, T, A y G entre las poblaciones estuvo por debajo del 0.16%. Se obtuvieron 98 sitios polimórficos, de los cuales 46 fueron informativos y 52 fueron portadores de mutaciones únicas. Sin considerar las muestras de Costa Rica ($h = 0.6$), debido a que eran pocas, la diversidad haplotípica estuvo entre 0.87 y 0.98 y la diversidad nucleotídica varió entre 0.002 y 0.06 (Tabla 2). Veintiséis haplotipos se compartieron en al menos un par de poblaciones, y 66 se observaron en una sola población.

El AMOVA mostró que el valor de Φ_{ST} para todas las poblaciones fue de -0.004 ($P = 0.6$). Cuando se examinaron los valores de F_{ST} entre pares de poblaciones, la población de isla Clarión difirió significativamente de 6 de las 15 poblaciones (Tabla 3); Costa Rica no fue considerada en esta parte del análisis debido al bajo número de muestras. La red de haplotipos que se presenta es la que se construyó en TCS, ya que la que obtuvimos con Network no presentó diferencias significativas y decidimos dejar la que obtuvimos mediante el NCA. La red muestra dos politomías principales con dos haplotipos centrales con alta frecuencia (haplotipos P1, $n = 47$, y P7, $n = 23$; Fig. 2). La F_S de Fu para todas las muestras presentó un valor negativo y significativo (Tabla 2),

Table 2. Genetic diversity of *Plicopurpura pansa* along the Mexican Pacific coast: n = sample size, H = number of haplotypes per site, h = haplotype diversity, π = nucleotide diversity, D = Tajima's D , and F_S = Fu's F_S .**Tabla 2.** Diversidad genética de *Plicopurpura pansa* a lo largo de la costa del Pacífico mexicano: n = tamaño de muestra, H = número de haplotipos por sitio, h = diversidad haplotípica, π = diversidad nucleotídica, D = D de Tajima y F_S = F_S de Fu.

Region	Population	n	H	h	π	D	F_S
North						-1.7, $P = 0.003$	-26.26, $P = 0.00$
	Cabo San Lucas	14	9	0.90	0.0037		
	Pescadero	15	9	0.90	0.0043		
	Isla Clarión	5	4	0.90	0.0026		
	Mazatlán	13	9	0.87	0.0043		
	Isla María Madre	7	6	0.95	0.0053		
	Platanitos	14	9	0.91	0.0051		
	Tenacatita	9	7	0.94	0.0044		
	Faro	13	11	0.97	0.0057		
	San Juan de Alima	16	14	0.98	0.0061		
Total		106	47	0.92	0.005		
South						-2.32, $P = 0.00$	-25.72, $P = 0.00$
	Peñitas	15	12	0.97	0.0051		
	Barra de Potosí	17	14	0.96	0.0054		
	Punta Maldonado	19	17	0.98	0.0061		
	Playa Ventura	17	13	0.95	0.0055		
	Carrizalillo	15	13	0.98	0.0057		
	Puerto Ángel	14	8	0.89	0.0044		
	Huatulco	13	12	0.95	0.005		
	Costa Rica	3	2	0.67	0.001		
Total		115	64	0.95	0.006		

obtained with F_{ST} and G_{ST} show differences in grouping northern populations (from San Juan de Alima to Pescadero), and both show one group for the southern populations (Fig. 4).

DISCUSSION

Rocky intertidal gastropods show different patterns of genetic diversity depending on the time larvae spend as plankton (Crandall et al. 2008, Díaz-Ferguson et al. 2012, Haupt et al. 2013) or if they are direct developers (Ayre et al. 2009, Cox et al. 2014). However, there tends to be higher haplotype and nucleotide diversity in species that have free-living larvae compared with those that have direct-developing larvae (Table 1). Our data suggest that the studied populations of *P. pansa* are undergoing expansion. We did not find any phylogeographic or genetic structure among the populations sampled. Overall results may be explained by a recent genetic bottleneck event or by a founder effect (Grant and Bowen 1998, Avise 2000).

There are reports of medium haplotype diversity (using other markers) in other neogastropod species including *Mexacanthina lugubris* (Fenberg et al. 2014), *Megastraea unduosa* (Haupt et al. 2013), and *Conus sanguinolentus* (Duda et al. 2012). *Morula marginalba* and *Haustrum vinosa*

como se espera para poblaciones que han pasado por cambios demográficos recientes en tiempos ecológicos. El análisis de la distribución de diferencias pareadas mostró una representación unimodal para todas las poblaciones (Fig. 3), la cual se ajustó al modelo de expansión de acuerdo con el índice de irregularidad ($r = 0.0128$, $P = 0.85$).

