

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



---

**Maestría en Ciencias  
en Ecología Marina**

---

**Variabilidad genética de *Isostichopus fuscus* (Ludwig, 1875) en  
el Pacífico mexicano, mediante marcadores moleculares**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Presenta:

**José Miguel Ochoa Chávez**

Ensenada, Baja California, México

2017

Tesis defendida por  
**José Miguel Ochoa Chávez**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dr. Axayácatl Rocha Olivares**  
Director de tesis

**Dr. Luis Eduardo Calderón Aguilera**

**Dr. Miguel Ángel del Río Portilla**



---

**Dra. María Lucila del Carmen Lares Reyes**  
Coordinador del Posgrado en Ecología Marina

---

**Dra. Rufina Hernández Martínez**  
Directora de Estudios de Posgrado

*José Miguel Ochoa Chávez © 2017*

*Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.*

Resumen de la tesis que presenta **José Miguel Ochoa Chávez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ecología Marina.

**Variabilidad genética de *Isostichopus fuscus* (Ludwig, 1875) en el Pacífico mexicano, mediante marcadores moleculares**

Resumen aprobado por:

---

Dr. Axayácatl Rocha Olivares  
**Director de tesis**

*Isostichopus fuscus* se distribuye desde el Golfo de California hasta las costas de Ecuador y las Islas Galápagos. Esta holoturia de hábitos sedentarios se encuentra principalmente en fondos someros y presenta una lenta tasa de crecimiento así como una edad de primera madurez tardía, lo que la convierte en una especie susceptible a la sobreexplotación. Su alto valor comercial ha favorecido la sobre explotación ocasionando una notable disminución en el tamaño de su población. Actualmente la especie se encuentra enlistada en la NOM-059-SEMARNAT-2010 como especie sujeta a protección especial y en la Lista Roja de la UICN en peligro de extinción. A pesar de su importancia para efectos de conservación y manejo, la diversidad genética de *I. fuscus* ha sido muy poco estudiada a lo largo de su distribución. El objetivo de este trabajo es evaluar la diversidad, estructura y conectividad genéticas de *I. fuscus* en el Pacífico mexicano para conocer si las poblaciones funcionan como una o varias unidades evolutivas independientes. Para esto se diseñaron y caracterizaron 19 marcadores microsatélites polimórficos específicos para *I. fuscus*. Ocho de ellos, más un fragmento de la región control mitocondrial (RCM) fueron amplificados para 307 y 151 individuos respectivamente, distribuidos a lo largo del Golfo de California. Además se integraron al análisis las secuencias de la RCM provenientes de Ecuador y Galápagos. Los resultados mostraron valores elevados de diversidad genética en términos de diversidad haplotípica (0.99), número de alelos (2-24) y heterocigosis ( $H_o$ , 0.16-1;  $H_e$ , 0.32-0.97), así como una estructuración marcada entre México y Sudamérica, y ausente entre las localidades mexicanas. El flujo genético fue mínimo entre México y Sudamérica, y órdenes de magnitud mayor en México. El modelo de dispersión pasiva corroboró el flujo en el sentido horizontal y revela un una importante conectividad vertical. Los resultados indicaron que dentro del Golfo de California existe una población panmíctica con elevada diversidad genética, cuyo flujo genético ha disminuido posiblemente por la disminución del tamaño poblacional. La alta diversidad y ausencia de estructura genética podrían ser efecto de la conectividad vertical, a través de los individuos en profundidades inaccesibles para la pesquería.

**Palabras clave:** pepino de mar, diversidad genética, estructura genética, conectividad

Abstract of the thesis presented **José Miguel Ochoa Chávez** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Marine Ecology.

**Genetic variability of *Isostichopus fuscus* (Ludwig, 1875) in the Mexican Pacific, using molecular markers**

Abstract approved by:

---

Dr. Axayácatl Rocha Olivares  
**Thesis Director**

*Isostichopus fuscus* is distributed from Gulf of California to Ecuador and Galapagos Islands. This sedentary sea cucumber is found mainly in shallow depths. A slow growth rate, as well as late maturity makes this species susceptible to overexploitation. Its high commercial value has favored exploitation to unsustainable levels, causing a notorious decrease in population size. At present *I. fuscus* is included in the Official Mexican Standard NOM-059-SEMARNAT-2010 as subject to special protection and listed as Endangered in the IUCN Red List. Despite its importance in terms of management and conservation, its genetic status has been little studied along its distribution range. The objective of this thesis was to evaluate genetic diversity, structure and gene flow in the Mexican Pacific in order to establish whether populations work as a single or many independent evolutionary units. For this we designed 19 species-specific polymorphic microsatellite markers. Eight of them plus a mitochondrial control region fragment (mtCR) were amplified for 307 and 151 individuals, respectively, distributed along the Gulf of California. Mitochondrial control region sequences from Ecuador and Galapagos were added to the analysis. Results show high genetic diversity values in terms of haplotype diversity (0.99), number of alleles (2-24) and heterozygosity (HO, 0.16-1; HE, 0.32-0.97). A marked genetic differentiation between Mexico and South America was detected, as well as the absence of differentiation among samples from Mexico. Gene flow was minimal between Mexico and South America, and several orders of magnitude larger in Mexico. An oceanographic model of dispersal corroborates horizontal flux and reveals an important amount of vertical connectivity. Results indicate the presence of a single panmictic *I. fuscus* population in the Gulf of California with high genetic diversity, whose gene flow has diminished possibly as a result of population declines. The high genetic diversity and absence of structure could be the result of vertical connectivity of individuals inhabiting water depths inaccessible to the fishery.

**Keywords: sea cucumber, genetic diversity, genetic structure, connectivity**

## **Dedicatoria**

A mi padre y a mi madre, quienes me enseñaron a vivir en libertad.

## Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por admitirme dentro de sus filas como estudiante del posgrado en Ecología Marina.

Al CONACYT por concederme la beca (becario 339300) que me permitió subsistir mientras realicé mis estudios de maestría.

Al Dr. Axayácatl Rocha Olivares, por permitirme trabajar bajo su dirección, por darme la libertad de desarrollar mis ideas, motivándome y guiándome siempre por el camino de la buena ciencia.

Al Dr. Luis Eduardo Calderón Aguilera, por incluirme dentro del proyecto, confiar en mi trabajo y estar siempre disponible.

Al Dr. Miguel Ángel del Río Portilla, por su ayuda y valiosas aportaciones desde el primer día del proyecto.

A los diversos profesores, no solo del posgrado en Ecología Marina, que influyeron profundamente en mi manera de ver la ciencia.

A todo el personal administrativo y de mantenimiento del CICESE, que se encargaron de mantener el entorno en óptimas condiciones para mi desarrollo profesional.

Al proyecto Evaluación de la biología y dinámica de población del pepino de mar (*Isostichopus fuscus* L.) y diseño de áreas de reproducción y explotación comercial en el estado de Baja California (Ref. SAGARPA–CONACYT 2013-2-02235).

A mis amigos del Laboratorio de Ecología Molecular y anexos (nemátodos), por enriquecer en términos técnico-educativos y sociales mi estancia en el posgrado. De manera especial agradezco a Anita, a Celia y a Fran quienes me echaron la mano en los momentos de oscurantismo y a Ivonne que con mano dura y justa mantiene la paz y la prosperidad dentro del laboratorio.

A todos los integrantes del Laboratorio de Ecología y Pesquerías de la Zona Costera, responsables del muestreo de mi proyecto. De manera particular agradezco al Dr. Pedro Medina del Centro Universitario de la Costa, Puerto Vallarta, al Dr. Sergio Scarry González del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz y a Elizabeth Brassea, compañera del posgrado, quienes colectaron y me enviaron muestras adicionales que me permitieron ampliar mi área de estudio.

A mis amigos y compañeros de la generación. Si bien no perduró sustancialmente la cohesión del grupo, fue suficiente para llevarme buenas amistades y experiencias.

Al entrenador Humberto Delgadillo Hernández y a los integrantes del equipo de atletismo del CICESE, por su confianza, dedicación y compañerismo, responsables en gran parte de mantener mi salud mental y física a tope.

A mi familia, a mi Chief y a mi Jefa por el apoyo en todos los sentidos. A mis hermanos Juan, Angélica y Sara, tan poco afectivos como incondicionales. A Daniela, mi flaca, por el apoyo y comprensión, por acompañarme estos años en cada trabajo, tarea y PCR, distante pero nunca ausente.

Gracias.

# Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	x
Lista de anexos.....	xii
<b>1. Introducción.....</b>	<b>13</b>
1.0.1 Biología de las holoturias .....	13
1.0.2 Pesquería de <i>I. fuscus</i> .....	14
1.1 Antecedentes .....	16
1.1.1 Diversidad genética .....	16
1.1.2 Marcadores moleculares .....	16
1.1.3 Patrones de conectividad en el Golfo de California .....	17
1.2 Justificación .....	20
1.3 Hipótesis.....	21
1.4 Objetivos .....	21
1.4.1 Objetivo general.....	21
1.4.2 Objetivos específicos.....	21
<b>2. Metodología .....</b>	<b>22</b>
2.1 Área de estudi .....	22
2.1.1 Aspectos generales del Golfo de California.....	22
2.2 Muestreo .....	23
2.2.1 Localidades de muestreo .....	23
2.2.2 Colecta de material biológico.....	24
2.3 Modelo numérico Euleriano.....	24
2.4 Desarrollo y caracterización de microsatélites .....	26
2.4.1 Secuenciación y ensamble del genoma de <i>I. fuscus</i> .....	26
2.4.2 Identificación y selección de loci microsatelitales .....	27
2.4.3 Extracción de ADN, experimentación y obtención de datos.....	27
2.4.4 Análisis de datos.....	28
2.5 Evaluación de variabilidad genética .....	28
2.5.1 Extracción de ADN.....	29

2.5.2 Amplificación y genotipificación .....	29
2.5.3 Análisis de datos.....	29
<b>3. Resultados.....</b>	<b>32</b>
3.1 Desarrollo y caracterización de microsatélites .....	32
3.1.1 Secuenciación genómica de <i>I. fuscus</i> y ensamble .....	32
3.1.2 Localización y selección de loci microsatelitales.....	32
3.1.3 Optimización y genotipificación de loci .....	33
3.1.4 Nivel de polimorfismo de marcadores microsatelitales en una población.....	34
3.2 Evaluación de variabilidad genética .....	35
3.2.1 Experimentación y obtención de datos.....	35
3.2.2 Diversidad genética .....	36
3.2.3 Estructura genética .....	38
3.2.4 Flujo genético y dispersión larvaria pasiva.....	42
<b>4. Discusión .....</b>	<b>47</b>
<b>5. Conclusiones.....</b>	<b>53</b>
<b>6. Recomendaciones .....</b>	<b>54</b>
Literatura citada .....	55

## Lista de figuras

Figura	Página
1    Distribución geográfica de los sitios de muestreo .....	23
2    Áreas del modelo tridimensional de Montaña-Cortéz (2015). 1, Alto Golfo (Upper Gulf) (UG); 2, Conexión Alto Golfo y Remolino Estacional (Buffer Zone) (BZ); 3, Remolinos Peninsulares (Peninsular Eddies) (PE); 4, Remolino Estacional (Seasonal Eddy) (SE); 5, Sonora (The Northern Coast of Sonora) (SO); 6, Cuenca Delfín (Delfín Basin) (DB); 7, Norte de la Isla Tiburón (North of the Tiburón Island) (TI); 8, Ángel de la Guarda (East of the Ángel de la Guarda Island) (AG); 9, Canal de Ballenas (Ballenas-Salsipuedes Channel) (BC); 10, Zona del Umbral (Sills Zone) (SZ); 11, Región Peninsular Central (Central Peninsular Region) (CP); 12, Cuenca Guaymas (Guaymas Basin) (GB); 13, Región Continental Central (Central Continental Region) (CC); 14, Región Continental Sur (South Continental Region) (SC); 15, Cuenca Farallón (Farallón Basin) (FB); 16, Región Peninsular Sur (South Peninsular Region) (SP); 17, Bahía la Paz (La Paz Bay) (PB). En azul áreas utilizadas para el presente estudio.....	26
3    Microsatélites con primers, distribuidos por longitud del motivo repetitivo .....	32
4    Distribuciones de $\theta$ obtenidas en Migrate-n. A, distribución normal; B, distribución no convergente.....	43

## Lista de tablas

Tabla	Página	
1	Número de organismos analizados (n) por zona y subzonas (ver Figura 1).....	24
2	Tabla regionalización para el análisis de flujo genético. PE, Remolinos Peninsulares (Peninsular Eddies); BC, Canal de Ballenas (Ballenas-Salsipuedes Channel); CC, Región Continental Central (Central Continental Region); PB, Bahía la Paz (La Paz Bay); SP, Región Peninsular Sur (South Peninsular Region). * Sólo incluidos en el análisis de mtDNA .....	30
3	Número de secuencias obtenidas de la secuenciación del pepino de mar.....	32
4	Loci descartados por resultados negativos en la fase de experimentación.....	34
5	Caracterización de microsatélites finales. Ta, temperatura de anillamiento; n, número de individuos; N <sub>A</sub> , número de alelos, HO, heterocigosis observada; HE, heterocigosis esperada; PHW, valor P equilibrio de Hardey Weinberg; números de acceso de cada secuencia en GenBank. ....	35
6	Microsatélites seleccionados, fluoróforo utilizado y tamaño esperado .....	36
7	Marcadores en desequilibrio HW (en azul) y déficit de heterocigotos (*) por subzona. TPS, total por subzona; TPL, total por locus.....	37
8	Marcadores con presencia de alelos nulos (en rosa) para cada subzona. En gris celdas sin datos para el análisis.....	37
9	Resultados del AMOVA con secuencias de región control (3 grupos Mex, ECU y GAP) .....	38
10	Resultados del AMOVA con secuencias de región control (solo subzonas de México) .....	38
11	Matriz de $\phi_{st}$ pareada, AMOVA región control mitocondrial sin considerar Sudamérica (inferior, valores de $\phi_{st}$ ; superior, valor-p. *= valores significativos posterior a la corrección de Bonferroni) .....	39
12	AMOVA de microsatélites .....	40
13	AMOVA de microsatélites (locus por locus) .....	40
14	Matriz de $\phi_{st}$ pareada, AMOVA microsatélites (inferior, valores de $\phi_{st}$ ; superior, valores-p. *= valores significativos posterior a la corrección de Bonferroni) .....	41
15	Tamaños efectivos (Ne hembras) por área estimados con RC mitocondrial (IC = intervalos de confianza al 95%). *= distribución mal representada .....	43
16	Número de migrantes por generación (Nm) por área estimado con RC mitocondrial	43
17	Tamaños efectivos (Ne) por área estimados con microsatélites (IC = intervalos de confianza al 95%).....	44

18	Número de migrantes por generación (Nm) por área estimado con microsatélites ...	44
19	Matriz de conectividad. Estrato somero (profundidad de origen 0 a 20 m), los sitios de liberación se encuentran en blanco sobre negro. PF, profundidad final; %TA, porcentaje total por área; %TP, porcentaje total por profundidad final. Se omiten valores de conectividad = 0%. .....	45
20	Matriz de conectividad. Estrato profundo (profundidad de origen 20 a 60 m), los sitios de liberación se encuentran en blanco sobre negro. PF, profundidad final; %TA, porcentaje total por área; %TP, porcentaje total por profundidad final. Se omiten valores de conectividad = 0%. .....	46

## Lista de anexos

Anexo	Tabla	Página
1	Listado de individuos de <i>I. fuscus</i> utilizados en el proyecto .....	61
2	Heterocigosis y equilibrio de HW para 8 loci microsatelitales en todas las subzonas (* locus en desequilibrio de HW) .....	68
3	Matriz de Fst pareada, AMOVA microsatélites utilizando solo el marcador Ifus4-03, (inferior, valores de Fst; superior, valores-p. *= valores significativos posterior a la corrección de Bonferroni) .....	72

# 1. Introducción

## 1.0.1 Biología de las holoturias

Las holoturias o pepinos de mar pertenecen a la clase de los Holoturoideos dentro del Filum Echinodermata (Brusca y Brusca, 2003), de las cuales existen en la actualidad poco más de 13,000 especies descritas en el mundo (Herrero Perezrul, 2004).

Este grupo alberga especies con una gran variedad de tallas que pueden ir de 0.5 cm hasta 2 m de longitud (Hendler, 1995). Su cuerpo es alargado en el sentido oral-aboral con forma de cilindro, con la boca rodeada por tentáculos en el extremo anterior y ano en el extremo posterior. La simetría pentámera que caracteriza al grupo de los equinodermos se guarda en el acomodo de los órganos internos. La pared del cuerpo es delgada en los órdenes Apodida y Molpadida, y más gruesa en los otros órdenes, particularmente en el Aspidochirota (Conand, 1998; Purcell et al., 2012).

El tracto digestivo se compone de faringe, esófago, estómago e intestino. El sistema reproductivo de consta de una sola gónada. En su mayoría son gonocóricos y no presentan dimorfismo sexual externo (Brusca y Brusca 2003). Presentan un sistema vascular de agua característico que se compone por el lumen de los tentáculos bucales y los pies ambulacrales, un anillo de agua alrededor del esófago, los canales radiales, el canal madreporico y las vesículas de Poli (Brusca et al., 2005; Conand, 1998; Purcell et al., 2012).

