Ciencias Marinas (2010), 36(2): 199–211

Past exploitation of California sea lions did not lead to a genetic bottleneck in the Gulf of California

La explotación histórica del lobo marino de California no causó un cuello de botella genético en el Golfo de California

M González-Suárez[1, 2, 3], D Aurioles-Gamboa[4], LR Gerber[1]

[1] Ecology, Evolution and Environmental Sciences, School of Life Sciences, Arizona State University, College & University Dr. Tempe, AZ 85287, USA.
[2] Laboratoire d'Ecologie et Evolution CNRS-UMR 7625, Université Pierre et Marie Curie, Case 237, Bâtiment A, 7 Quai St Bernard, 75005 Paris, France.
[3] Current address: Department of Conservation Biology, Estación Biológica de Doñana-CSIC, Avda. Americo Vespucio s/n, 41092 Sevilla, Spain. E-mail: manuela.gonzalez@ebd.csic.es
[4] Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Instituto Politécnico Nacional, Avd. IPN s/n, Col. Playa Palo de Santa Rita, La Paz 23096, Baja California Sur, México.

ABSTRACT. Human exploitation can lead to genetic bottlenecks associated with reduced genetic variability and lower fitness. The population of California sea lions (*Zalophus californianus*) in the Gulf of California, Mexico, was hunted during the 19th and 20th centuries, potentially leading to a genetic bottleneck; however, even exploitation that leads to low population sizes does not always cause genetic bottlenecks. Understanding the genetic consequences of past sea lion hunts is critical to the conservation of the Gulf of California sea lion population, which is currently declining and is genetically distinct from other populations. We used available data from 10 amplified polymorphic microsatellite loci in 355 individuals from six Mexican colonies. Microsatellite data were analyzed using diverse approaches (BOTTLENECK and *M*-ratio) to determine if a genetic bottleneck had occurred. Our results indicate that human exploitation did not cause a genetic bottleneck in the sea lion population of the Gulf of California. Simulation analyses revealed that a reduction in genetic variability would have been detected if fewer than 100 individuals had remained after exploitation. We conclude that past exploitation was not as severe as previously thought and did not cause a genetic bottleneck in the Gulf of California sea lion population. Nevertheless, historical hunts specifically targeted adult males and this sex-biased exploitation may have influenced the population dynamics and overall fitness.

Key words: genetic variability, male-biased exploitation, Pinnipedia, Gulf of California.

RESUMEN. La explotación humana puede causar cuellos de botella genéticos asociados con una variabilidad genética reducida y menor aptitud. La población del lobo marino de California (*Zalophus californianus*) en el Golfo de California, México, fue objeto de una explotación prolongada durante los siglos XIX y XX que pudo haber causado un cuello de botella genético. Sin embargo, la explotación que deriva tamaños poblacionales bajos no siempre causa cuellos de botella genéticos. El conocimiento de las consecuencias genéticas de la caza del lobo marino de California es crítico para la conservación de la población del Golfo de California, que está en declive y es genéticamente distinta de otras poblaciones. En este estudio usamos una base de datos de 10 marcadores polimórficos de microsatélite amplificados en 355 individuos pertenecientes a seis colonias mexicanas. Estos datos fueron analizados con diversos métodos (BOTTLENECK y razón *M*) para determinar si ocurrió un cuello de botella genético. Nuestros resultados indican que la explotación histórica del lobo marino no causó un cuello de botella genético en la población del Golfo de California; sin embargo, las simulaciones sugieren que si la población hubiese sido reducida a menos de 100 individuos sí hubiésemos detectado una reducción de la variabilidad genética. Con base en estos resultados concluimos que la explotación histórica de esta población no fue tan intensa como se pensaba previamente y, por tanto, no causó un cuello de botella genético. No obstante, la explotación se concentró en machos adultos y este sesgo podría haber afectado la dinámica poblacional de estas colonias y su aptitud general.

Palabras clave: variabilidad genética, explotación sesgada hacia machos, Pinnipedia, Golfo de California.

INTRODUCTION

Populations often experience fluctuations in size due to natural or human-induced factors that can lead to bottlenecks, periods in which only a few individuals survive. Bottlenecks that reduce the effective population size can have important demographic and genetic consequences, including an increase in demographic stochasticity and inbreeding rates, as well as a reduction in genetic variation and individual

INTRODUCCIÓN

Algunas poblaciones experimentan fluctuaciones en su tamaño debido a factores naturales o antropogénicos que pueden causar cuellos de botella, periodos en los cuales sólo unos pocos individuos sobreviven. Los cuellos de botella que reducen el tamaño efectivo de la población pueden tener importantes consecuencias demográficas y genéticas, incluyendo un incremento en la estocasticidad demográfica

fitness (Hedrick 1995, Weber *et al.* 2004). For example, the bottlenecked population of the Florida panther, *Puma concolor coryi*, exhibits reduced fitness caused by chryptorchidism (undescended testicles), poor sperm quality, and tail deformities (Roelke *et al.* 1993). Similarly, laboratory studies on mosquitofish, *Gambusia affinis*, have shown that bottlenecks reduce population growth and increase the risk of extinction (Leberg and Firmin 2008). Even populations that have recovered from a bottleneck and are seemingly viable can manifest traits that affect individual fitness, such as skull asymmetry, which could increase vulnerability to extinction (Hoelzel 1999).

The California sea lion, *Zalophus californianus*, is an abundant and widespread otariid that ranges from the Gulf of California to Alaskan waters (Maniscalco *et al.* 2004, Szteren *et al.* 2006). Although precise data are not available, the historical records indicate that this species was hunted in the Gulf of California (hereafter GC) from the 19th to the mid-20th century (Lluch-Belda 1969, Zavala-González and Mellink 2000, Bahre and Bourillón 2002). Hunting of this historically small population (<40,000 individuals, Szteren *et al.* 2006) could have resulted in a loss of genetic diversity, leading to a bottleneck. Although concerns regarding this potential negative effect of past exploitation were already raised four decades ago by Lluch-Belda (1969), to date no studies have analyzed whether past human exploitation did in fact lead to a genetic bottleneck. Understanding if past exploitation reduced genetic variability in the GC sea lion population is important because it is genetically distinct from other populations (González-Suárez *et al.* 2009) and is declining (González-Suárez *et al.* 2006, Szteren *et al.* 2006, Ward *et al.* 2010).

While sea lion populations have shown a steady increase in California waters in recent years (Carretta *et al.* 2007), the population in the GC has declined by >20% in the last decade (Szteren *et al.* 2006). In particular, colonies in the Midriff area, which were more heavily hunted in the past, have the faster rates of decline (Szteren *et al.* 2006, Ward *et al.* 2010). Understanding the genetic effects of past exploitation may help explain the contrasting population trends exhibited by California sea lions in the GC and along the coast of California. Furthermore, human exploitation in the GC focused on adult males because of their higher fat content and the demand for "trimmings" or sexual organs by the Chinese market (Lluch-Belda 1969). Because California sea lion populations are naturally female-biased, with males exhibiting higher mortality rates at almost any age (Hernández-Camacho *et al.* 2008b), the available number of breeding males is generally small compared with breeding females. Therefore, a reduction in male abundance due to hunting could have significantly affected the genetic variability and population dynamics as observed in other species (Harris *et al.* 2002, Milner-Gulland *et al.* 2003). In light of these concerns, it is important to study whether past exploitation led to a genetic bottleneck in the GC sea lion population.

y las tasas de endogamia, así como una reducción en la variación genética y la aptitud (*fitness*) individual (Hedrick 1995, Weber *et al.* 2004). Por ejemplo, la población de la pantera de Florida (*Puma concolor coryi*), sometida a un cuello de botella, muestra una menor aptitud causada por el criptorquidismo (testículos no descendidos), la baja calidad del esperma y deformidades de la cola (Roelke *et al.* 1993). Asimismo, estudios de laboratorio del pez mosquito, *Gambusia affinis*, han indicado que los cuellos de botella reducen el crecimiento de la población y aumentan el peligro de extinción (Leberg y Firmin 2008). Aun las poblaciones que se han recuperado de un cuello de botella y que aparentemente son viables pueden manifestar características que afectan la aptitud individual, tal como la asimetría craneal, que podría incrementar la vulnerabilidad a la extinción (Hoelzel 1999).