El NCA para *P. pansa* mostró cuatro niveles presentes en la red de haplotipos (Fig. 2). De los 92 haplotipos, 38 fueron clados de primer nivel, 16 de segundo nivel, 7 de tercer nivel, 3 de cuarto nivel y 1 de quinto nivel. Tres de los clados presentaron flujo de genes restringido con aislamiento por distancia; éstos fueron 1-11, 2-11 y 3-3. La red de haplotipos en general mostró expansión contigua.

El análisis realizado con BARRIER 2.2 mostró cuatro posibles barreras con datos de F_{ST} y G_{ST} . Los resultados obtenidos con F_{ST} y G_{ST} presentaron una diferencia de agrupamiento en las poblaciones del norte (de San Juan de Alima a Pescadero), y con ambos datos se forma un solo grupo en el sur del área muestreada (Fig. 4).

DISCUSIÓN

La distribución de la diversidad genética de los gasterópodos de la zona intermareal rocosa presenta diferentes patrones dependiendo del tipo de desarrollo que tengan las

Table 3. F_{ST} pairwise difference. Bold face = significant F_{ST} value.

Tabla 3. Diferencia por pares de poblaciones de F_{ST} . Valores en negritas = F_{ST} significativo.

1. Cabo San Lucas, 2. Pescadero, 3. Platanitos, 4. Mazatlán, 5. Isla María, 6. Isla Clarión, 7. Faro de Bucerías, 8. Tenacatita, 9. San Juan de Alima, 10. Peñitas, 11. Barra de Potosí, 12. Punta Maldonado, 13. Playa Ventura, 14. Puerto Ángel, 15. Carrizalillo, 16. Huatulco.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	0.00														
2	0.06	0.00													
3	0.10	-0.02	0.00												
4	0.08	-0.03	-0.05	0.00											
5	-0.04	-0.03	-0.02	-0.03	0.00										
6	0.42	0.17	0.11	0.15	0.25	0.00									
7	0.13	-0.01	-0.03	-0.02	0.00	0.02	0.00								
8	-0.03	0.02	0.05	0.03	-0.07	0.35	0.08	0.00							
9	0.07	-0.03	-0.02	-0.03	-0.02	0.06	-0.04	0.04	0.00						
10	0.05	-0.04	-0.04	-0.04	-0.04	0.13	-0.01	0.01	-0.03	0.00					
11	0.04	-0.03	-0.04	-0.04	-0.04	0.14	-0.01	0.01	-0.02	-0.04	0.00				
12	0.06	-0.03	-0.03	-0.03	-0.02	0.08	-0.03	0.02	-0.03	-0.03	-0.02	0.00			
13	0.01	-0.04	-0.02	-0.03	-0.06	0.16	-0.01	-0.02	-0.03	-0.04	-0.03	-0.03	0.00		
14	0.08	-0.03	-0.02	-0.03	0.00	0.15	-0.02	0.03	-0.03	-0.02	-0.03	-0.04	-0.03	0.00	
15	0.01	-0.02	-0.01	-0.03	-0.04	0.19	0.01	-0.02	-0.01	-0.02	-0.03	-0.02	-0.04	-0.02	0.00
16	0.05	-0.03	-0.02	-0.03	-0.02	0.18	-0.01	0.00	-0.03	-0.03	-0.03	-0.03	-0.04	-0.03	-0.03