Las holoturias se encuentran distribuidas en todos los océanos desde altas latitudes, hasta aguas tropicales, desde la zona nerítica hasta la abisal. Son organismos bentónicos en su etapa adulta, ocupando una gran variedad de sustratos o siendo epibiontes en plantas o invertebrados (Conand, 1998).

*Isostichopus fuscus*, también nombrado comúnmente pepino de mar café, pertenece al orden Aspidochirota dentro de la familia Stichopodidae. Esta especie se distribuye en la costa este del Pacífico, desde el Golfo de California hasta Ecuador y las Islas Galápagos (Deichmann, 1958). Habita comúnmente en fondos coralinos o rocosos (Reyes-Bonilla et al., 2008) y ocasionalmente en fondos arenosos y fangosos (Kerstitch, 1989) en el este del Pacífico tropical. Se encuentra principalmente en aguas someras, desde los 0 a los 40 metros (Reyes-Bonilla et al., 2008) y hasta los 61 m de profundidad de acuerdo con Kerstitch (1989). Son organismos con hábitos muy sedentarios (Lohr, 2003), la mayor actividad se presenta durante la noche (Shepherd et al., 2004). Los organismos de esta especie son gonocóricos, aunque se ha presentado hermafroditismo casual (Herrero-Pérezrul et al, 1998). La proporción sexual se ha estimado en 1:1 en poblaciones de Isla Espíritu Santo (Herrero-Perezrul et al, 1999) y en 1.65:1 (hembras : machos) en un estudio realizado desde en la costa este del Golfo de California, desde San Felipe hasta el paralelo 28 (Pañola Madrigal, 2016).

*Isostichopus fuscus* es un organismo de lento crecimiento con una edad de primera madurez tardía calculada entre los 4 y 5 años, lo que lo hace propenso a la sobrepesca. Llega a medir hasta 30 cm de longitud y pesar 800 g, la talla y el peso promedio oscilan entre los 23 cm y los 350 g (Herrero-Perezrul et al., 1999).

El ciclo reproductivo de esta especie de pepino de mar varía a lo largo de su distribución geográfica. Mientras que en las poblaciones de las Islas Galápagos se ha reportado actividad reproductiva durante todo el año con desoves cada mes, independientemente de la temperatura del mar (Mercier et al., 2007), en el Golfo de California las poblaciones muestran un ciclo anual cuya madurez inicia en abril y se intensifica en agosto (Singh Cabanillas y Véles Barajas, 1996). Desoves asociados al aumento de la temperatura se han reportado de junio a noviembre, con una mayor intensidad en agosto, (Herrero-Perezrul et al., 1999; Pañola Madrigal, 2016)

*Isostichopus fuscus* presenta fertilización externa y de 3 a 15 días posteriores a la fertilización se desarrolla una larva planctotrófica (Hamel et al., 2003) que se alimenta de microalgas en la columna de agua durante esta etapa de dispersión (Purcell et al., 2012). El asentamiento de organismos juveniles se ha observado en condiciones de laboratorio en un tiempo de 28 días a partir de la fecundación (Hamel et al., 2003). El éxito en la fertilización ha demostrado densidad-dependencia en poblaciones de Islas Galápagos, requiriéndose densidades de  $\sim 1.2 \text{ ind m}^{-2}$  para alcanzar un 50% de éxito en la fecundación (Shepherd et al., 2004). La densidad reportada para poblaciones del Golfo de California varía geográficamente, sin embargo es evidente un descenso en la última década, con estimaciones en Bahía de los Ángeles de 0.27 y  $0.15 \text{ ind m}^{-2}$  en 2005-2007 y 2013 respectivamente (Glockner-Fagetti et al., 2016).

Las especies del orden Aspidochirota tienen pocos depredadores animales. El efecto ecológico de *I. fuscus* sobre las comunidades arrecifales reside en su capacidad para procesar cantidades importantes de sedimento, dados sus hábitos alimenticios detritívoros (Conand, 1998).

### **1.0.2 Pesquería de *I. fuscus***

Desde hace miles de años las holoturias han sido cosechadas comercialmente (Conand, 1998), sin embargo, en el continente americano la pesquería del pepino de mar no es una pesquería tradicional, la apertura de nuevas zonas de pesca en Norte América a finales de la década de los 70 (California Department of Fish and Game, 2008) y en Ecuador a finales de la década de los 80 (Toral-Granda, 2008) se vio propiciada por el alto precio del producto (Herrero-Pérezrul y Reyes-Bonilla, 2008). La mayor parte de la captura se exporta a países asiáticos, donde se consumen crudas las paredes y vísceras, se comercializan tras un proceso de deshidratación como béche-de-mer, trévang o hai-sum (Conand, 1998; Singh Cabanillas y Véles Barajas, 1996).

Actualmente Ecuador, México, Panamá y Perú son los países que explotan *I. fuscus* con fines comerciales (Verónica Toral-Granda, 2008). De manera general el método de pesca de esta especie se basa en la extracción manual por medio de buceo semiautónomo tipo “hooka” en embarcaciones menores (Avendaño Ceceña, 2007). Las profundidades de extracción son variables para cada país y sitio de pesca. Sin embargo, la mayor parte de realiza entre 5 y 20 metros. En Bahía de los Ángeles, en el Golfo de California, se ha reportado un aumento en la profundidad de captura en los meses de invierno, llegando hasta los 25 m y en menor proporción a más de 27m (De Miras et al., 1996; Avendaño Ceceña, 2007).

En México, el Golfo de California representa la fuente principal de este recurso, en el caso de *I. fuscus* se ha reportado una captura máxima histórica de 1800 toneladas en 1991, sin embargo la captura anual promedio fue de alrededor de 300 toneladas (Herrero Pérezrul y Chávez, 2005). Actualmente los principales mercados para esta especie son Hong Kong y Estados Unidos, donde el precio por organismo fresco es de 1.4 USD (Purcell et al., 2012).

A finales de los años ochenta, México se incorporó a la captura mundial de holoturoideos, abriéndose la pesquería en la península de Baja California y en algunos estados del Pacífico mexicano (Herrero Perezrul, 2004). Dada la creciente demanda y falta de regulaciones, la pesca se desarrolló sin control y la disminución en la captura evidenció indicios de sobreexplotación (Singh Cabanillas y Véles Barajas, 1996; Herrero Perezrul, 2004). Las poblaciones de *I. fuscus* disminuyeron drásticamente en 5 años de modo que en 1994 fue enlistada en la NOM-059-ECOL-1994 como especie en peligro de extinción y su pesca fue vetada totalmente. Dicha norma se modificó en el año 2000 trasladando a *I. fuscus* a la categoría de “sujeta a protección especial”. Actualmente se encuentra enlistada en esa misma categoría dentro de la NOM-059-SEMARNAT-2010, de modo que la especie puede ser aprovechada nuevamente bajo condiciones especiales establecidas por la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) a través de la Dirección General de Vida Silvestre (DGVS) en la Ley General de Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente (LGEEPA) y en la Ley General de Vida Silvestre (LGVS).

Dados la importancia económica de esta especie de pepino de mar y el alarmante declive en su densidad demográfica, el presente trabajo busca extender el conocimiento sobre su ecología poblacional a través del entendimiento de su dispersión y reproducción a lo largo del Pacífico Mexicano, evaluando los niveles de conectividad genética a diferentes escalas espaciales. Los resultados de este trabajo generarán conocimiento del estado genético de la especie y aportarán nuevas herramientas moleculares para futuros estudios.

## **1.1 Antecedentes**

### **1.1.1 Diversidad genética**

Un gran número de especies de importancia comercial se ven afectadas en sus tamaños poblacionales debido a la sobreexplotación. La reducción de los tamaños poblacionales está asociada comúnmente con la pérdida de diversidad genética debido a la deriva génica y a altos niveles de endogamia (Smith, 1996; Rocha y Gasca, 2007). Dicha pérdida de diversidad trae como consecuencia una disminución en la adecuación y en la habilidad para responder a cambios ambientales (Hedrick, 2001). La población se ve mayormente afectada por factores estocásticos a medida que disminuye su tamaño. De esta manera se continúa perdiendo diversidad a medida que aumenta la endogamia y la deriva, lo que lleva a las poblaciones a la extinción.

Tomando en cuenta que la diversidad genética permite que los organismos enfrenten enfermedades, parásitos, depredadores y cambios ambientales (Hedrick, 2001), es necesario el conocimiento de la estructura genética de las poblaciones de especies de importancia comercial ya que ayuda a la gestión de la explotación cuidadosa de los recursos y la preservación de una diversidad genética sostenible (Sherwin y Moritz, 2000).

### **1.1.2 Marcadores moleculares**

La evaluación de la diversidad genética y de otros parámetros como la estructura y el flujo de genes se puede realizar usando diversos marcadores moleculares, cada uno con características particulares. Algunos de los más utilizados en la genética de la conservación son el ADN mitocondrial (mtDNA) y los microsatélites.