El lobo marino de California, *Zalophus californianus*, es un otárido abundante con amplia distribución desde el Golfo de California hasta Alaska (Maniscalco *et al.* 2004, Szteren *et al.* 2006). Aunque se carecen de datos precisos, los registros históricos indican que esta especie fue objeto de caza en el Golfo de California (de aquí en adelante GC) desde el siglo XIX y hasta mediados del siglo XX (Lluch-Belda 1969, Zavala-González y Mellink 2000, Bahre y Bourillón 2002). La explotación de esta población, históricamente pequeña (<40,000 individuos, Szteren *et al.* 2006), podría haber resultado en una pérdida de diversidad genética, causando un cuello de botella. Hace cuatro décadas Lluch-Belda (1969) expresó inquietudes sobre el efecto potencialmente negativo de esta cacería, pero a la fecha no se han realizado estudios para determinar si la explotación humana en realidad causó un cuello de botella genético. Es importante determinar si la explotación histórica redujo la variabilidad en la población de lobos marinos del GC ya que es genéticamente distinta a otras poblaciones (González-Suárez *et al.* 2009) y se encuentra en declive (González-Suárez *et al.* 2006, Szteren *et al.* 2006, Ward *et al.* 2010).

A pesar de que en años recientes las poblaciones de lobos marinos han mostrado un incremento constante en aguas californianas (Carretta *et al.* 2007), la población del GC ha disminuido en >20% en la última década (Szteren *et al.* 2006). En particular, las colonias de la zona de las islas grandes, que fueron sujetas a una mayor explotación en el pasado, presentan las tasas más rápidas de declive (Szteren *et al.* 2006, Ward *et al.* 2010). El conocimiento de las consecuencias genéticas de la explotación histórica podría explicar las diferentes tendencias poblacionales del lobo marino de California en el GC y en la costa de California. Además, la explotación humana en el GC se enfocó en machos adultos debido a su mayor contenido de grasa y a la demanda por los órganos sexuales del mercado chino (Lluch-Belda 1969). Ya que las poblaciones del lobo marino de California están sesgadas hacia las hembras, con los machos mostrando mayores tasas de mortalidad en casi todas las edades (Hernández-Camacho *et al.* 2008b), el número de machos

Genetic bottlenecks can be detected directly comparing genetic variability from samples obtained before and after the population reduction (e.g., Weber *et al.* 2004), but this requires historical and contemporary DNA samples that are rarely available. Alternatively, a genetic bottleneck may be inferred from observed reduction of allelic diversity and statistical analysis of selectively neutral genetic markers such as microsatellites. A group of these statistical analyses, implemented by the BOTTLENECK program (Cornuet and Luikart 1996), compares observed heterozygosity with the expected heterozygosity under a mutation-genetic drift equilibrium. During population reductions (i.e., bottlenecks) rare alleles are often lost quickly through genetic drift because only a few individuals in the population carry them (Hedrick 2005); however, rare alleles contribute relatively little to the expected heterozygosity calculated assuming mutation-genetic drift equilibrium. Therefore, in bottlenecked populations, expected heterozygosity calculated from the observed number of alleles is lower than the actual observed heterozygosity (Cornuet and Luikart 1996). An excess in observed heterozygosity can be used to identify populations that have suffered a genetic bottleneck.

A second approach to infer a past bottleneck from genetic data is based on the *M*-ratio, *k*/*r*, where *k* is the total number of alleles and *r* is the overall range in allele size (Garza and Williamson 2001). When a population is reduced, alleles are lost via genetic drift, but this loss of alleles affects *k* and *r* differently: *k* is reduced with each lost allele, whereas only the loss of the largest or the smallest allele reduces *r*. Therefore, recently reduced populations are expected to have lower *M*-ratios than populations at equilibrium (Garza and Williamson 2001).

The objective of this study was to determine whether past exploitation of the California sea lion reduced genetic variability in the GC population leading to a genetic bottleneck. We used genetic data available from five colonies in the GC and one colony from the Pacific coast of Baja California (data published by González-Suárez *et al.* 2009). To achieve our goal we employed four methods: comparison of allelic diversity between colonies located in the GC (exploited) and along the Pacific coast (presumably unexploited), the mode-shift and Wilcoxon tests implemented by BOTTLENECK, and the *M*-ratio test. In addition, bottleneck scenarios were simulated to explore the conditions under which population reductions are likely to result in a detectable genetic bottleneck. These simulations allow us to determine the magnitude at which past exploitation would have resulted in loss of genetic variability for the California sea lion.

MATERIAL AND METHODS

Data collection and analysis

We used available data from 10 polymorphic microsatellite loci that had been amplified from tissue samples

reproductores disponibles en general es bajo en comparación con el de las hembras reproductoras. Consecuentemente, al igual que en otras especies (Harris *et al.* 2002, Milner-Gulland *et al.* 2003), una reducción en la abundancia de machos debido a la caza podría haber afectado significativamente la variabilidad genética y la dinámica poblacional. Por tanto, es importante estudiar si la explotación histórica causó un cuello de botella genético en la población de lobo marino del GC.

Los cuellos de botella genéticos se pueden detectar directamente comparando la variabilidad genética de muestras obtenidas antes y después de la reducción poblacional (e.g., Weber *et al.* 2004), pero esto requiere de muestras históricas y contemporáneas de ADN que raramente se tienen. Alternativamente, se puede inferir un cuello de botella genético a partir de la reducción observada en la diversidad alélica y de análisis estadísticos de marcadores genéticos selectivamente neutrales, como los microsatélites. Un grupo de estos análisis estadísticos, implementados en el programa BOTTLENECK (Cornuet y Luikart 1996), compara la heterocigosidad observada con la esperada bajo un equilibrio mutación-deriva genética. Durante las reducciones poblacionales (i.e., cuellos de botella) es común que los alelos raros se pierdan rápidamente por deriva genética ya que sólo unos cuantos individuos de la población los tienen (Hedrick 2005); sin embargo, tales alelos contribuyen relativamente poco a la heterocigosidad esperada calculada bajo el supuesto de un equilibrio mutación-deriva genética. Por tanto, en las poblaciones sujetas a un cuello de botella, la heterocigosidad esperada calculada a partir del número de alelos observados es menor que la heterocigosidad observada actual (Cornuet y Luikart 1996). Se puede usar un exceso de heterocigosidad observada para identificar las poblaciones que han sufrido un cuello de botella.

Un segundo método para inferir un cuello de botella en el pasado, a partir de datos genéticos, consiste en utilizar la razón *M*, *k*/*r*, donde *k* es el número total de alelos y *r* es el intervalo total del tamaño alélico (Garza y Williamson 2001). Cuando disminuye una población, los alelos se pierden por deriva genética, pero esta pérdida de alelos afecta estos dos parámetros de forma diferente: *k* se reduce con cada alelo perdido, mientras que *r* se reduce sólo con la pérdida del alelo más grande o más pequeño. De esta forma, se espera que las poblaciones recientemente reducidas presenten razones *M* más bajas que las poblaciones en equilibrio (Garza y Williamson 2001).

El objetivo de este trabajo fue determinar si la explotación histórica del lobo marino de California redujo la variabilidad genética de la población del GC y causó un cuello de botella genético. Se utilizaron datos genéticos disponibles de cinco colonias del GC y una colonia de la costa del Océano Pacífico de Baja California (datos publicados por González-Suárez *et al.* 2009). Para lograr nuestro objetivo se emplearon cuatro métodos: la comparación de la diversidad alélica entre las colonias del GC (explotadas) y la colonia de la costa del

collected from California sea lion pups (young of the year) at six Mexican breeding colonies (fig. 1, table 1). This dataset is deposited in the Dryad Digital Repository (http://hdl.handle.net/10255/dryad.1454) and will become freely available on April 2011. Details of the data collection, DNA extraction, and microsatellite amplification are provided by González-Suárez *et al.* (2009). All loci were in Hardy-Weinberg equilibrium and linkage equilibrium (see results in González-Suárez *et al.* 2009).

To test for indications of a genetic bottleneck, we first used the BOTTLENECK 1.2.02 program (Cornuet and Luikart 1996) considering two mutation models for microsatellites. The infinite allele mutation model and the stepwise mutation model represent the extremes of a continuum of possible mutation models, with microsatellite loci generally following an intermediate two-phase mutation model (TPM) with a high proportion of single-step mutations (DiRienzo *et al.* 1994). We considered two versions of the TPM as the most likely for microsatellites: default TPM and Piry *et al*. TPM. The default TPM assumes 70% single-step and 30% multi-step mutations, with a variance of 30 in the multi-step mutations. The Piry *et al*. TPM assumes 95% single-step and 5% multi-step mutations, with a variance of 12 (Piry *et al.* 1999). For each mutation model, we performed tests for heterozygote excess and deficit using the one-tailed Wilcoxon test (with 10,000 replications) and the mode-shift

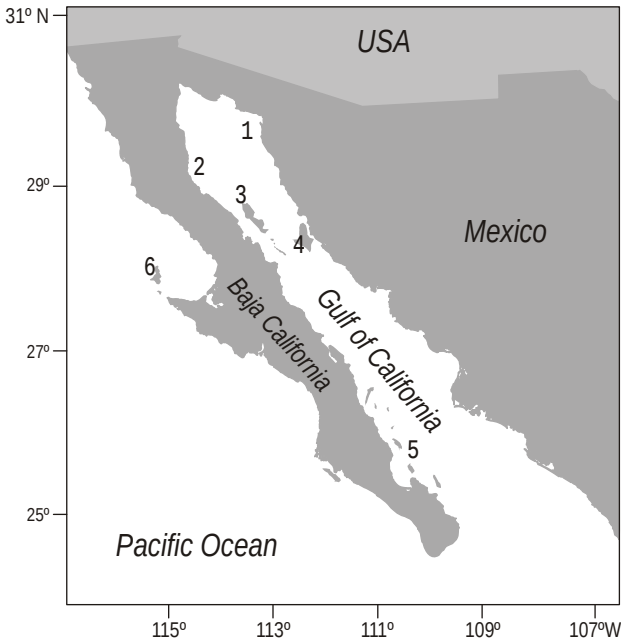

Figure 1. Location of the California sea lion colonies sampled along the Gulf of California and the Pacific coast of the Baja California Peninsula, Mexico.