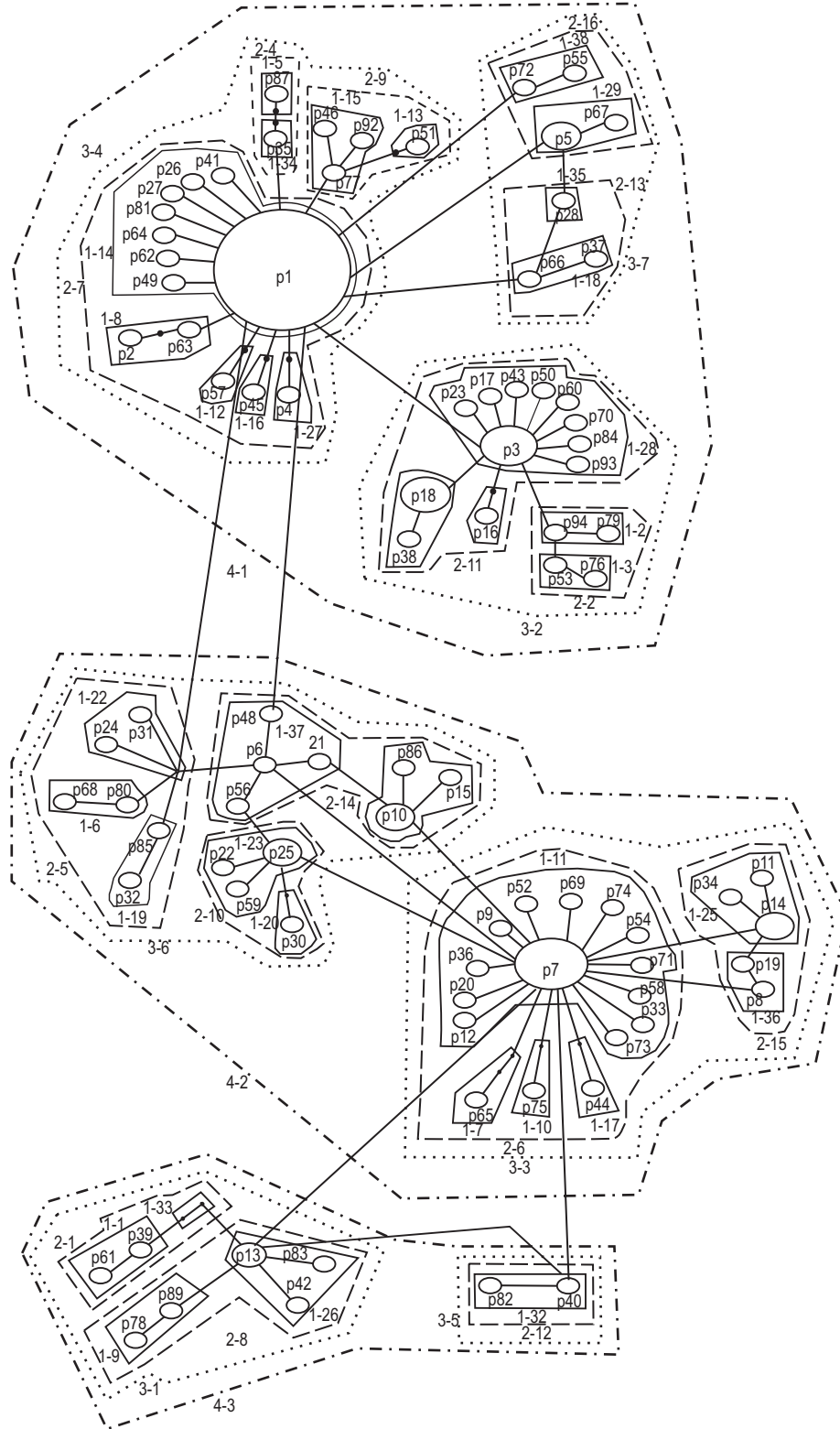


Figure 2. Haplotype network and corresponding nested design from the cytochrome *b* gene haplotypes of *Plicopurpura pansa*. The numbers “1-*n*”, “2-*n*”, “3-*n*”, and “4-*n*” are the numbers for the four different step clades.

Figura 2. Red de haplotipos y el correspondiente diseño anidado del citocromo *b* para los haplotipos de *Plicopurpura pansa*. Los números “1-*n*”, “2-*n*”, “3-*n*” y “4-*n*” son los números para las cuatro etapas de los clados.

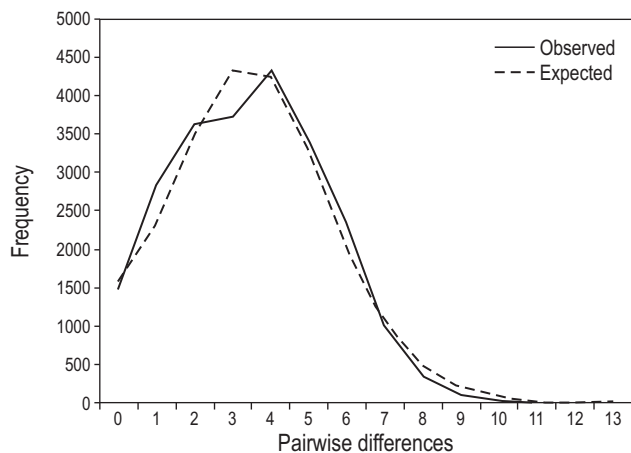


Figure 3. Mismatch distribution analysis according to a population growth scenario for all populations.

Figura 3. Análisis de la distribución de diferencias pareadas de acuerdo con un escenario de crecimiento poblacional para todas las poblaciones.

(Ayre et al. 2009) showed higher values of haplotype diversity despite showing direct development.

One clue of genetic diversity trends in rocky intertidal neogastropods can be elucidated from a study by Cox et al. (2014) on the phylogeography of *N. lima* on the east and west coasts of the northern Pacific Ocean. Western populations of *N. lima* showed low haplotype and nucleotide diversity, whereas eastern populations showed high haplotype and nucleotide diversity. This species is a direct developer and is not as highly affected by ocean currents as planktonic species. The western and eastern *N. lima* populations were isolated by the last glacial period and the eastern population experienced a severe bottleneck. The *P. pansa* populations on the Mexican Pacific coast seem to respond in a similar way to the eastern *N. lima* populations due to the effect of gyres and eddies that return the drifting larvae to the beaches where they hatched.