El mtDNA permite determinar historias filogeográficas y estructura poblacional de las especies, porque es de herencia uniparental y no se recombina (Rocha y Gasca 2007). También nos permite conocer el flujo genético (Lohr, 2003). La región de control del ADN mitocondrial se ha utilizado en una gran variedad de estudios para determinar la diferenciación intraespecífica para varios taxones, incluyendo pepinos de mar (Lohr, 2003).

Los microsatélites, o secuencias simples repetidas, son secuencias repetitivas de ADN cuyos motivos cortos, de 1 a 6 pares de bases, se repiten en tándem un número variable de veces (González, 2003; Rocha y Gasca, 2007). En contraste con otros marcadores moleculares, los microsatélites son muy polimórficos, tienen herencia mendeliana, son codominantes y selectivamente neutros (Rocha y Gasca, 2007; FAO, 2010). Otra característica importante de los microsatélites que los convierte en herramientas adecuadas para estudios de genética de la conservación de poblaciones en especies en peligro de extinción es que

están basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), por lo que se pueden amplificar a partir de muestras de tejido, como de pelo, heces, hueso, plumas, biopsias y sangre, de modo que no es necesario el sacrificio de los individuos a estudiar (González, 2003). Por otra parte su elevada tasa de mutación respecto a otros marcadores permite resolver divergencias genéticas más recientes.

### **1.1.3 Patrones de conectividad en el Golfo de California**

La mayoría de los animales marinos tienen estadios larvarios planctónicos (Riginos et al., 2011). En muchos animales marinos el flujo génico es elevado, ya que su estadio larvario planctónico les permite desplazarse largas distancias (Riginos y Nachman, 2001). Asimismo, la deriva génica y la adaptación local que generan la estructuración de las poblaciones se ven contrarrestadas por el flujo génico. De acuerdo con Slatkin (1993), cuando la deriva y el flujo génico se aproximan al equilibrio en un modelo de dispersión “stepping stone”, podemos esperar un aislamiento por distancia.

Se ha investigado el flujo génico en diversos grupos de invertebrados bénticos con larvas pelágicas, como crustáceos, moluscos y equinodermos, y su relación con la circulación del océano, donde la mayoría la estructura y flujo génico de las poblaciones son atribuidos a las duración de la larva pelágica (Soliman et al., 2012). Sin embargo, se ha observado que poblaciones geográficamente próximas a menudo tienen una mayor diferenciación genética que las poblaciones geográficamente distantes. Este patrón de diferenciación descrito por Hellberg y colaboradores (2002) como “parches caóticos” se ha observa entre individuos adultos y reclutas de una misma población. Se atribuye principalmente a un origen variable de los reclutas ocasionado por las corrientes, a selección sobre etapas tempranas del desarrollo de los organismos y a la baja tasa de éxito en el reclutamiento.

El único estudio sobre la variabilidad genética de *I. fuscus* es el realizado por Lohr (2003) y sus resultados coinciden con el postulado de aislamiento por distancia. Lohr utilizó secuencias de ADN mitocondrial del gen COI y de la región control para evaluar la diversidad, estructura y flujo genético de tres sitios geográficamente separados: la costa de Ecuador, las Islas Galápagos (IG) y el Golfo de California (GC). En sus resultados fue muy evidente la disminución del flujo génico entre localidades distantes al obtener valores de  $F_{st}$  de 0.026 entre la costa de Ecuador e IG, así como 0.55 y 0.47 entre GC e IG y GC y la costa de Ecuador respectivamente. Esta tendencia también fue evidente en la estimación del flujo genético ( $Nm$ , migrantes por generación) con valores de 18.81 entre la costa de Ecuador e IG, y 0.41 y 0.55 entre GC e IG y GC y la costa de Ecuador respectivamente.

Dentro del Golfo de California se han realizado diferentes estudios de variabilidad genética con peces asociados a arrecifes rocosos, en los que se ha utilizado secuencias de ADN mitocondrial para inferir

patrones históricos de divergencia, que en su mayoría han sido atribuidos a eventos de vicarianza en la península de Baja California.

Bernardi et al. (2003) estudiaron la composición genética de poblaciones de 12 especies de peces separadas geográficamente por la península utilizando secuencias de mtDNA (región control y citocromo b). En los resultados fueron evidentes dos patrones de relaciones filogenéticas. En el primero, que corresponde a la mayoría de la especies estudiadas (ocho especies, 66%), se encontraron relaciones filogenéticas que agrupaban los individuos del Golfo de California y Pacífico en dos clados distintos, con diferencias fijadas y bajos niveles de flujo genético entre ellos. En este grupo de especies separadas, la divergencia genética entre Golfo de California y las poblaciones del Pacífico varió entre 11.6% y el 1.06% en la región control y 2.21% a 1.34% para citocromo b. Los valores de  $F_{st}$  de flujo genético varían entre de 0.97 a 0.51 ( $Nm$  entre 0.01 y 0.48 migrantes por generación). El segundo patrón involucra las relaciones filogenéticas intraespecíficas de cuatro especies, dentro de las cuales las poblaciones del Pacífico y el Golfo de California no se separaron en clados distintos y mostraron altos niveles de flujo genético. Sus valores de  $F_{st}$  variaron de 0.00 a 0.02 ( $Nm > 27$  migrantes por generación).

En otro estudio similar, Riginos (2005) analizó cinco especies comúnmente asociadas a arrecifes rocosos en las regiones norte y centro del Golfo de California con estadios larvarios planctónicos. Para las cinco especies de peces la estructura genética corresponde con las regiones biogeográficas (norte y central) del Golfo de California. El patrón de concordancia filogeográfica fue más notorio para 3 de las 5 especies, en las que fue evidente una monofilia recíproca de haplotipos de entre los peces de las regiones norte y central del Golfo. De manera similar, la estructura de la población a nivel regional destaca notablemente para estas tres especies ( $F_{st} = 0.35, 0.75$  y  $0.78$ ). De acuerdo con Riginos (2005), la concordancia genealógica de estas tres especies apunta a un factor común que ocasionó una ruptura genética en la misma ubicación geográfica.

Tanto el trabajo de Bernardi et al. (2003) como el de Riginos (2005) concuerdan en parte con los eventos de vicarianza del Mioceno tardío al Pleistoceno medio propuestos por Riddle et al. (2000). Sin embargo, un estudio más reciente (Hurtado et al., 2010) en el que se estudió la variación genética de poblaciones de isópodos del género *Ligia* (distribuido en el intermareal rocoso del Pacífico desde el centro de California hasta el centro de México, incluyendo el Golfo de California), encontró patrones inconsistentes con lo propuesto por Riddle. Sin embargo, al igual que en los otros estudios dichos patrones se atribuyen a eventos pasados de vicarianza. Los autores establecen que bajo dicha hipótesis, se esperaría una monofilia recíproca entre las poblaciones de la península y las poblaciones de la costa continental del golfo (como fue demostrado en los estudios previos). Sin embargo, los linajes de *Ligia* del sur de la península están más estrechamente relacionados con los linajes de la parte continental (al sur de 29° N de latitud aprox.) que

con los del norte de Baja California y con los linajes de la parte norte del continente. Además, los linajes de la región del Cabo están más estrechamente relacionados con los linajes de la parte sur del continente (al sur de 25° N latitud) que con cualquier otro linaje de la península. Esto contrasta notablemente con la sugerencia Riddle de que la región del Cabo de la península fue la primera parte en separarse de la parte continental.

Tomando en cuenta estos antecedentes y considerando que a diferencia de los isópodos del género *Ligia*, *L. fuscus* cuenta con una etapa larvaria pelágica de 28 días, se espera que la circulación del Golfo de California tenga un efecto notorio en la dispersión larval de este pepino de mar y en consecuencia niveles bajos de diferenciación que podrían incrementarse entre sitios geográficamente distantes (Alto Golfo – Boca del Golfo), mismos que podrían estar influenciados por eventos de vicarianza en la península de Baja California.

## 1.2 Justificación

La pesquería del pepino de mar *I. fuscus* representa una fuente de ingresos importante para diferentes poblados a lo largo de la península de Baja California. El alto valor comercial y las características biológicas de *I. fuscus* (madurez sexual tardía, lento crecimiento, sedentarismo, denso-dependencia en la eficiencia reproductiva, hábitat de fácil acceso) han propiciado su sobreexplotación. Su densidad poblacional ha disminuido drásticamente en las últimas dos décadas.

Es necesario el conocimiento de la variabilidad genética de las poblaciones de *I. fuscus* que se distribuyen en el Golfo de California a fin de dirigir los esfuerzos de conservación y manejo de sus poblaciones, e identificar aquellas que pueden resultar fundamentales para preservar la diversidad genética de la especie dentro de esta área geográfica.