Figura 1. Localización de las colonias de lobo marino de California estudiadas en el Golfo de California y la costa del Pacífico de la península de Baja California, México.

1. San Jorge, 2. Los Lobos, 3. Granito, 4. San Esteban, 5. Los Islotes, 6. San Benito.

Pacífico (presumiblemente no explotada), las pruebas de cambio modal y Wilcoxon implementadas en el programa BOTTLENECK, y la prueba de la razón *M*. Además, se simularon escenarios de cuellos de botella para explorar las condiciones bajo las cuales las reducciones poblacionales posiblemente ocasionen un cuello de botella genético detectable. Estas simulaciones permiten determinar la magnitud a la cual la explotación histórica hubiese causado una pérdida de la variabilidad genética del lobo marino de California.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección y análisis de datos

Se usaron datos disponibles de 10 marcadores microsatelitales polimórficos que fueron amplificados de muestras de tejido tomadas de crías de lobo marino de California de seis colonias reproductoras de México (fig. 1, tabla 1). Este conjunto de datos se encuentra en el Repositorio Digital de Dryad (http://hdl.handle.net/10255/dryad.1454) y estará libremente disponible a partir de abril de 2011. Los detalles de la recolección de datos, la extracción del ADN y la amplificación de los microsatélites se encuentran en González-Suárez *et al.* (2009). Todos los marcadores estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg y de ligamiento (ver resultados en González-Suárez *et al.* 2009).

Para probar si existían indicaciones de un cuello de botella genético, primero se utilizó el programa BOTTLENECK 1.2.02 (Cornuet y Luikart 1996) considerando dos modelos mutacionales para los microsatélites. El modelo de alelos infinitos y el modelo mutacional por pasos representan los extremos de un continuo de posibles modelos de mutación, con los marcadores microsatelitales generalmente siguiendo un modelo intermedio de mutación de dos fases (TPM por sus siglas en inglés) con una alta proporción de mutaciones unipaso (DiRienzo *et al.* 1994). Se consideraron dos versiones del TPM como las más probables para microsatélites: el TPM por defecto y el de Piry *et al*. El primero asume 70% de mutaciones unipaso y 30% de mutaciones multipaso, con una varianza de 30 en las mutaciones multipaso. El segundo asume 95% de mutaciones unipaso y 5% de mutaciones multipaso, con una varianza de 12 (Piry *et al.* 1999). Para cada modelo de mutación se determinó el exceso y déficit de heterocigotos usando la prueba de Wilcoxon de una cola (con 10,000 réplicas) y la prueba de cambio modal (Piry *et al.* 1999). Estas dos pruebas se realizaron independientemente para cada colonia y también para tres unidades de manejo recientemente definidas (González-Suárez *et al.* 2009): Alto Golfo, representada por las islas San Jorge, Los Lobos, Granito y San Esteban; Baja Sur, representada por la Isla Los Islotes; y Pacífico, representada por la Isla San Benito.

También se utilizaron los programas M_P_VAL y CRITICAL_M para determinar el valor de la razón *M* observada y la razón *M* crítica (M_c). Estos programas requieren tres parámetros que son difíciles de estimar empíricamente: Δ_g

Table 1. Observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosity calculated with the Wilcoxon test results using BOTTLENECK for six colonies of the California sea lion in Mexico; *n* is the sample size. The Wilcoxon test provides the probabilities of heterozygosity excess and deficit under two versions of the two-phase mutation model (TPM).
Tabla 1. Heterocigosidad observada (H_O) y esperada (H_E) calculadas con los resultados de la prueba de Wilcoxon usando el programa BOTTLENECK para seis colonias de lobo marino de California en México; *n* es el tamaño de la muestra. La prueba de Wilcoxon proporciona la probabilidad de exceso y déficit de heterocigosidad bajo dos versiones del modelo de mutación de dos fases (TPM).

Colony or group	*n*	H_O	H_E	Probability			
				Piry *et al.* TPM		Default TPM	
				Excess	Deficit	Excess	Deficit
San Jorge	63	0.687	0.663	0.984	0.042	0.065	0.947
Los Lobos	59	0.675	0.681	0.812	0.216	0.187	0.839
Granito	63	0.683	0.703	0.784	0.246	0.278	0.754
San Esteban	60	0.698	0.689	0.884	0.138	0.065	0.947
Los Islotes	60	0.616	0.645	0.947	0.065	0.539	0.500
San Benito	50	0.688	0.682	0.722	0.312	0.042	0.984
Upper Gulf*	245	0.686	0.690	0.754	0.278	0.053	0.958

* Upper Gulf colonies (San Jorge, Los Lobos, Granito, and San Esteban) grouped together.

test (Piry *et al.* 1999). These two tests were performed on each colony independently, and also considering three recently defined management units (González-Suárez *et al.* 2009): Upper Gulf, represented by the islands of San Jorge, Los Lobos, Granito, and San Esteban; southern Baja, represented by Los Islotes Island; and Pacific, represented by San Benito Island.

We also used the M_P_VAL and CRITICAL_M programs to determine the value of the observed *M*-ratio and the critical *M*-ratio (M_c). These programs require three parameters that are difficult to estimate empirically: Δ_g (average size of multi-step mutations), p_s (proportion of one-step mutations), and θ (= $4N_e\mu$, where N_e is the effective population size and μ is the mutation rate). For Δ_g we used a value of 3.5 as recommended by Garza and Williamson (2001). For comparison with the analysis in BOTTLENECK we used two values for p_s: 0.95 (default TPM) and 0.7 (Piry *et al.* TPM). For analysis of each colony independently we considered two likely values for θ: 0.1 and 1 (Guinand and Scribner 2003); assuming a typical mutation rate, $\mu = 5 \times 10^{-4}$, these values represent effective population sizes of 50 and 500, respectively. These are realistic values considering that the total population sizes, which are larger than effective sizes, at these colonies range from ~400 to ~5700 (Szteren *et al.* 2006). The Upper Gulf group comprises a larger population, thus we considered $\theta = 1$ and 10, equivalent to N_e = 500 and 5000, respectively.

Simulation analyses

The BOTTLESIM 2.6 program is designed to simulate the genetic consequences of bottlenecks and post-bottleneck

(tamaño promedio de mutaciones multipaso), p_s (proporción de mutaciones unipaso) y θ (= $4N_e\mu$, donde N_e es el tamaño efectivo de la población y μ es la tasa de mutación). Para Δ_g se utilizó un valor de 3.5 según lo recomendado por Garza y Williamson (2001). Para su comparación con el análisis en BOTTLENECK se emplearon dos valores para p_s: 0.95 (TPM por defecto) y 0.7 (TPM de Piry *et al.*). Para el análisis independiente de cada colonia se consideraron dos valores probables para θ: 0.1 y 1 (Guinand y Scribner 2003); suponiendo una tasa de mutación típica, $\mu = 5 \times 10^{-4}$, estos valores representan tamaños poblacionales efectivos de 50 y 500, respectivamente. Estos son valores realistas considerando que los tamaños poblacionales totales, que son mayores que los efectivos, de estas colonias varían de ~400 a ~5700 (Szteren *et al.* 2006). El grupo del Alto Golfo comprende una población más grande; por tanto, se consi-deró $\theta = 1$ y 10, equivalente a N_e = 500 y 5000, respectivamente.