A clear relationship between phylogeographic structure and larval type (and duration) seems to be elusive; however, the lack of genetic structure in our study area along the Mexican Pacific coast may be directly related to ocean currents, which points toward the founder effect hypothesis. Around Clarión Island, whose population differed from 6 of all the Mexican populations studied, currents flow offshore most of the year. Another example is the Tehuantepec Bowl, which may keep all the sample sites along the Mexican Pacific coast in contact since it extends northwards from Oaxaca to Nayarit (Kessler 2006).

The presence of one of the two haplotypes found in Costa Rica that is not found in Mexico might be a result of the presence of an eddy in the Gulf of Tehuantepec and another in the Gulf of Papagayo in Costa Rica. This may prevent the migration of larvae to the north and it may transport the

especies, ya sea que presenten larvas planctónicas (Crandall et al. 2008, Díaz-Ferguson et al. 2012, Haupt et al. 2013) o larvas con desarrollo directo (Ayre et al. 2009, Cox et al. 2014). Sin embargo, hay cierta tendencia hacia una mayor diversidad tanto nucleotídica como haplotípica en especies que presentan larvas de vida libre comparadas con aquellas que presentan larvas con desarrollo directo (Tabla 1). Nuestros datos sugieren que las poblaciones de *P. pansa* estudiadas están en proceso de expansión. No encontramos estructura genética ni filogeográfica entre las poblaciones muestreadas. Los resultados obtenidos se pueden explicar por un evento de cuello de botella reciente o por un efecto fundador (Grant y Bowen 1998, Avise 2000).

Existen reportes sobre otros neogasterópodos con diversidad haplotípica media, los cuales incluyen a *Mexacanthina lugubris* (Fenberg et al. 2014), *Megastraea unduosa* (Haupt et al. 2013) y *Conus sanguinolentus* (Duda et al. 2012). Por otro lado, *Morula marginalba* y *Haustrum vinosa* (Ayre et al. 2009) mostraron valores altos de diversidad haplotípica, a pesar de que presentan desarrollo directo.

Una pista de las tendencias de la diversidad genética entre los neogasterópodos de la zona intermareal rocosa se encuentra en el estudio de Cox et al. (2014) sobre la filogeografía de *N. lima* en las costas este y oeste del Pacífico Norte. Estos autores encontraron que las poblaciones de *N. lima* del oeste mostraron baja diversidad haplotípica y nucleotídica, pero las poblaciones del este mostraron mayor diversidad haplotípica y nucleotídica. Esta especie presenta un desarrollo directo y no es afectada por las corrientes marinas tanto como las especies con larva planctónica. Las poblaciones estuvieron aisladas por el último periodo glacial, el cual provocó un cuello de botella en las poblaciones del este. Las poblaciones de *P. pansa* en el Pacífico mexicano parecen responder de la misma manera que las poblaciones de *N. lima* del este, pero por el efecto de los giros y remolinos que desvían a las larvas mar adentro y las regresan a sus playas de nacimiento.

No es clara la relación entre la estructura filogeográfica y el tipo de larva (y su duración); sin embargo, la ausencia de estructura genética en nuestra área de estudio, a lo largo del Pacífico mexicano, puede estar relacionada con las corrientes oceánicas, lo cual apunta hacia la hipótesis del efecto fundador. Las corrientes fluyen hacia mar adentro la mayor parte del año alrededor de la isla Clarión, donde la población presentó diferencias con 6 de las poblaciones mexicanas estudiadas. Otro ejemplo es la corriente que corre desde Oaxaca hasta Nayarit y regresa a Oaxaca (Kessler 2006), que puede mantener en contacto las poblaciones de esa parte de la costa mexicana del Pacífico.

La presencia de uno de los dos haplotipos encontrados en Costa Rica que no se encuentra en México puede ser el resultado de la presencia de un remolino en el golfo de Tehuantepec y otro en el golfo de Papagayos en Costa Rica. Los remolinos pueden prevenir la migración de las larvas hacia el norte y llevar las larvas hasta 1,000 km mar adentro (Trasviña et al. 1995, Filonov y Trasviña 2000, López-Calderón et al.