### **1.3 Hipótesis**

Tomando en cuenta los resultados obtenidos por Lohr (2003), se esperan niveles bajos de estructuración dado el potencial efecto de las corrientes sobre el tiempo de la larva pelágica, en esta diferenciación se espera un patrón de aislamiento por distancia que podría estar influenciado por eventos de vicarianza en la península de Baja California, esperando un patrón similar al observado por Riginos (2005) entre regiones biogeográficas.

### **1.4 Objetivos**

#### **1.4.1 Objetivo general**

Evaluar la diversidad genética y determinar la estructura poblacional genética de *I. fuscus* en el Golfo de California.

#### **1.4.2 Objetivos específicos**

- a) Desarrollar marcadores microsatelitales específicos para *I. fuscus*.
- b) Estimar el flujo genético entre las diferentes unidades de muestreo de *I. fuscus*.
- c) Caracterizar la estructura poblacional de *I. fuscus*.

## 2. Metodología

### 2.1 Área de estudio

#### 2.1.1 Aspectos generales del Golfo de California

El Golfo de California o Mar de Cortés es una extensión del océano Pacífico y se ubica entre la península de Baja California y los estados de Sonora y Sinaloa, al noroeste de México. En cuanto a su longitud rebasa los 1100 km mientras que de ancho va de los 100 a 200 km, conformando así un área superficial de 258,593 km<sup>2</sup> (Lavin y Marinone, 2003). Cuenta con una profundidad promedio de aproximadamente 800 m, sin embargo, la batimetría varía regionalmente. En el alto golfo, el delta del Río Colorado presenta profundidades de 18 m, mientras que al norte de la región de las grandes islas la profundidad alcanza 800 m en la Cuenca Delfín, misma que se extiende hasta el Canal de Ballenas con 1500 m de profundidad. Dentro de la región de las grandes islas existen varios canales con profundidades que van de 300 a 600m (Hernández-Ayón et al., 2013; Lavin y Marinone, 2003; Montaña Cortés, 2015; Nix, 2013) En la boca del golfo se tiene una profundidad máxima de aproximadamente 2500 m en la Cuenca Pescadero (Castro et al., 2000).

La salinidad es un parámetro que no varía significativamente, los 100 metros superficiales representados por la masa de agua GCW (Agua del Golfo de California) mantienen una salinidad cercana a 35 psu (Lavin y Marinone, 2003). De manera general la temperatura superficial del mar presenta una gran variabilidad estacional al igual que los vientos, mismos que influyen en las surgencias. En invierno, la temperatura superficial del mar va de 14°C a 21°C, en dicha estación los vientos del noroeste generan una surgencia que se extiende por la costa continental del golfo. Por otra parte, en verano, la temperatura mantiene entre 28°C y 31°C, el viento del sureste genera surgencias a lo largo de la península de Baja California (Roden, 1958).

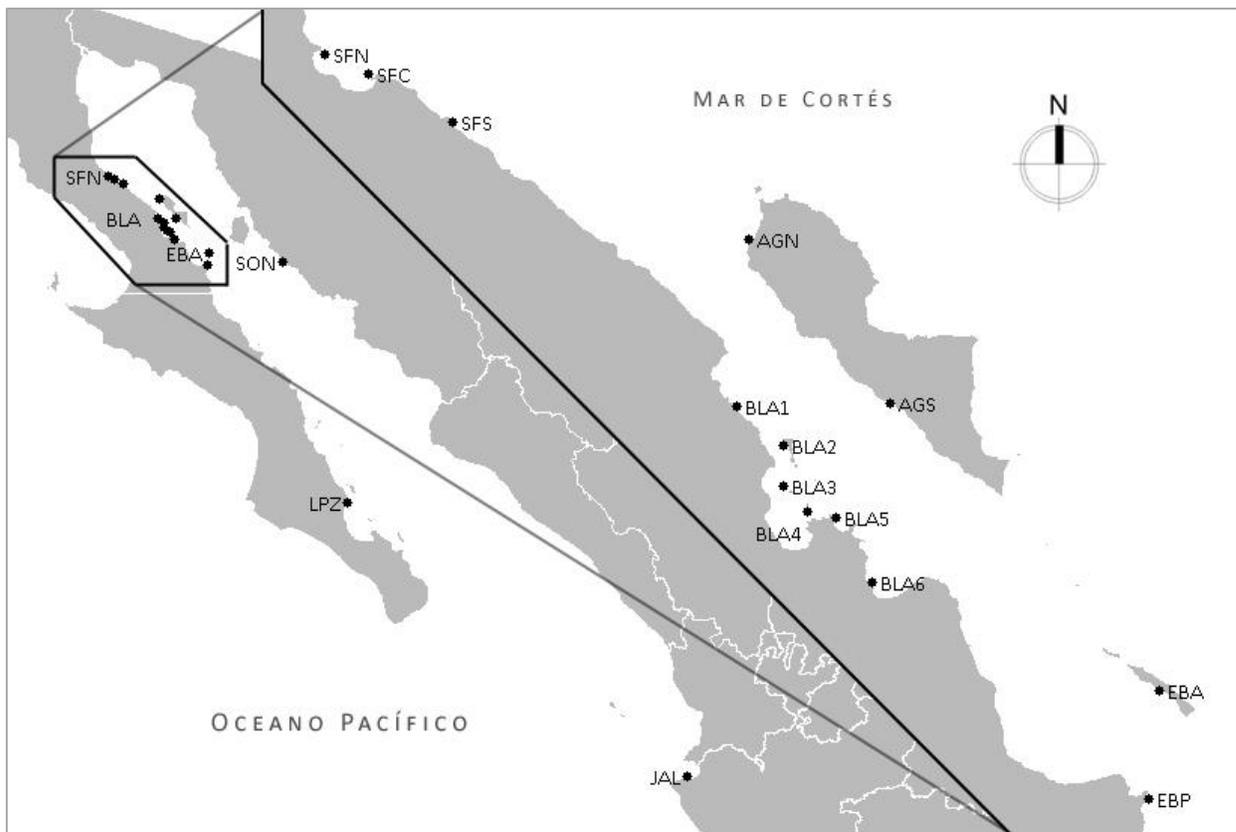
La circulación superficial en el Golfo de California presenta una estacionalidad muy marcada. Los patrones generales corresponden a giros estacionales reversibles. En la parte norte del golfo se tiene un giro ciclónico de junio a septiembre y anticiclónico de noviembre a abril. En el sur del golfo se presenta una circulación anticiclónica en invierno y ciclónica en verano (Lavin y Marinone, 2003).

## 2.2 Muestreo

### 2.2.1 Localidades de muestreo

Las muestras se obtuvieron de seis zonas: San Felipe, Bahía de los Ángeles, El Barril, Sonora, La Paz y Jalisco; distribuidas a lo largo del Golfo de California, desde el Alto Golfo, hasta la costa norte de Jalisco. Las zonas de San Felipe, Bahía de los Ángeles y El Barril a su vez se componen de varias subzonas, lo que permitió una mayor resolución del estudio y un tamaño de muestra más homogéneo (Figura 1, Tabla 1). La colecta de tejido se efectuó de octubre de 2014 a abril de 2016. Se colectaron un total de 1041 muestras para conformar un banco de tejidos del cual se seleccionaron las muestras para este trabajo.

Además, se utilizaron las secuencias de Región Control mitocondrial del trabajo de Lohr (2003) provenientes de Bahía Concepción ( $26^{\circ}38.27' N - 111^{\circ}49.01' O$ ) (Figura 1), Ayangue, Ecuador ( $2^{\circ}2.27' S - 80^{\circ}45.89' O$ ) e Islas Galápagos ( $0^{\circ}36.89' N - 90^{\circ}40.59' O$ ) para la evaluación de estructura y flujo genético a mayores escalas geográficas.



**Figura 1** Distribución geográfica de los sitios de muestreo

**Tabla 1** Número de organismos analizados (n) por zona y subzonas (ver Figura 1)

Zonas	Subzonas	n	Fecha de colecta	Autor
San Felipe	SFN	19	Feb 2015, abr 2015	Presente trabajo
	SFC	20	Feb 2015, abr 2015	
	SFS	19	Feb 2015	
Bahía de los Ángeles	BLA1	21	Nov 2014, mar 2015	
	BLA2	20	Oct 2014, ene 2015, may 2015	
	BLA3	18	Ene 2015, mar 2015, may 2015	
	BLA4	22	Ene 2015	
	BLA5	24	Nov 2014, ene 2015, may 2015	
	BLA6	22	Nov 2014, mar 2015	
	AGN	16	Mar 2015	
El Barril	AGS	16	Nov 2014	
	EBA	20	Dic 2014, jun 2015	
	EBP	24	Dic 2014, jun 2015	
Sonora	SON	20	Ene 2016	
La Paz	LPZ	20	Dic 2015	
Jalisco	JAL	6	Mar 2016	
<b>Total (este trabajo)</b>		<b>307</b>		
Bahía Concepción	CONC	8	Jun 2001	Lohr, 2003
Ecuador	ECU	16	-	
Islas Galápagos	GAP	20	Dic 1999	
<b>Total (Lohr, 2003)</b>		<b>44</b>		

### 2.2.2 Colecta de material biológico

El material biológico que se utilizó para este trabajo fue colectado entre octubre de 2014 y marzo de 2016, en 42 localidades diferentes distribuidas en las 6 zonas mencionadas, sumando un total de 307 individuos (Tabla 1; Tabla 1 del anexo).