Análisis de simulación

El programa BOTTLESIM 2.6 está diseñado para simular las consecuencias genéticas de los cuellos de botella y el crecimiento de la población después de un cuello de botella en especies longevas (Kuo y Janzen 2003). Se usó este programa para explorar las condiciones bajo las cuales la explotación histórica probablemente hubiese causado un cuello de botella genético detectable en la población de lobo marino del GC. Se definió una población inicial con frecuencias alélicas iguales a las frecuencias combinadas de todas las muestras (combinando todas las colonias) para reflejar la variación total en las colonias de lobo marino. También se estudió una población inicial con frecuencias alélicas iguales

population growth in long-lived species (Kuo and Janzen 2003). We used this program to explore the conditions under which past exploitation would have likely resulted in a detectable genetic bottleneck in the GC sea lion population. We defined a founder population with allele frequencies equal to the combined frequencies of all samples (combining all colonies) to reflect overall variability in sea lion colonies. We also explored a founder population with allele frequencies equal to those of the San Benito colony, for which there is no historical record of past exploitation. Results (not shown) were qualitatively the same.

The founder population was started at 20,000 individuals, which is an average value for the entire GC population (Szteren *et al.* 2006). We assumed that 80% of the population are females, to reflect lower survival rates of males (Hernández-Camacho *et al.* 2008b) and a polygynous mating system in which not all adult males reproduce. We defined a 20-year lifespan, sexual maturity at age 5, and fully overlapping generations (Hernández-Camacho *et al.* 2008a, 2008b). Although these assumptions regarding the species biology were realistic, we explored the effect of using different parameter values. Results were qualitatively the same assuming less female bias (e.g., 60% of the population are females) and weaker polygyny (results not shown).

Exploitation was simulated by reducing the founder population to 500, 250, 100, 75, or 50 individuals for 100 years. After the bottleneck, the population was allowed to recover for another 100 years with an annual population growth rate (λ) equal to 1.067 or 1.009. These λ values correspond to the highest and lowest increasing annual growth rates observed in sea lion colonies in the GC (González-Suárez *et al.* 2006). For each scenario, we ran 1000 iterations to calculate the mean and 95% confidence interval of the observed heterozygosity and observed number of alleles. We report results for two time periods: the last year of the bottleneck and 100 years after the bottleneck.

RESULTS

Levels of observed heterozygosity (H_O) were similar among all studied colonies, with no apparent differences between the five GC colonies and the Pacific colony (table 1). Similarly, the number of alleles at each locus and allelic richness were not lower for the GC colonies compared with the Pacific colony (table 2).

BOTTLENECK results

In general, there was no evidence of heterozygosity excess in the studied sea lion colonies or the Upper Gulf group, except for San Benito, under the default TPM (table 1). Under the Piry *et al.* TPM, we detected heterozygosity deficiency (indicative of migration or population expansion) at San Jorge (table 1). However, neither of these results remained significant after a Bonferroni correction

a las de la colonia de San Benito, para la cual no existen registros históricos de explotación. Los resultados (no mostrados) fueron cualitativamente iguales.

La población inicial se estableció con 20,000 individuos, un valor promedio para toda la población del GC (Szteren *et al.* 2006). Se supuso que 80% de la población eran hembras para reflejar las menores tasas de supervivencia de los machos (Hernández-Camacho *et al.* 2008b) y un sistema polígamo en donde no todos los machos se reproducen. Se definió un ciclo de vida de 20 años, maduración sexual a los 5 años de edad y generaciones solapadas (Hernández-Camacho *et al.* 2008a, 2008b). A pesar de que estas suposiciones en cuanto a la biología de la especie son realistas, se probó el efecto de usar diferentes valores de los parámetros. Los resultados fueron cualitativamente similares suponiendo un menor sesgo hacia las hembras (e.g., 60% de la población conformado por hembras) y un menor nivel de poliginia (resultados no mostrados).

La explotación se simuló reduciendo la población inicial a 500, 250, 100, 75 ó 50 individuos durante 100 años. Después del cuello de botella, se dejó recuperar la población por otros 100 años con una tasa de crecimiento anual de la población (λ) igual a 1.067 ó 1.009. Estos valores de λ corresponden a la mayor y menor tasa de crecimiento anual observada en las colonias de lobos marinos en el GC (González-Suárez *et al.* 2006). Para cada escenario se corrieron 1000 iteraciones a fin de calcular la media y el intervalo de confianza de 95% de la heterocigosidad observada y del número de alelos observados. Los resultados se presentan para dos periodos de tiempo: el último año del cuello de botella y 100 años después del cuello de botella.

RESULTADOS

Los niveles de heterocigosidad observada (H_O) fueron similares entre todas las colonias estudiadas, sin ninguna diferencia aparente entre las cinco colonias del GC y la colonia del Pacífico (tabla 1). Asimismo, el número de alelos en cada marcador polimórfico y la riqueza alélica no fueron menores para las colonias del GC en comparación con la colonia del Pacífico (tabla 2).

Resultados del programa BOTTLENECK

En general, no hubo evidencia de un exceso de heterocigosidad en las colonias estudiadas del Alto Golfo, excepto para la de San Benito bajo el TPM por defecto (tabla 1). Bajo el TPM de Piry *et al.*, se detectó deficiencia heterocigótica (un patrón indicativo de migración o expansión de la población) en la colonia de San Jorge (tabla 1). No obstante, estos dos resultados no permanecieron significativos después de una corrección de Bonferroni para pruebas múltiples. Además, la prueba de cambio modal (fig. 2) no arrojó evidencia de un cuello de botella reciente en ninguna colonia. La distribución de las frecuencias alélicas no mostró una

Table 2. Number of alleles and allelic richness (in parentheses) per locus detected in six California sea lion colonies in Mexico. Calculated with FSTAT.

Tabla 2. Número de alelos y riqueza alélica (en paréntesis) por marcador polimórfico en seis colonias de lobo marino de California en México. Calculado con FSTAT.

Locus	San Jorge	Los Lobos	Granito	San Esteban	Los Islotes	San Benito
SGPv9	5 (4.99)	6 (5.69)	6 (5.75)	6 (6.00)	5 (4.97)	7 (7.00)
SGPv11	4 (4.00)	5 (4.85)	4 (4.00)	5 (4.83)	6 (5.83)	5 (5.00)
Pvc29	12 (11.54)	15 (14.62)	17 (15.67)	13 (12.80)	14 (13.77)	10 (10.00)
OrrFCB24	11 (10.92)	11 (10.82)	10 (9.98)	9 (8.99)	10 (9.99)	9 (9.00)
ZcCgDh1.8	6 (5.79)	6 (6.00)	6 (5.79)	6 (5.83)	6 (6.00)	6 (6.00)
ZcCgDh3.6	6 (6.00)	6 (6.00)	7 (6.96)	7 (7.00)	7 (7.00)	7 (7.00)
ZcCgDh4.7	3 (3.00)	4 (3.97)	3 (3.00)	3 (3.00)	3 (3.00)	3 (3.00)
ZcCgDh5.16	7 (6.75)	6 (6.00)	9 (8.58)	8 (7.78)	6 (5.82)	5 (5.00)
ZcCgDh5.8	10 (9.36)	9 (8.69)	11 (10.75)	12 (11.53)	10 (9.95)	11 (11.00)
ZcCgDh48	4 (3.79)	3 (3.00)	5 (4.75)	5 (5.00)	5 (4.83)	5 (5.00)
Mean	6.8 (6.62)	7.1 (6.96)	7.8 (7.52)	7.4 (7.28)	7.2 (7.12)	6.8 (6.80)

for multiple tests. In addition, the mode-shift test (fig. 2) provided no evidence of a recent bottleneck in any colony. The distribution of allele frequencies did not show a significant departure from a normal *L*-shape (i.e., more alleles at low frequencies).

M-ratio results

Analyses of the *M*-ratio provided little support for a past bottleneck (fig. 3). Only under the Piry *et al.* TPM with $\theta = 0.1$ ($N_e = 50$) was the observed *M*-ratio significantly lower than M_c for three colonies (San Jorge, Los Islotes, and San Benito; fig. 3), but was not lower for the other three. Under all other scenarios, the observed *M*-ratios were larger or not different from the calculated M_c (fig. 3), providing no support for a historical bottleneck. The observed *M*-ratio for the Upper Gulf group was 0.884 (95% confidence interval: 0.871–0.898), which is larger than the M_c under the Piry *et al.* TPM (0.796 for $N_e = 5000$, and 0.843 for $N_e = 500$) and the default TPM (0.682 for $N_e = 5000$, and 0.638 for $N_e = 500$). In addition, all observed *M*-ratios were higher than the suggested threshold of 0.68, which identifies bottlenecked populations (Garza and Williamson 2001).

Simulation results

Simulation results from BOTTLESIM revealed that reductions in the observed number of alleles were detectable 100 years after a bottleneck that reduced the population to 100 individuals or less (fig. 4). Observed heterozygosity was reduced at a lower rate than the observed number of alleles (as expected by the loss of rare alleles), and reductions were only detectable when populations had been reduced to 75–50 individuals (fig. 4). For explored the parameter range,

desviación significativa de la curva normal en forma de *L* (i.e., más alelos a frecuencias bajas).