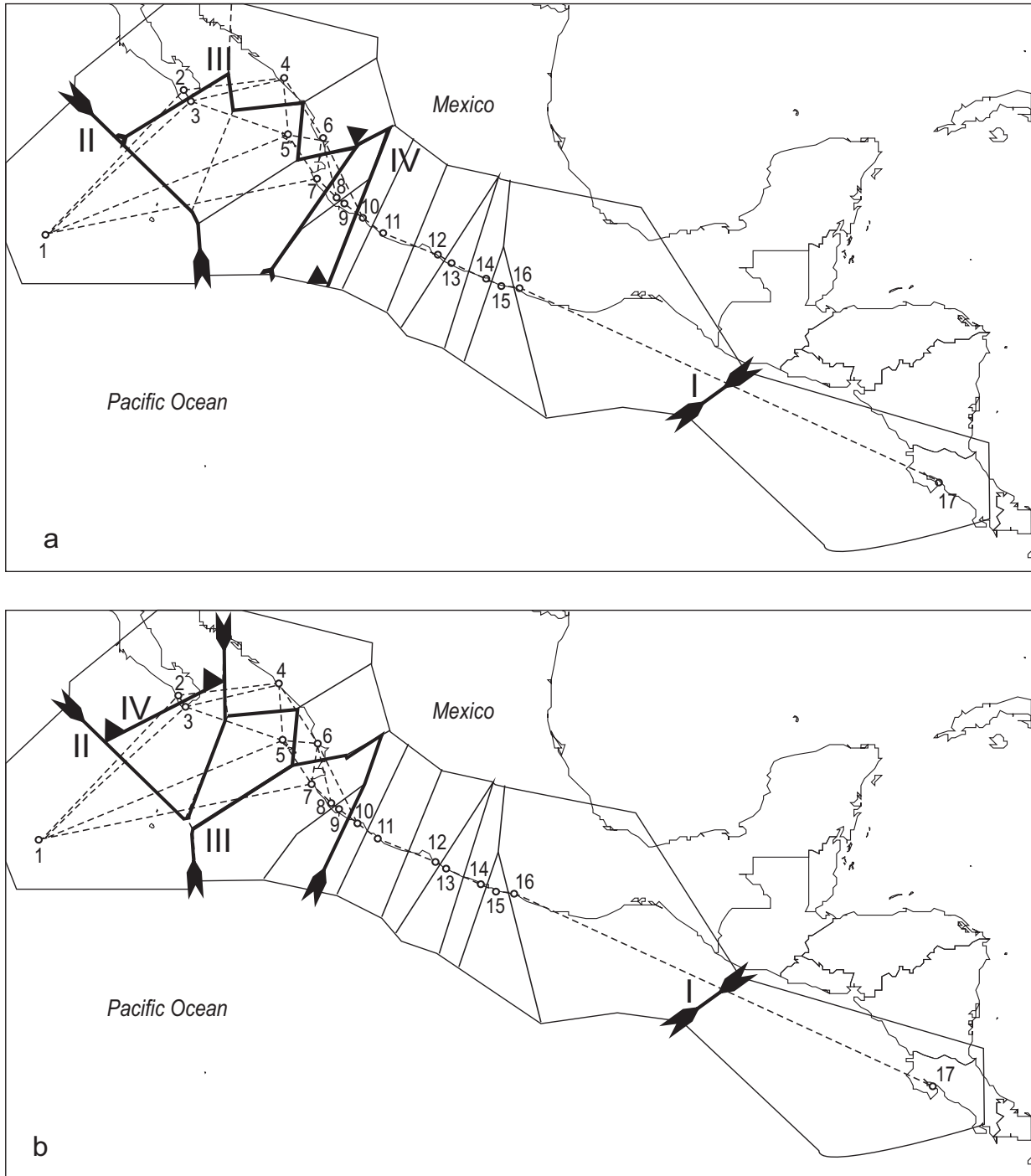


Figure 4. Delaunay triangulated connectivity network of the sample sites with Voronoi tessellations built with the BARRIER 2.2 software. Bold lines represent the four probable barriers to gene flow (decreasing probability from I to IV) as detected with Monmonier's maximum difference algorithm from F_{ST} (a) and G_{ST} (b).

Figura 4. Red de conectividad por triangulación de Delaunay para los sitios de muestreo con un teselado de Voronoi construida con BARRIER 2.2. Las líneas gruesas representan las cuatro barreras probables en el flujo génico (la probabilidad decrece de I a IV) como fue detectado con la máxima diferencia del algoritmo de Monmonier por medio de F_{ST} (a) y G_{ST} (b).

1. Isla Clarión, 2. Pescadero, 3. Cabo San Lucas, 4 Mazatlán, 5. Isla María Madre, 6. Platanitos, 7. Tenacatita, 8. Faro de Bucerías, 9. San Juan de Alima, 10. Peñitas, 11. Barra de Potosí, 12. Playa Ventura, 13. Punta Maldonado, 14. Carrizalillo, 15. Puerto Ángel, 16. Huatulco, 17. Costa Rica.

larvae westward more than 1,000 km offshore (Trasviña et al. 1995, Filonov and Trasviña 2000, López-Calderón et al. 2006). Eddies and gyres can act as barriers for the rest of the populations by keeping larvae close to the hatching beach. Furthermore, larvae would have to overcome the large sandy-beach gap, about 1,200 km long, between El Salvador and southern Oaxaca (Hurtado et al. 2007) to reach the closest rocky shore in Huatulco, Oaxaca, a journey that could take the larvae almost a year with an average current speed of 1 m s^{-1} .