En campo se emplearon transectos de banda de 2 m de ancho por 25 m de largo, de tal manera que se cubría una superficie de 50 m<sup>2</sup> por transecto. En todos los casos participaron dos buzos (pescadores profesionales previamente capacitados), utilizando equipo semi-autónomo (hooka) y un técnico que permaneció en la embarcación. El objetivo fue realizar al menos 3 caídas por día. En cada sitio se colectó tejido de aproximadamente 10 individuos y se fijó en etanol al 96%.

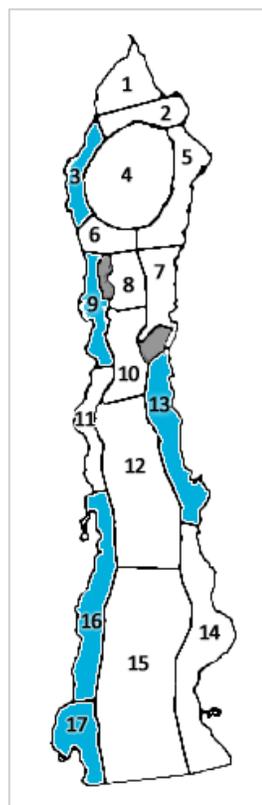
### 2.3 Modelo numérico Euleriano

Con la finalidad de estimar la conectividad por advección de corrientes del Golfo de California, se utilizaron los datos de conectividad generados por un modelo de circulación tridimensional (HAMSOM) del Golfo de California desarrollado por (Montaño Cortés, 2015). Este modelo simula la dispersión de partículas a partir de 17 áreas distintas (Figura 2) y la conectividad entre ellas. La resolución horizontal del modelo es de

~1.3×1.5 km y es forzado por mareas, vientos y flujos de calor y agua estacionales en la superficie e hidrografía estacional en la boca del golfo (Montaño Cortés, 2015).

Para este estudio se utilizaron datos de conectividad entre las 5 áreas correspondientes a los sitios de muestreo (Figura 2) y profundidad final promedio de las partículas después de cuatro semanas. Se hicieron simulaciones para los meses de julio, agosto y septiembre, considerando cuatro capas de liberación: 0 a 10 m, 10 a 20 m, 20 a 30 m y 30 a 60 m. Las 4 capas se integraron en dos para formar una matriz con origen de liberación somero con datos de 0 a 20 m (Tabla 19), y otra con origen de liberación profundo de 20 a 60 m (Tabla 20), de tal manera que los valores en cada matriz representan la probabilidad de conectividad (% de partículas que arribaron al área) promediados para los tres meses y dos capas de profundidad de liberación integradas en cada matriz.

Los meses que se eligieron corresponden al tiempo de mayor desove de *I. fuscus* en el Golfo de California y la integración de los datos en dos capas de profundidad se utilizó para comparar la conectividad entre las áreas potenciales de explotación (<20 m) y las áreas que se encuentran fuera del alcance de la pesquería (>20 m).



**Figura 2** Áreas del modelo tridimensional de Montaño-Cortéz (2015). 1, Alto Golfo (Upper Gulf) (UG); 2, Conexión Alto Golfo y Remolino Estacional (Buffer Zone) (BZ); 3, Remolinos Peninsulares (Peninsular Eddies) (PE); 4, Remolino Estacional (Seasonal Eddy) (SE); 5, Sonora (The Northern Coast of Sonora) (SO); 6, Cuenca Delfín (Delfín Basin) (DB); 7, Norte de la Isla Tiburón (North of the Tiburón Island) (TI); 8, Ángel de la Guarda (East of the Ángel de la Guarda Island) (AG); 9, Canal de Ballenas (Ballenas-Salsipuedes Channel) (BC); 10, Zona del Umbral (Sills Zone) (SZ); 11, Región Peninsular Central (Central Peninsular Region) (CP); 12, Cuenca Guaymas (Guaymas Basin) (GB); 13, Región Continental Central (Central Continental Region) (CC); 14, Región Continental Sur (South Continental Region) (SC); 15, Cuenca Farallón (Farallón Basin) (FB); 16, Región Peninsular Sur (South Peninsular Region) (SP); 17, Bahía la Paz (La Paz Bay) (PB). En azul áreas utilizadas para el presente estudio.

## 2.4 Desarrollo y caracterización de microsatélites

### 2.4.1 Secuenciación y ensamble del genoma de *I. fuscus*

Para la secuenciación del genoma del pepino de mar se utilizó tejido fresco de los tentáculos de dos individuos provenientes de La Paz, Baja California Sur. Con el tejido se llevó a cabo la extracción y purificación de ADN genómico, el cual se secuenció mediante NGS (Secuenciación de Nueva Generación). El ADN purificado se usó para construir bibliotecas genómicas True Seq para la secuenciación masiva tipo “shotgun” con el sistema HiSeq 2500 de Illumina (CINVESTAV-Langebio).

La información en bruto fue procesada a través de diferentes análisis bioinformáticos. Primero se sometió a un control de calidad con los programas FastQC v 0.10.1 (Babraham Institute, Cambridge, UK) (Andrews, 2010) y CLC Genomics Workbench. 7.0.3 (CLC Bio, Boston, MA). Las secuencias aceptables en términos de

calidad se utilizaron para el ensamble de novo mediante el programa CLC Genomics Workbench, en el que se ensamblaron los fragmentos individuales en fragmentos de mayor tamaño denominados contigs.

Los detalles metodológicos se encuentran descritos por Bisbal-Pardo (2015).

#### **2.4.2 Identificación y selección de loci microsatelitales**

Los contigs obtenidos del ensamble genómico fueron exportados en formato FASTA al programa Msatcommander (Faircloth, 2008). Este programa permite localizar loci microsatelitales dentro del genoma y a su vez identificar aquellos con espacio suficiente en las regiones flanqueantes para el diseño de iniciadores (primers). Los parámetros del programa fueron configurados para buscar amplicones de 450 pb o menos, con microsatélites perfectos cuyos motivos fueran de dos a seis nucleótidos y se repitieran por lo menos 6 veces.

Posteriormente, se llevó a cabo el proceso de selección de microsatélites tomando en cuenta los siguientes criterios. (1) Para evadir artefactos resultantes del ensamble se utilizó como primer criterio la cobertura promedio de los contigs y el porcentaje de lecturas pareadas (paired reads). La cobertura promedio se define como el total de nucleótidos obtenidos en las lecturas (reads), dividido entre el número de nucleótidos totales en la secuencia consenso. Se utilizaron secuencias con valores entre 10 y 100, dejando fuera intencionalmente secuencias con valores muy altos debido a la abundante presencia de indels. (2) De las secuencias resultantes se seleccionaron aquellas con 10 o más repeticiones del motivo, para obtener loci útiles para estudios de genética poblacional (Gardner et al., 2011). (3) Finalmente, los loci se seleccionaron mediante una revisión manual usando el programa CLC sequence viewer, donde se analizó la profundidad de la cobertura en el aplicón, particularmente en la ubicación de los iniciadores y el microsatélite, buscando los mejor representados.

#### **2.4.3 Extracción de ADN, experimentación y obtención de datos**

A los iniciadores de los microsatélites seleccionados se les añadió la secuencia M13 (TGTAACGACGGCCAGT) descrita por Schuelke (2000) en el extremo 5'. La secuencia M13 conformada por 18 nucleótidos posibilita la incorporación de una molécula fluorescente (6-carboxilfluoresceína (FAM), PET, NAD o VIC), que posteriormente permite la identificación de alelos diferentes a través de la genotipificación. Dichos iniciadores se mandaron a sintetizar a la compañía IDT (Integrated DNA Technologies, Inc.).

Las secuencias se sometieron a pruebas de amplificación y polimorfismo en una muestra de 22 individuos provenientes de Bahía de los Ángeles. La extracción de ADN se realizó con el kit de extracción PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen). Las extracciones fueron cuantificadas en concentración y calidad del

ADN mediante espectrofotometría utilizando un equipo Nanodrop Lite (Thermo science, Madison, WI, USA) y se verificaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5%.