Resultados de la razón *M*

El análisis de la razón *M* proporcionó poco apoyo a la ocurrencia de un cuello de botella en el pasado (fig. 3). Bajo el TPM de Piry *et al.* con $\theta = 0.1$ ($N_e = 50$), la razón *M* observada fue significativamente menor que la M_c para tres de las seis colonias (San Jorge, Los Islotes y San Benito; fig. 3). Bajo todos los otros escenarios, las razones *M* observadas fueron mayores o similares que las M_c calculadas (fig. 3), lo cual no sustenta un cuello de botella histórico. La razón *M* observada para el grupo del Alto Golfo fue 0.884 (intervalo de confianza de 95%: 0.871–0.898), que es mayor que la M_c bajo el TPM de Piry *et al.* (0.796 para $N_e = 5000$ y 0.843 para $N_e = 500$) y el TPM por defecto (0.682 para $N_e = 5000$ y 0.638 para $N_e = 500$). Además, todas las razones *M* observadas fueron mayores que el umbral sugerido de 0.68, el cual identifica poblaciones que han sufrido un cuello de botella (Garza y Williamson 2001).

Resultados del análisis de simulación

Los resultados del programa BOTTLESIM mostraron que las reducciones en el número de alelos observados podrían ser detectables 100 años después de un cuello de botella que redujese la población a 100 individuos o menos (fig. 4). La heterocigosidad observada disminuyó a una menor tasa que el número de alelos observados (como era de esperarse por la pérdida de alelos raros) y las reducciones sólo fueron detectables cuando las poblaciones habían disminuido a 75–50 individuos (fig. 4). Para el intervalo de parámetros probado,

BOTTLESIM could not simulate bottlenecks of fewer than 50 individuals (populations went extinct).

DISCUSSION

Overall, our results suggest that the California sea lion population in the GC did not experience a genetic bottleneck as a result of human exploitation in the 19th and 20th centuries. Bottlenecked populations are expected to exhibit reduced genetic variability compared with unexploited populations (Hedrick 1995). Here, the levels of observed heterozygosity (table 1) and allelic richness (table 2) were similar among all studied colonies, with no apparent differences between the five GC colonies and the Pacific colony. Similarly, the results from BOTTLENECK provided no support for a past bottleneck in the GC after a Bonferroni correction for multiple tests. Even without this correction, which may be overly conservative (Narum 2006), there was no consistent evidence of heterozygosity excess across mutation scenarios (table 1) and no departure from the normal *L*-shape curve in the mode-shift test (fig. 2).

Results from the *M*-ratio test also suggested that no bottleneck had occurred, except in three colonies when we assumed the Piry *et al.* TPM and an effective population size of 50 (fig. 3). The *M*-ratio is expected to retain information about the demographic history for longer periods than

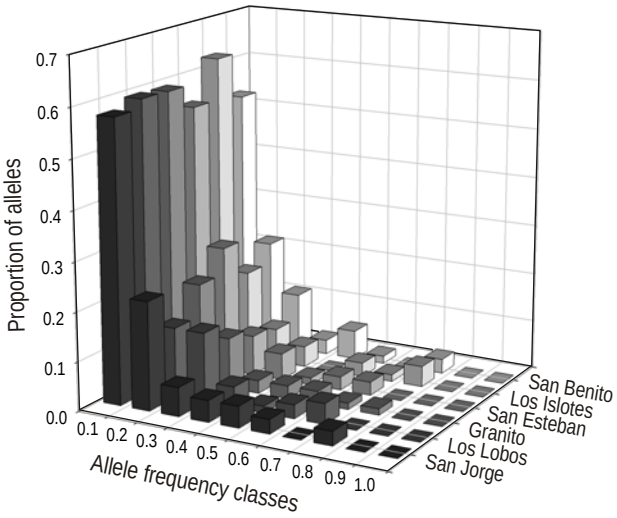

Figure 2. Frequency distributions of alleles at 10 amplified microsatellite loci in California sea lions as obtained from the mode-shift test in the BOTTLENECK program. Each bar represents the proportion of alleles found in each frequency category in each population.

Figura 2. Distribución de frecuencias de los alelos en 10 marcadores polimórficos microsatelitales amplificados en lobos marinos de California según la prueba de cambio modal en el programa BOTTLENECK. Cada barra representa la proporción de alelos encontrados en cada categoría de frecuencia en cada población.

el programa BOTTLESIM no pudo simular cuellos de botella con menos de 50 individuos (las poblaciones se extinguían).

DISCUSIÓN

Nuestros resultados sugieren que la población del lobo marino de California en el GC no sufrió un cuello de botella genético como consecuencia de la explotación humana durante los siglos XIX y XX. Las poblaciones que atraviesan por un cuello de botella deberían mostrar una variabilidad genética reducida en comparación con las poblaciones no explotadas (Hedrick 1995). Los niveles de heterocigosidad observada (tabla 1) y de riqueza alélica (tabla 2) fueron similares entre todas las colonias estudiadas, sin diferencias aparentes entre las cinco colonias del GC y la colonia del Pacífico. Asimismo, los resultados del programa BOTTLENECK no sustentaron la ocurrencia de un cuello de botella en el GC después de una corrección de Bonferroni para pruebas múltiples. Aun sin esta corrección, la cual podría ser

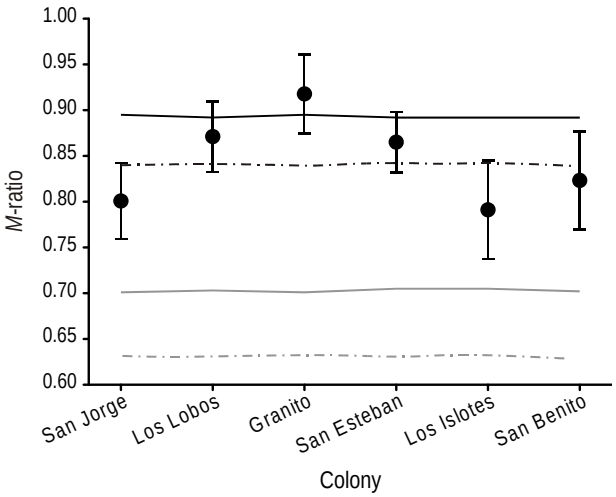

Figure 3. Observed and critical *M*-ratios for six colonies of the California sea lion in Mexico. Symbols are observed *M*-ratios, with 95% confidence intervals, estimated over all loci. Critical *M*-ratios (M_c) are represented by lines and were calculated under several assumed scenarios: the black solid and dashed lines represent the Piry *et al.* two-phase model (TPM; $\theta = 0.1$ and 1, respectively), and the dark grey solid and dashed lines represent the default TPM ($\theta = 0.1$ and 1, respectively); $\Delta_g = 3.5$ in all scenarios.

Figura 3. Razones *M* observadas y críticas para seis colonias del lobo marino de California en México. Los símbolos representan las razones *M* observadas, con intervalos de confianza de 95%, estimadas para todos los marcadores. Las razones *M* críticas (M_c) están representadas por líneas y se calcularon bajo varios escenarios: las líneas negra sólida y negra discontinua representan el modelo de dos fases (TPM) de Piry *et al.* ($\theta = 0.1$ y 1, respectivamente), y las líneas gris sólida y gris discontinua representan el TPM por defecto ($\theta = 0.1$ y 1, respectivamente); $\Delta_g = 3.5$ en todos los escenarios.

methods based on changes in rare alleles and heterozygosity such as those implemented by BOTTLENECK (Garza and Williamson 2001). Therefore, these *M*-ratio results could reflect an older genetic bottleneck that occurred only in the colonies from San Jorge, Los Islotes, and San Benito; however, historical records suggest that these three colonies were not heavily exploited (Lluch-Belda 1969) and our analysis did not consistently reveal a bottleneck for these colonies (for other mutation models or effective population sizes). We therefore find that overall our results are more consistent with the conclusion that past exploitation of California sea lions in the GC did not cause a genetic bottleneck.

Reductions in population size are not always accompanied by genetic bottlenecks (Busch *et al.* 2007, Heller *et al.* 2008), particularly if historical effective population sizes

demasiado conservadora (Narum 2006), no se encontró evidencia consistente de un exceso de heterocigosidad en los escenarios de mutación (tabla 1), ni se observó desviación de la curva normal en forma de *L* en la prueba de cambio modal (fig. 2).