The distribution of *P. pansa* along Mexican shores apparently occurred after the rise of the Isthmus of Panama (Barco et al. 2010, Claremont et al. 2013). After the breakup of the ocean, the change of currents promoted the movement of tropical waters off Panama to northern waters (Coates 1997). The presence of one haplotype in Costa Rica and in 6 populations from Mexico (Fig. 1) indicates a putative ancient haplotype spreading among Mexican populations. However, more samples from Central America are needed to identify a haplotype succession from south to north. Nonetheless, the genetic diversity of the Mexican *P. pansa* population studied was driven by a founder effect or by a bottleneck process due to barriers in Central America and the Isthmus of Tehuantepec. The lack of structure between samples and the high haplotype and nucleotide diversity could be related to the fact that long-lived planktonic larvae of *P. pansa* are distributed by ocean currents in Costa Rica and Tehuantepec.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the National Council for Science and Technology (CONACYT, Mexico) for the scholarship granted to FJLC.

REFERENCES

- Arbaakke ONS, Bucklin A, Halsband C, Norrbin F. 2014. Comparative phylogeography and demographic history of five sibling species of *Pseudocalanus* (Copepoda: Calanoidea) in the North Atlantic Ocean. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 461: 479–488.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell G, De Bruijn HL, Coulson AR, Drouini J, Eperond IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schiriera PH, Smith AJH, Staden R, Young IGY. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457–465.
- Avisé JC. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Ayre DJ, Minchinton TE, Perrin C. 2009. Does life history predict past and current connectivity for rocky intertidal invertebrates across a marine biogeographic barrier? *Mol. Ecol.* 18: 1887–1903.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16: 37–48.
- Barco A, Claremont M, Reid DG, Houart R, Bouchet P, Williams ST, Craud C, Couloux A, Oliverio M. 2010. A molecular phylogenetic framework for the Murcidae, a diverse family of carnivorous gastropods. *Mol. Phylogenet. Evol.* 56: 1025–1039.
- 2006). Los giros y los remolinos pueden funcionar como barreras entre las poblaciones al mantener a las larvas cerca de las playas donde nacieron. Además, las larvas tendrían que atravesar una zona de playa arenosa de aproximadamente 1,200 km desde el litoral del sur de Oaxaca hasta El Salvador (Hurtado et al. 2007) para alcanzar la playa rocosa más cercana en Huatulco, Oaxaca. Dicho viaje le llevaría a las larvas casi un año con una velocidad de corriente de 1 m s^{-1} .
- La distribución de *P. pansa* en las costas de México aparentemente ocurrió después del levantamiento del istmo de Panamá (Barco et al. 2010, Claremont et al. 2013). Después del cierre del océano, el cambio de las corrientes marinas promovió la invasión de las aguas tropicales frente a Panamá hacia el norte (Coates 1997). La presencia de un haplotipo en la población de Costa Rica y en 6 poblaciones de México (Fig. 1) es indicio de un posible haplotipo ancestral disperso en las poblaciones mexicanas. Sin embargo, es necesario ampliar el número de muestras de Centro América para identificar la sucesión de haplotipos de sur a norte. No obstante, nuestros resultados indican que la diversidad genética de *P. pansa* en las poblaciones mexicanas muestreadas fue definida por un efecto fundador o por un cuello de botella, debido a las barreras presentes en Centro América y el istmo de Tehuantepec. La ausencia de estructura entre las muestras y la alta diversidad haplotípica y nucleotídica pudieran estar relacionadas con el hecho de que las larvas planctónicas de *P. pansa* son dispersadas por corrientes oceánicas de Costa Rica y Tehuantepec.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) la beca de posgrado otorgada a FJLC.

- Bayha KM, Chang MH, Mariani CL, Richardson JL, Edwards DL, Deboer TS, Moseley C, Aksoy E, Decker MB, Gaffney PM, Harbison GR, McDonald JH, Caccone A. 2015. Worldwide phylogeography of the invasive ctenophore *Mnemiopsis leidyi* (Ctenophora) based on nuclear and mitochondrial DNA data. *Biol. Invasions* 17: 827–850.
- Byrne RJ, Bernardi G, Avisé JC. 2013. Spatiotemporal genetic structure in a protected marine fish, the California grunion (*Leuresthes tenuis*), and relatedness in the genus *Leuresthes*. *J. Hered.* 104: 521–531.
- Brouns G, De Wulf A, Constaes D. 2003. Delaunay triangulation algorithms useful for multibeam echosounding. *J. Surv. Eng.-Asce* 129(2): 79–84.
- Castillo-Rodríguez ZG, Amezcua-Linares F. 1992. Biología y aprovechamiento del caracol morado *Plicopurpura pansa* (Gould 1883) (Gastropoda: Neogastropoda) en la costa de Oaxaca, México. *An. Inst. Cienc. Mar Limnol. Univ. Nac. Aut. México* 19: 223–234.
- Chávez EA, Michel JE. 2006. Strategies for sustainable dye harvest of the purple conch *Plicopurpura pansa* (Gould, 1853) from west central Mexico. *Am. Malacol. Bull.* 21: 51–57.