Para la optimización del perfil de termociclado se utilizó un gradiente de temperatura de 50 a 70 °C para conocer la temperatura óptima de anillamiento. Los microsátélites que mostraron una amplificación positiva fueron probados en 4 individuos que fueron enviados a genotipificación (análisis de fragmentos) mediante electroforesis capilar en el laboratorio SeqXcel (San Diego, CA, USA) con un equipo de análisis genético ABI Prism (Applied Biosystems) utilizando GS600 como tamaño estándar. Una vez que se obtuvieron resultados útiles para un marcador con determinado fluoróforo, entonces se procedió con la amplificación del resto de los individuos.

#### **2.4.4 Análisis de datos**

Los resultados del análisis de fragmentos fueron analizados con el programa GeneMarker v. 2.4.0 (SoftGenetics). En el programa se definieron paneles donde se crearon cada uno de los marcadores microsateles, definiendo con ayuda los electroferogramas los sitios (bins) en donde potencialmente se encontrarían los alelos con un rango de 0.5 bases en cada dirección, tomando en cuenta el tamaño del motivo repetitivo.

Los alelos con señales débiles fueron determinados manualmente. En algunos casos se presentaron con alelos intermedios, es decir, alelos cuyo pico en el electroferograma correspondía a un tamaño intermedio entre dos alelos identificados previamente. En esos casos se tomó como criterio general atribuir dichos picos al alelo inmediato de menor tamaño.

Para cada locus se calculó heterocigosis observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ) utilizando el complemento de Excel MStools (Park, 2001), mientras que el equilibrio de Hardy Weinberg (EHW) y desequilibrio de ligamiento se evaluaron a través del programa ARLEQUIN (Excoffier et al., 2005), con la finalidad de conocer si los loci están sujetos a alguna presión por selección y si segregan de manera independiente. Tanto para el equilibrio de Hardy Weinberg como para el desequilibrio de ligamiento, se corrigió el umbral de significancia de los valores  $p$  mediante la corrección de Bonferroni, ya que en los análisis mencionados anteriormente se prueban múltiples hipótesis simultáneamente, lo que aumenta la probabilidad de obtener un resultado significativo debido al azar. Para contrarrestar este efecto se ajusta el umbral de significancia dividiendo  $\alpha$  entre el número de comparaciones.

### **2.5 Evaluación de variabilidad genética**

Para la evaluación de la variabilidad genética de *I. fuscus* se utilizaron dos tipos diferentes de marcadores. Un fragmento de la Región Control del ADN mitocondrial para el que se utilizaron la mitad de los individuos

totales aproximadamente (151 individuos) considerados para este estudio más las 44 secuencias de Lohr (2003) y los marcadores microsatelitales diseñados previamente para los que se utilizaron todos los individuos (307 individuos).

### **2.5.1 Extracción de ADN**

Para el trabajo con secuencias mitocondriales se extrajo ADN de 156 individuos utilizando el kit de extracción PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen). Las extracciones fueron cuantificadas con espectrofotometría utilizando un equipo Nanodrop Lite (Thermo science, Madison, WI, USA) y se verificaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. Las mismas extracciones fueron utilizadas para el trabajo con microsatélites. Los 151 individuos restantes para el trabajo con microsatélites fueron procesados con resina Chelex 100 (Bio-Rad Laboratories), ya que es un protocolo más sencillo y rápido. Este tipo de extracción descrito por Walsh et al. (1991) utiliza la resina quelante permitiendo la obtención del ADN mediante la inactivación de enzimas que pueden degradar el ADN.

### **2.5.2 Amplificación y genotipificación**

Para amplificar las secuencias de la región control se utilizaron los iniciadores diseñados y probados por Lohr (2003) CUCDL(32)S (GAACGGTCAATCTTGTAAT) y CUCDL(928)A (AAAGCATAGGGAACTCCT), lo que permitió que los datos fueran comparables con los de Ecuador. Para la optimización de dichos iniciadores se utilizó un gradiente de temperatura de anillamiento de 50 a 70°C. Una vez optimizadas las condiciones de PCR, se amplificó este gen para los 156 individuos. Los productos fueron purificados con el kit PureLink® PCR Purification Kit (Invitrogen) y secuenciados en un secuenciador ABI3730XL (Applied Biosystems) (Macrogen USA, Rockville, MD, USA).

De los microsatélites diseñados previamente, ocho fueron utilizados para la evaluación poblacional. Los loci fueron distribuidos en 6 conjuntos para ser amplificados en PCR multiplex (Tabla 9), que se llevaron a cabo con todos los individuos de las 13 subzonas siguiendo las condiciones de PCR definidas con anterioridad. La integridad de los productos se verificó en geles de agarosa al 1.5% y se enviaron a genotipificación (análisis de fragmentos) mediante electroforesis capilar en un secuenciador ABI PRISM 3100 (SeqXcel, San Diego, CA, USA).

### **2.5.3 Análisis de datos**

La calidad de las secuencias de la región control fue analizada con ayuda del programa Codon Code v. 5.1.5 (CodonCode, Deadham, MA) para eliminar los extremos de baja calidad y verificar las mutaciones identificadas. En este mismo programa se alinearon las secuencias y se exportaron en formato FASTA para continuar su análisis. Utilizando el programa MEGA6 (Tamura et al., 2013) se corrigió manualmente la

alineación y se recortaron los extremos. Las secuencias que quedaron muy cortas (<200 pb) fueron desechadas.

Después del control de calidad, las secuencias resultantes fueron procesadas con DNAsp v. 5 (Librado y Rozas, 2009) donde se identificaron los haplotipos distintos. En este paso se incluyeron las secuencias de los haplotipos descritos por Lohr (2003) provenientes de Bahía Concepción, Ecuador e Islas Galápagos. Con el mismo programa se calcularon los índices de diversidad de las muestras mientras que con Arlequin v. 3.5 (Excoffier et al., 2005) se calcularon los índices de fijación  $\phi_{st}$  para probar la hipótesis nula de panmixia mediante un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA), utilizando una matriz de distancias basadas en la proporción de diferencias nucleotídicas (p-distance).

Lo datos obtenidos del análisis de fragmentos de los marcadores microsatelitales fueron analizados con el programa GeneMarker v. 2.4.0 (SoftGenetics) para definir los genotipos. Para cada locus y cada subzona se calcularon la heterocigosis observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ) y se evaluó el equilibrio de Hardy Weinberg (HWE) y desequilibrio de ligamiento con el programa Arlequin v. 3.5 (Excoffier et al., 2005). Con este mismo programa se calcularon los índices de fijación. Además se evaluó el déficit de heterocigosis (Fis) con el programa GENEPOP v.4.4 (Rousset, 2008) y se analizó la posible presencia de alelos nulos con el programa Microchecker v. 2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004).

Para estimar el flujo genético que existe entre poblaciones se empleó modelaje Bayesiano utilizando el modelo I.M. desarrollado por Beerli (2006) en el que se estiman simultáneamente los tamaños efectivos poblacionales y las tasas de flujo genético entre poblaciones con la ayuda del programa Migrate-n 3.6 (Beerli, 2006) Para este análisis se utilizaron tanto las secuencias de región control mitocondrial como los microsatélites. Para la regionalización de este análisis se utilizaron las áreas del modelo tridimensional de circulación del Golfo de California (Figura 2), resultando en un total de 6 grupos para el análisis de las secuencias y 4 en el caso de los microsatélites (Tabla 2).

**Tabla 2** Tabla regionalización para el análisis de flujo genético. PE, Remolinos Peninsulares (Peninsular Eddies); BC, Canal de Ballenas (Ballenas-Salsipuedes Channel); CC, Región Continental Central (Central Continental Region); PB, Bahía la Paz (La Paz Bay); SP, Región Peninsular Sur (South Peninsular Region). \* Sólo incluidos en el análisis de mtDNA

Área:	Subzonas:
3 (PE)	SFN, SFC, SFS
9 (BC)	BLA1, BLA2, BLA3, BLA4, BLA5, BLA6, AGN, AGS, EBA, EBP
13 (CC)	SON
17 (PB)	LPZ, JAL
16 (SP)*	CONC
Sudamérica (SA)*	ECU, GAP

El programa Migrate utiliza el producto de la tasa de mutación  $\mu$  y el tamaño poblacional para expresar los resultados escalados por la tasa de mutación. De esta manera el tamaño efectivo de población ( $\theta$ ) y el número de migrantes por generación (M) escalados por mutación son:

$$\theta_a = xNe_a \mu$$

$$M_{b \rightarrow a} = m_{b \rightarrow a} / \mu$$

donde

$a$  y  $b$  = subpoblaciones

$x$  = escala de herencia (1 para uniparentales, 2 para haploides y 4 para diploides)

$Ne$  = tamaño efectivo de la población

$m$  = migración

$\mu$  = tasa de mutación (mtDNA =  $7.3 \times 10^{-8}$  site<sup>-1</sup>yr<sup>-1</sup>; microsatélites =  $10^{-4}$  locus<sup>-1</sup>gen<sup>-1</sup>)

Para obtener los valores absolutos de tamaño efectivo de la población ( $Ne$ ) y número de migrantes por generación ( $Nm$ ) expresado como la fracción de inmigrantes en la sub población “a” que provienen de la sub población “b”, las ecuaciones son:

$$Ne_a = \theta_a / (x \mu)$$

$$Nm_{b \rightarrow a} = xNe_a m_{b \rightarrow a} = (\theta_a / (x \mu))(M_{b \rightarrow a} / \mu) = \theta_a M_{b \rightarrow a} / x$$

De esta manera, para conocer el tamaño efectivo de determinada población hace falta conocer la tasa de mutación del marcador utilizado, mientras que el número de migrantes por generación se obtiene del producto de  $\theta$  y M. Para los cálculos anteriores, se utilizaron los valores de las medias en las distribuciones de  $\theta$  y M. Asimismo, se tomaron de la literatura tasas de mutación estimadas para microsatélites y región control mitocondrial en especies o grupos cercanos. En el caso de los microsatélites se utilizó el estudio de (Chapuis et al., 2015) como referencia para definir  $10^{-4}$  eventos por locus por generación como una tasa de mutación conservadora. Mientras que para región control  $\mu$  se tomó del pepino de mar *Apostichopus japonicus* con un valor de  $7.3 \times 10^{-8}$  por sitio por año (Sun et al., 2010).