Los resultados de la prueba de la razón *M* también indicaron que no había ocurrido un cuello de botella, excepto en tres colonias cuando se usó el TPM de Piry *et al.* y un tamaño efectivo de la población de 50 (fig. 3). Se supone que la razón *M* retiene información de la historia demográfica durante un periodo más largo que los métodos basados en cambios de los alelos raros y la heterocigosidad, tales como los implementados en BOTTLENECK (Garza y Williamson 2001). Por tanto, estos resultados podrían reflejar un cuello de botella genético más antiguo que ocurrió sólo en las colonias de San Jorge, Los Islotes y San Benito; sin embargo, los

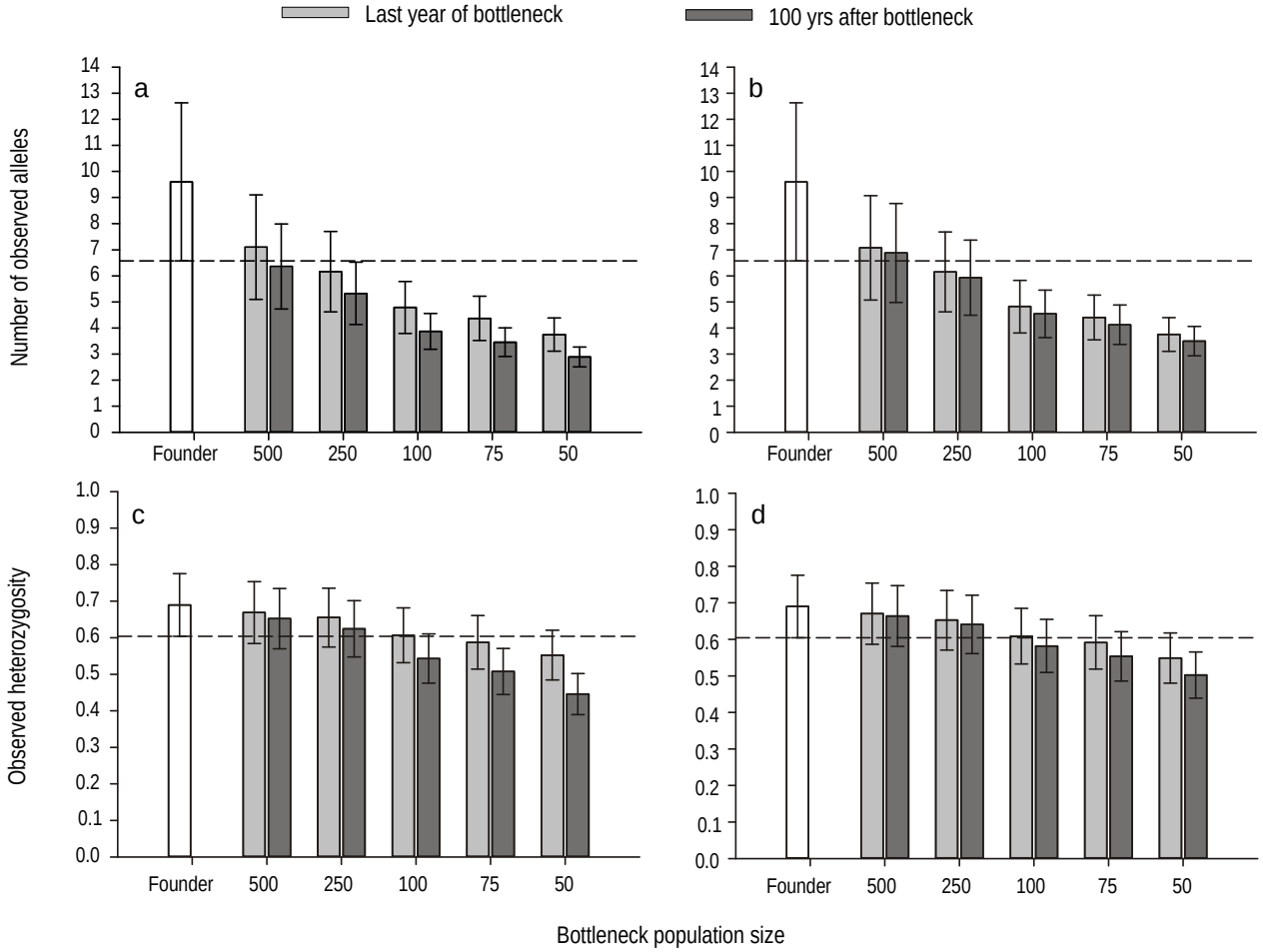

Figure 4. Simulation results based on the BOTTLESIM program. Bars represent mean values and error bars are 95% confidence intervals. (**a**) Observed number of alleles with an annual growth rate after the bottleneck (λ) of 1.009. (**b**) Observed number of alleles with λ = 1.067. (**c**) Observed heterozygosity with λ = 1.009. (**d**) Observed heterozygosity with λ = 1.067. The dashed line provides a reference for the lower 95% confidence interval of the founder population.

Figura 4. Resultados del análisis de simulación con base en el programa BOTTLESIM. Las barras representan los valores medios y las barras de error indican los intervalos de confianza de 95%. (**a**) Número de alelos observados con una tasa de crecimiento anual después del cuello de botella (λ) de 1.009. (**b**) Número de alelos observados con λ = 1.067. (**c**) Heterocigosidad observada con λ = 1.009. (**d**) Heterocigosidad observada con λ = 1.067. La línea discontinua proporciona una referencia para el intervalo de confianza de 95% inferior de la población inicial.

have always been low due to fluctuations in population size or a polygynous mating system (Pimm *et al.* 1989). As California sea lions are polygynous and have historically experienced low population sizes in the GC, even substantial human exploitation may not have had noticeable genetic consequences. Our simulation analyses indicate that if the GC population had been reduced to fewer than 100–75 individuals, a loss of genetic variability would have occurred (fig. 4). Other studies have also suggested that heterozygosity excess is likely to be noticeable only when effective population size (N_e) falls below approximately 20–50 (Cornuet and Luikart 1996, Luikart *et al.* 1998). Therefore, fairly severe population declines (e.g., only 400 individuals remaining) may have occurred without resulting in a detectable genetic bottleneck (see also Bickham *et al.* 1998).

Although data on the actual number of individuals killed during these hunts or the size of the remaining population are not available, the Mexican Fisheries Agency (Dirección General de Pesca) estimates that an average of 400 adult males were killed annually in the GC during the mid-20th century (Zavala-González and Mellink 2000). Hunters most likely targeted territorial males because these animals are less likely to flee and are thus an easier target (Lluch-Belda 1969), and exploitation concentrated on sea lion colonies in the Midriff area. We estimate that these colonies included ~676 territorial adult males (assuming that 6.9% of the population are territorial males; Zavala-González 1993, Aurioles-Gamboa and Zavala-González 1994). Therefore, an estimated annual removal of 400 males likely represented a considerable proportion of territorial males, yet our results show no negative effect on nuclear genetic variability. Genetic variability may have been maintained by bachelor males who previously had no territories and gained reproductive opportunities. Alternatively, the estimated number of males hunted per year may have been overestimated. Future studies could consider variation in the Y chromosome and could test these hypotheses, and may reveal yet unnoticed consequences of this male-biased exploitation.

While our results indicate that past exploitation did not reduce genetic variability, an alternative explanation is that the implemented approaches failed to detect an existing past genetic bottleneck. Bottlenecks that occurred more than 40–80 generations ago are unlikely to be detected by the approaches implemented in BOTTLENECK because genetic drift and new mutations are likely to re-establish mutation-genetic drift equilibrium within that time frame (Luikart *et al.* 1998). However, sea lion exploitation in the GC is much more recent (<200 years or approximately 16 sea lion generations). Furthermore, the *M*-ratio is expected to retain the signal of a bottleneck for longer periods (Garza and Williamson 2001). Therefore, we should have detected the signal of a bottleneck caused by human exploitation during the 19th and 20th centuries.

registros históricos de estas tres colonias indican que no fueron explotadas intensamente (Lluch-Belda 1969) y nuestro análisis no mostró de forma consistente un cuello de botella para ellas (para otros modelos de mutación o tamaños efectivos de la población). Es por esto que consideramos que, en general, nuestros resultados son más consistentes con la conclusión de que la explotación histórica del lobo marino de California en el GC no causó un cuello de botella genético.

Las reducciones en el tamaño de la población no siempre van acompañadas por cuellos de botella genéticos (Busch *et al.* 2007, Heller *et al.* 2008), especialmente si los tamaños efectivos históricos siempre han sido bajos debido a sus fluctuaciones o a un sistema polígamo de reproducción (Pimm *et al.* 1989). Ya que los lobos marinos de California son polígamos e históricamente han presentado tamaños poblacionales pequeños en el GC, es posible que aun una explotación humana considerable no hubiera tenido consecuencias genéticas notables. Los análisis de simulación indicaron que si la población del GC hubiese disminuido hasta quedar 100–75 individuos, se hubiera detectado una reducción de la variabilidad genética (fig. 4). Otros estudios también han sugerido la posibilidad de que un exceso de heterocigosidad sólo sea notable cuando el tamaño efectivo de la población (N_e) es menor de 20–50 individuos (Cornuet y Luikart 1996, Luikart *et al.* 1998). Por tanto, podrían haber ocurrido reducciones bastante severas de la población (e.g., quedando sólo 400 individuos) sin que se haya presentado un cuello de botella genético detectable (ver Bickham *et al.* 1998).