- Claremont M, Vermeij GJ, Williams ST, Reid DG. 2013. Global phylogeny and new classification of the Rapaninae (Gastropoda: Muricidae), dominant molluscan predators on tropical rocky seashores. *Mol. Phylogenet. Evol.* 66: 91–102.
- Clement M, Posada D, Crandall KA. 2000. TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* 9: 1657–1659.
- Coates AG. 1997. The forgoing of Central America. In: Coates AG (ed.), *Central America. A Natural and Cultural History*. Yale University Press, Ann Arbor, MI, pp. 1–37.
- Collins TM, Frazer A, Palmer AR, Vermeij GJ, Brown WM. 1996. Evolutionary history of northern hemisphere *Nucella* (Gastropoda, Muricidae): Molecular, morphological, ecological and paleontological evidence. *Evolution* 50: 2287–2304.
- Cox LN, Zaslavskaya NI, Marko PB. 2014. Phylogeography and trans-Pacific divergence of the rocky shore gastropod *Nucella lima*. *J. Biogeogr.* 41: 615–627.
- Crandall ED, Frey MA, Grosberg RK, Barber PH. 2008. Contrasting demographic history and phylogeographic patterns in two Indo-Pacific gastropods. *Mol. Ecol.* 17: 611–626.
- Díaz-Ferguson E, Haney RA, Wares JP, Silliman BR. 2012. Genetic structure and connectivity patterns of two Caribbean rocky intertidal gastropods. *J. Molluscan Stud.* 78: 112–118.
- Duda TF, Terbio M, Chen G, Phillips S, Olenzek AM, Chang D, Morris DW. 2012. Patterns of population structure and historical demography of *Conus* species in the Tropical Pacific. *Am. Malacol. Bull.* 30: 175–187.
- Elligson RA, Krug PJ. 2006. Evolution of poecilogony from planktotrophy: Cryptic speciation, phylogeography, and larval development in the gastropod genus *Alderia*. *Evolution* 60: 2293–2310.
- Espinoza F, Morey-Rubio C, Nakano T. 2015. Phylogeographical pattern of the gastropod *Siphonaria pectinata* (Linnaeus, 1758). *Marine Ecology* <http://onlinelibrary.wiley.com>. <http://dx.doi.org/10.1111/maec.12263>
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform.* 1: 47–50.
- Excoffier L, Smouse P, Quattro J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479–491.
- Fenberg PB, Posbic K, Hellberg ME. 2014. Historical and recent processes shaping the geographic range of a rocky intertidal gastropod: Phylogeography, ecology and habitat availability. *Ecol. Evol.* 4: 3244–3255.
- Filonov AE, Trasviña A. 2000. Internal waves in the continental shelf of the Gulf of Tehuantepec, Mexico. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 50: 531–548.
- Grant WS, Bowen BW. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *J. Hered.* 89: 415–426.
- Haupt AJ, Micheli F, Palumbi SR. 2013. Dispersal at a snail's pace: Historical processes affect contemporary genetic structure in the exploited wavy top snail (*Megastrea undosa*). *J. Hered.* 104: 327–340.
- Hurtado LA, Frey M, Gaube P, Pfeiler E, Markow TA. 2007. Geographical subdivision, demographic history and gene flow in two sympatric species of intertidal snails, *Nerita scabricosta* and *Nerita funiculata*, from the tropical eastern Pacific. *Mar. Biol.* 151: 1863–1873.
- Keen AM. 1971. *Sea Shells of Tropical West America: Marine Mollusks from Baja California Sur to Peru*. 2nd ed. Stanford University Press, CA, 1080 pp.
- Kessler WS. 2006. The circulation of the eastern tropical Pacific: A review. *Prog. Oceanogr.* 69: 181–217.
- Kirkendall LA, Meyer CP. 2004. Phylogeography of the *Patelloida profunda* group (Gastropoda: Lottidae): Diversification in a dispersal-driven marine system. *Mol. Ecol.* 13: 2749–2762.
- Kurihara T. 2007. Spatiotemporal variation in rocky intertidal malacofauna throughout Japan in the 1970's and 1980's. *Mar. Biol.* 153: 61–70.
- Lee HJ, Boulding EG. 2007. Mitochondrial DNA variation in space and time in the northeastern Pacific gastropod, *Littorina keenae*. *Mol. Ecol.* 16: 3084–3103.
- Lee HJ, Boulding EG. 2009. Spatial and temporal population genetic structure of four northeastern Pacific littorinid gastropods: The effect of mode of larval development on variation at one mitochondrial and two nuclear DNA markers. *Mol. Ecol.* 18: 2165–2184.