A pesar de que no existen datos sobre el número actual de individuos cazados o del tamaño de la población restante, la Dirección General de Pesca de México estima que un promedio de 400 machos adultos fueron matados anualmente en el GC a mediados del siglo XX (Zavala-González y Mellink 2000). Los cazadores probablemente se enfocaron en los machos territoriales ya que hay menos probabilidad de que estos animales huyan y consecuentemente son presa más fácil (Lluch-Belda 1969); asimismo, la explotación se concentró sobre las colonias en el área de las grandes islas. Estimamos que estas colonias incluían ~676 machos adultos territoriales (suponiendo que 6.9% de la población son machos territoriales; Zavala-González 1993, Aurioles-Gamboa y Zavala-González 1994). La caza estimada de 400 machos representaría una gran proporción de machos territoriales, pero nuestros resultados no muestran un efecto negativo en la variabilidad genética nuclear. Es posible que la variabilidad genética se haya mantenido gracias a los machos solteros que no tenían territorios propios y ganaron oportunidades reproductivas. Por otro lado, es posible que se haya sobreestimado el número de machos cazados por año. Estudios futuros podrían considerar la variación en el cromosoma Y para probar estas hipótesis, y quizá podrían mostrar consecuencias aún no contempladas de esta explotación sesgada hacia los machos.

It is also important to consider that the power to detect a genetic bottleneck increases with the number of loci analyzed (Cornuet and Luikart 1996, Garza and Williamson 2001), and studies based on low numbers of loci may not detect even recent past bottlenecks. We analyzed data from 10 microsatellite loci, which is within the range of the recommended number of loci for BOTTLENECK (Luikart and Cornuet 1998), although close to the lower limit. Recent studies suggest that the approaches we used allow detection of bottlenecks with as few as 6–7 loci (e.g., Spear *et al.* 2006, Charlier *et al.* 2008). Moreover, our simulation analysis revealed that a genetic bottleneck could have been detected if population reductions had been diminished to fewer than 100 individuals (fig. 4), which is within the range of the observed size of bottlenecked populations in pinnipeds (Hoelzel *et al.* 1993). Therefore, our results are unlikely to be due to a failure of the approaches used.

In conclusion, our results show that recent human exploitation did not result in a genetic bottleneck in California sea lion colonies in the GC. Past exploitation was likely not severe enough to reduce genetic variability in these colonies. Nevertheless, past exploitation may have affected the social structure, fitness, and population dynamics in this area. The removal of adult males was concentrated on a few sea lion colonies. In these colonies, a high proportion of the adult males was likely killed (Lluch-Belda 1969) despite a regulation limiting the take to <50% of the adult males (Zavala-González and Mellink 2000). In addition, sea lion males were removed during the hunting season (15 May to 15 July), which coincided with the sea lion breeding season, a time when males aggregate in colonies and defend territories.

Hunters often killed the largest and more aggressive males (Lluch-Belda 1969). Therefore, hunts may have targeted more fit animals with potential social and demographic consequences (Coltman *et al.* 2003). For example, if less fit males sired most offspring after the removal of stronger males, the fitness of the future generations could be compromised. Similarly, hunts may have disrupted the structure of the colony by reducing male tenure in the territories. The sudden disappearance of territorial males (those hunted) likely resulted in fights among males looking to occupy the empty territories and consequently, increased stress among females and pups at these sites.

Finally, the mere presence of the hunting crews among the colonies could also have impacted sea lions as human presence has been linked to reduced reproductive rates (French SS, unpub. data). These negative effects could explain why the colonies where the hunts concentrated have exhibited substantial population declines in the last two decades (Szteren *et al.* 2006). Our study shows that the reason for these declines is not a reduction in genetic variability, but we hypothesized that these other impacts of past exploitation could have contributed to the contemporary patterns in population trends.

Aunque nuestros reultados sugieren que la explotación histórica no redujo la variabilidad genética, una explicación alternativa es que los métodos implementados no lograron detectar un cuello de botella genético que sí occurió en el pasado. Es poco probable que se detecten los cuellos de botella que ocurrieron hace más de 40–80 generaciones con los métodos implementados en BOTTLENECK, ya que la deriva genética y las nuevas mutaciones reestablecen el equilibrio mutación-deriva genética dentro de ese periodo de tiempo (Luikart *et al.* 1998). Sin embargo, la explotación del lobo marino en el GC es mucho más reciente (<200 años o aproximadamente 16 generaciones). Además, se supone que la razón *M* retiene las señales de un cuello de botella por mayores periodos (Garza y Williamson 2001). Por ende, deberíamos haber detectado las señales de un cuello de botella causado por la explotación humana durante los siglos XIX y XX.

También es importante considerar que la capacidad de detectar un cuello de botella genético incrementa con el número de marcadores analizados (Cornuet y Luikart 1996, Garza y Williamson 2001), y los trabajos basados en un número bajo de éstos posiblemente no detecten incluso los cuellos de botellas recientes. Se analizaron datos de 10 marcadores microsatelitales, un número dentro del intervalo recomendado para el programa BOTTLENECK (Luikart y Cornuet 1998), aunque cerca del límite inferior. Estudios recientes sugieren que los métodos aquí utilizados permiten detectar cuellos de botella con 6–7 marcadores (e.g., Spear *et al.* 2006, Charlier *et al.* 2008). Nuestro análisis de simulación indicó que un cuello de botella genético podría haberse detectado si se hubiese reducido la población a menos de 100 individuos (fig. 4), lo cual está dentro del intervalo del tamaño observado de poblaciones de pinípedos sujetos a un cuello de botella (Hoelzel *et al.* 1993). Consecuentemente, es poco probable que nuestros resultados se deban a una falla en los métodos usados.

En conclusión, nuestros resultados muestran que la reciente explotación humana no causó un cuello de botella genético en las colonias del lobo marino de California en el GC. La explotación histórica no fue lo suficientemente intensa para reducir la variabilidad genética de esta población. No obstante, la explotación podría haber afectado la estructura social, la aptitud y la dinámica poblacional en esta zona. La cacería se concentró en unas cuantas colonias donde probablemente se mató una alta proporción de los machos adultos (Lluch-Belda 1969), a pesar de una regulación que limitaba la toma a <50% de los machos adultos (Zavala-González y Mellink 2000). Además, se sustrayeron los machos durante la temporada de caza (15 de mayo a 15 de julio), que coincide con la temporada de reproducción, cuando los machos se agrupan en las colonias y defienden sus territorios.

Los cazadores frecuentemente mataban a los machos más grandes y agresivos (Lluch-Belda 1969), probablemente los

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the National Science Foundation (grant No. 0347960 to LR Gerber), and an Arizona State University Graduate and Professional Student Association grant and the 2007 Lisa Dent Memorial Fund (both to M González-Suárez). All procedures were approved by the Arizona State University Animal Care and Use Committee (07-918R). Data collection was authorized by the Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT oficio núm/SGPA/DGVS/04160 and /02709). Samples were imported from Mexico under permits from SEMARNAT (#19198 and #23010) and the US National Marine Fisheries Service (#782-1694-02). We thank the 2004 *Lobos* crew and F Elorriaga for help collecting tissue samples. P Hedrick and T Dowling offered excellent guidance and generous access to their laboratories. R Flatz, R Chapman, and K Robertson provided assistance with laboratory procedures. Three anonymous reviewers offered helpful suggestions.

REFERENCES

Aurioles-Gamboa D, Zavala-González A. 1994. Ecological factors that determine distribution and abundance of the California sea lion *Zalophus californianus* in the Gulf of California. Cienc. Mar. 20: 535–553.

Bahre CJ, Bourillón L. 2002. Human impact in the Midriff Islands. In: Case TJ, Cody ML, Ezcurra E (eds.), A New Island Biogeography of the Sea of Cortes. Oxford Univ. Press, New York, pp. 383–406.

Bickham JW, Loughlin TR, Calkins DG, Wickliffe JK, Patton JC. 1998. Genetic variability and population decline in Steller sea lions from the Gulf of Alaska. J. Mammal. 79: 1390–1395.

Busch JD, Waser PM, DeWoody JA. 2007. Recent demographic bottlenecks are not accompanied by a genetic signature in banner-tailed kangaroo rats (*Dipodomys spectabilis*). Mol. Ecol. 16: 2450–2462.

Carretta JV, Forney KA, Lowry M, Barlow J, Baker J, Hanson B, Muto MM. 2007. US Pacific Marine Mammal Stock Assessments: 2007. US Department of Commerce, National Oceanic and Atmospheric Administration. NOAA-TM-NMFS-SWFSC-414: 321.

Charlier J, Laikre L, Ryman N. 2008. Genetic structure and evidence of a local bottleneck in moose in Sweden. J. Wildl. Manage. 72: 411–415.

Coltman DW, O'Donoghue P, Jorgenson JT, Hogg JT, Strobeck C, Festa-Bianchet M. 2003. Undesirable evolutionary consequences of trophy hunting. Nature 426: 655–658.

Cornuet JM, Luikart G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. Genetics 144: 2001–2014.

DiRienzo A, Peterson AC, Garza JC, Valdes AM, Slatkin M, Freimer NB. 1994. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3166–3170.

Garza JC, Williamson EG. 2001. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. Mol. Ecol. 10: 305–318.

González-Suárez M, McCluney KE, Aurioles D, Gerber LR. 2006. Incorporating uncertainty in spatial structure for viability predictions: A case study of California sea lions (*Zalophus californianus californianus*). Anim. Conserv. 9: 219–227.

González-Suárez M, Flatz R, Aurioles-Gamboa D, Hedrick PW, Gerber LR. 2009. Isolation by distance among California sea lion populations in Mexico: Redefining management stocks. Mol. Ecol. 18: 1088–1099.

animales más aptos, lo cual puede conllevar consecuencias sociales y demográficas (Coltman *et al.* 2003). Por ejemplo, si machos de menor aptitud engendran la mayoría de las crías después de la cacería de los machos más fuertes, la aptitud de las generaciones futuras podría resultar comprometida. La explotación también pudo haber afectado la estructura de la colonia al reducir el tiempo de permanencia de los machos en los territorios. La desaparición abrupta de los machos territoriales (los cazados) probablemente propició peleas entre los machos que buscaban ocupar los territorios vacíos, aumentando el nivel de estrés en las hembras y las crías en estos sitios.

Finalmente, la simple presencia de los cazadores en las colonias podría haber impactado a los lobos marinos ya que se ha relacionado la presencia humana con reducciones en las tasas de reproducción (French SS, datos no publicados). Estos efectos negativos podrían explicar por qué las colonias sobre las cuales se enfocó la cacería han presentado un declive sustancial de la población en las dos últimas décadas (Szteren *et al.* 2006). Este estudio muestra que la razón de este declive no es una reducción en la variabilidad genética; nuestra hipótesis es que estos otros impactos de la explotación histórica podrían haber contribuido a las tendencias poblacionales actuales.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por la Fundación Nacional de la Ciencia de Estados Unidos (subsidio No. 0347960 a LR Gerber), y por la Universidad del Estado de Arizona (Graduate & Professional Student Association y el Fondo Lisa Dent 2007, ambas a M González-Suárez). Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité para el Cuidado y Uso de Animales de la Universidad del Estado de Arizona (07-918R). La recolección de datos fue autorizada por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT oficio núm/SGPA/DGVS/04160 y /02709). Las muestras fueron importadas de México bajo permisos de la SEMARNAT (#19198 y #23010) y el Servicio Nacional de Pesquerías Marinas de Estados Unidos (#782-1694-02). Agradecemos el apoyo brindado por el equipo de *Lobos* y F Elorriaga en la recolección de las muestras de tejido. P Hedrick y T Dowling proporcionaron excelente asesoría y acceso a sus laboratorios. R Flatz, R Chapman y K Robertson apoyaron en los procedimientos de laboratorio. Tres revisores anónimos proporcionaron sugerencias valiosas.

Traducido al español por Christine Harris.

Guinand B, Scribner KT. 2003. Evaluation of methodology for detection of genetic bottlenecks: Inferences from temporally replicated lake trout populations. C. R. Biol. 326: S61–S67.

Harris RB, Wall WA, Allendorf FW. 2002. Genetic consequences of hunting: What do we know and what should we do? Wildl. Soc. Bull. 30: 634–643.

Hedrick PW. 1995. Elephant seals and the estimation of a population bottleneck. J. Hered. 86: 232–235.

Hedrick PW. 2005. Genetics of Populations. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, MA.

Heller R, Lorenzen ED, Okello JBA, Masembe C, Siegismund HR. 2008. Mid-Holocene decline in African buffalos inferred from Bayesian coalescent-based analyses of microsatellites and mitochondrial DNA. Mol. Ecol. 17: 4845–4858.

Hernández-Camacho CJ, Aurioles-Gamboa D, Gerber LR. 2008a. Age-specific birth rates of California sea lions (*Zalophus californianus*) in the Gulf of California, Mexico. Mar. Mamm. Sci. 24: 664–676.

Hernández-Camacho CJ, Aurioles-Gamboa D, Laake J, Gerber LR. 2008b. Survival rates of theCalifornia sea lion, *Zalophus californianus*, in Mexico. J. Mammal. 89: 1059–1066.

Hoelzel AR. 1999. Impact of population bottlenecks on genetic variation and the importance of life-history: A case study of the northern elephant seal. Biol. J. Linn. Soc. 68: 23–39.

Hoelzel AR, Halley J, Obrien SJ, Campagna C, Arnbom T, Leboeuf B, Ralls K, Dover GA. 1993. Elephant seal genetic variation and the use of simulation models to investigate historical population bottlenecks. J. Hered. 84: 443–449.

Kuo CH, Janzen FJ. 2003. BOTTLESIM: A bottleneck simulation program for long-lived species with overlapping generations. Mol. Ecol. Notes 3: 669–673.

Leberg PL, Firmin BD. 2008. Role of inbreeding depression and purging in captive breeding and restoration programmes. Mol. Ecol. 17: 334–343.

Luikart G, Cornuet JM. 1998. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. Conserv. Biol. 12: 228–237.

Luikart G, Allendorf FW, Cornuet JM, Sherwin WB. 1998. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. J. Hered. 89: 238–247.

Lluch-Belda D. 1969. El lobo marino de California *Zalophus californianus* (Lesson, 1828) Allen, 1880. Observaciones sobre su ecología y explotación. Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables, México DF, 69 pp.

Maniscalco JM, Wynne K, Pitcher KW, Hanson MB, Melin SR, Atkinson S. 2004. The occurrence of California sea lions (*Zalophus californianus*) in Alaska. Aquat. Mamm. 30: 427–433.

Milner-Gulland EJ, Bukreevea OM, Coulson T, Lushchekina AA, Kholodova MV, Bekenov AB, Grachev IA. 2003. Reproductive collapse in saiga antelope harems. Nature 422: 135–135.

Narum SR. 2006. Beyond Bonferroni: Less conservative analyses for conservation genetics. Conserv. Genet. 7: 783–787.

Pimm SL, Gittleman JL, Mccracken GF, Gilpin M. 1989. Plausible alternatives to bottlenecks to explain reduced genetic diversity. Trends Ecol. Evol. 4: 176–178.

Piry S, Luikart G, Cornuet JM. 1999. BOTTLENECK: A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. J. Hered. 90: 502–503.

Roelke ME, Martenson JS, Obrien SJ. 1993. The consequences of demographic reduction and genetic depletion in the endangered Florida panther. Curr. Biol. 3: 340–350.

Spear SF, Peterson CR, Matocq MD, Storfer A. 2006. Molecular evidence for historical and recent population size reductions of tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*) in Yellowstone National Park. Conserv. Genet. 7: 605–611.

Szteren D, Aurioles D, Gerber LR. 2006. Population status and trends of the California sea lion (*Zalophus californianus californianus*) in the Gulf of California, Mexico. In: Trites AW, Atkinson SP, DeMaster DP, Fritz LW, Gelatt TS, Rea LD, Wynne KM (eds.), Sea Lions of the World. Alaska Sea Grant College Program, University of Alaska, Fairbanks, pp. 369–403.

Ward EJ, Chirakkal H, González-Suárez M, Aurioles-Gamboa D, Holmes EE, Gerber LR. 2010. Inferring spatial structure from time-series data: Using multivariate state-space models to detect metapopulation structure of California sea lions in the Gulf of California, Mexico. J. Appl. Ecol. 47: 47–56.

Weber DS, Stewart BS, Lehman N. 2004. Genetic consequences of a severe population bottleneck in the Guadalupe fur seal (*Arctocephalus townsendi*). J. Hered. 95: 144–153.

Zavala-González A. 1993. Biología poblacional del lobo marino de California, *Zalophus californianus californianus* (Lesson 1828), en la región de las grandes islas de Golfo de California, Mexico. M.Sc. thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, 79 pp.

Zavala-González A, Mellink E. 2000. Historical exploitation of the California sea lion, *Zalophus californianus*, in Mexico. Mar. Fish. Rev. 62: 35–40.

Received December, 2009;
accepted April, 2010.