- López-Calderón J, Manzo-Monroy H, Santamaría-del-Ángel E, Castro R, González-Silvera A, Millán-Núñez R. 2006. Mesoscale variability of the Mexican Tropical Pacific using TOPEX and SeaWiFS data = Variabilidad de mesoescala del Pacífico tropical mexicano mediante datos de los sensores TOPEX y SeaWiFS. *Cienc. Mar.* 32: 539–549.
- Manni F, Guerard E, Heyer E. 2004. Geographic patterns of genetic, morphologic, linguistic variation: How barriers can be detected by using Monmonier's algorithm. *Hum. Biol.* 76: 173–190.
- Martínez L, Freire R, Arias-Pérez A, Méndez J, Insua A. 2015. Patterns of genetic variation across the distribution range of the cockle *Cerastoderma edule* inferred from microsatellites and mitochondrial DNA. *Mar. Biol.* 162: 1393–1406.
- Nicolas V, Shaeffer B, Missouf AD, Kennis J, Colyn M, Denys C, Tatar D, Cruaud C, Laredo C. 2012. Assessment of three mitochondrial genes (16S, Cytb, CO1) for identifying species in the Proamyni tribe (Rodentia: Muridae). *PLOS One* 7: e36586.
- Núñez JD, Fernández-Iriarte PJ, Ocampo EH, Iudica C, Cledón M. 2015. Deep phylogeographic divergence among populations of limpet *Siphonaria lessoni* on the east and west coasts of South America. *Mar. Biol.* 162: 595–605.
- Ospina-Guerrero P, Landinez-García RM, Rodríguez-Castro DJ, Arango R, Máquez E. 2008. Genetic connectivity of *Stegastes partitus* in the South Caribbean evidenced by microsatellite analysis = Conectividad genética de *Stegastes partitus* en el Caribe Sur evidenciada por análisis microsatélite. *Cienc. Mar.* 34(2): 155–163.
- Palumbi SR. 1996. Nucleic acids II: The polymerase chain reaction. In: Hillis DM, Moritz C, Mable BK (eds.), *Molecular Systematics*. 2nd ed. Sinauer, Sunderland, MA, pp. 205–247.
- Panchal M. 2007. The automation of nested clade phylogeographic analysis. *Bioinformatics* 23: 509–510.
- Paulay G, Meyer C. 2006. Dispersal and divergence across the greatest ocean region: Do larva matter? *Integr. Comp. Biol.* 46: 269–281.
- Ponce De León JL, León G, Rodríguez R, Metcalfe CJ, Hernández D, Casane D, García-Machado E. 2014. Phylogeography of the Cuban Rivulus: Evidence for allopatric speciation and secondary dispersal across a marine barrier. *Mol. Phylogenet. Evol.* 79: 404–414.
- Posada D, Crandall KA, Templeton AR. 2000. GeoDis: A program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Mol. Ecol.* 9: 487–488.
- Salas E, Molina-Ureña H, Walter RP, Heath DD. 2010. Local and regional genetic connectivity in a Caribbean coral reef fish. *Mar. Biol.* 157: 437–445.
- Sánchez R, Sepúlveda RD, Brante A, Cárdenas L. 2011. Spatial pattern of genetic and morphological diversity in the direct

- developer *Acanthina monodon* (Gastropoda: Mollusca). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 434: 112–131.
- Trasviña A, Barton ED, Brown J, Velez HS, Kosro PM, Smith SR. 1995. Offshore wind forcing in the Gulf of Tehuantepec, Mexico: The asymmetric circulation. *J. Geophys. Res.* 100: 20649–20663.
- Van den Broeck H, Breugelmans K, De Wolf H, Backeljau T. 2008. Completely disjunct mitochondrial DNA haplotype distribution without a phylogeographic break in a planktonic developing gastropod. *Mar. Biol.* 153: 421–429.
- Watson D. 1992. *Contouring: A Guide to the Analysis and Display of Spatial Data*. Pergamon Press, New York, 340 pp.
- Wiley EO, Lieberman BS. 2011. *Phylogenetics. Theory and Practice of Phylogenetic Systematics*. 2nd ed. Wiley-Blackwell, New Jersey, 432 pp.
- Yong HS, Eamsobhana P, Song SL, Prasartvit A, Lim PE. 2015. Molecular phylogeography of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Angiostrongylidae) and genetic relationships with congeners using cytochrome *b* gene marker. *Acta Trop.* 148: 66–71.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.04.020>

*Received August 2015,
accepted January 2016.*