## 3. Resultados

### 3.1 Desarrollo y caracterización de microsatélites

#### 3.1.1 Secuenciación genómica de *I. fuscus* y ensamble

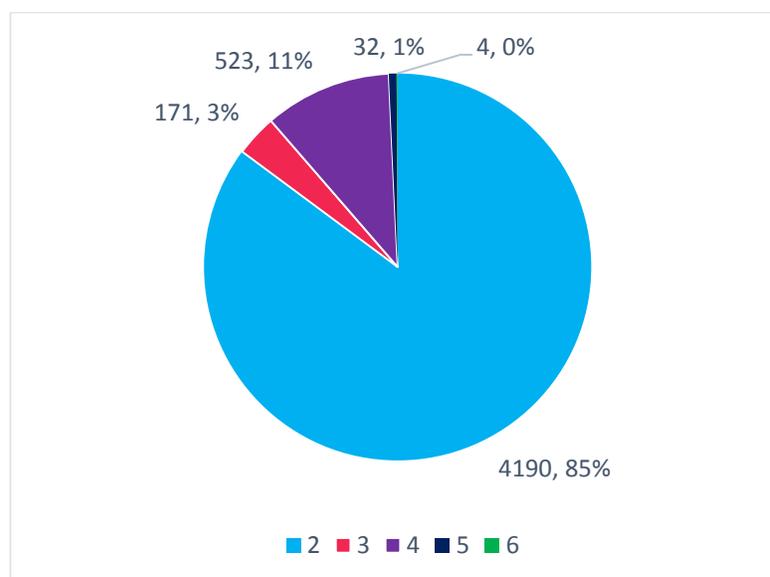
Resultado de la secuenciación genómica se obtuvieron alrededor de 40 millones de lecturas (reads) por cada individuo, sumando un total aproximado de 84 millones de secuencias (Tabla 3). Una vez que fueron procesadas y ensambladas se obtuvieron un total de 581,221 contigs cuya longitud promedio fue de 898 pares de bases.

**Tabla 3** Número de secuencias obtenidas de la secuenciación del pepino de mar

Individuo	Secuencias	Total
ISFU02TENTA	40,075,222	84,843,094
ISFU03TENTA	44,767,872	

#### 3.1.2 Localización y selección de loci microsatelitales

La búsqueda de loci microsatelitales con Msatcommander (Faircloth, 2008) produjo un total de 11,224 microsatélites de los cuales fue posible diseñar cebadores para 4,920 (43.8%), distribuidos en motivos repetitivos de 2, 3, 4, 5 y 6 nucleótidos (Figura 3).



**Figura 3** Microsatélites con primers, distribuidos por longitud del motivo repetitivo

Tomando en cuenta los primeros 2 criterios de selección se eligieron un total de 69 loci microsatelitales, cuyos contigs de localización fueron revisados manualmente para terminar con un listado final de 29 microsatélites repartidos en 15 dinucleótidos, 8 trinucleótidos y 6 tetranucleótidos.

### **3.1.3 Optimización y genotipificación de loci**

Las condiciones resultantes de la optimización de la PCR consistieron en reacciones de 12.5  $\mu$ l. La concentración final de los reactivos por cada reacción fue la siguiente: 0.2 mM de dNTPs, 1X Perkin Elmer Buffer (10mM Tris HCl, 50mM KCl y 2mM MgCl), 0.5  $\mu$ M de cada iniciador, 0.07 U Taq DNA pol (BioLabs) y 35 ng de ADN plantilla.

Los gradientes en la temperatura permitieron establecer una temperatura de anillamiento de 63 °C para todos los microsatélites, lo que posteriormente facilitó el diseño de PCRs multiplex. El perfil de termociclado final consistió en 1 minuto de desnaturalización inicial a 94 °C seguido de 30 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94 °C, 30 segundos de anillamiento a 63 °C y 30 segundos de elongación a 72 °C, terminando con 15 minutos de elongación a 72 °C al final del último ciclo. Para unir el fluoróforo al fragmento amplificado, se realizó una segunda PCR sustituyendo el iniciador sentido por el M13 marcado con uno de los cuatro fluoróforos, cambiando la temperatura de anillamiento a 53 °C y utilizando como ADN plantilla el producto de la PCR anterior. En algunos casos no fue posible lograr la amplificación en el primer intento, por lo que se estandarizó a un máximo de tres intentos por individuo por marcador, con condiciones más permisibles.

Diez de los 29 microsatélites fueron descartados después de las pruebas experimentales debido a resultados no satisfactorios en la PCR o en el análisis de fragmentos. Una de las fallas principales fue la amplificación de fragmentos de tamaño diferente al esperado, dichos productos fueron secuenciados resultando en la ausencia del microsatélite en la secuencia. Lo anterior se atribuye a artefactos en el contig a partir del cual se diseñó el microsatélite. Otras fallas recurrentes fueron amplificaciones no específicas y nulas. Para el marcador Ifus2-12 se obtuvo una amplificación específica y del tamaño esperado; sin embargo, no se lograron resultados que permitieran la identificación de los alelos dada la cantidad de ruido en el electroferograma (Tabla 4).

**Tabla 4** Loci descartados por resultados negativos en la fase de experimentación

Nombre	Contig	Motivo	Iniciadores	Tamaño (pb)	Tipo de falla
Ifus2-08	86773	AG	F ATGGCGTAGTATAGCCGAGC R CTCTGTTATCCGTCCTCCG	365	Ausencia de microsatélite en amplicón
Ifus2-09	24356	AT	F CAGGCGTGTGTTGCATCTAG R GAGATTAACACAGGAGGCCG	433	Ausencia de microsatélite en amplicón
Ifus2-12	50410	AT	F ATCACACGCAACTGTAAGGG R TTTGCGATACTGTGTGTGCC	252	Electroferograma ruidoso
Ifus2-13	273244	AC	F AATGCAGTCAGGATGGTGTG R ACTTCATTACAGTGCGGTC	132	Sin amplificación
Ifus2-15	47785	AC	F AACGTGACCTGAATCCCTCC R TCATGGTTGCATATAAGGCGTG	338	Sin amplificación
Ifus3-03	49130	ATC	F GCCAGACATACGCAGAATGG R TCGTGGCACCATCATCATTG	426	Amplificación no específica
Ifus3-05	118867	ATC	F TTGGATCGTCACCTACCTCG R TGCTATGTCAGAGGCAGGAC	212	Amplificación no específica
Ifus3-07	41014	AAC	F GGGCTAACAACGTCCACATG R GCTTGCGGCGTTATTGC	242	Sin amplificación
Ifus3-08	63581	AAC	F TCAACGTTTCTGTGCCAAC R GGTGGAAAGCAGACGAAAGG	149	Ausencia de microsatélite en amplicón
Ifus4-05	76126	AATC	F CTTGATCCTCCTCTGTGGG R AGGATGTGCATAGCTGTGTCAG	196	Ausencia de microsatélite en amplicón

### 3.1.4 Nivel de polimorfismo de marcadores microsatelitales en una población

Los 19 microsatélites que fueron caracterizados (Tabla 5) mostraron un número de alelos entre 5 y 22. Los valores de heterocigosis observada y heterocigosis esperada van de 0.35 a 1, y de 0.56 a 0.97 respectivamente. Después de la corrección de Bonferroni 6 loci mostraron una desviación significativa del EHW. Los valores de desequilibrio de ligamiento, tras la corrección de Bonferroni indicaron que los marcadores Ifus 2-01 y 2-03 se encuentran potencialmente ligados.

**Tabla 5** Caracterización de microsatélites finales. Ta, temperatura de anillamiento; n, número de individuos; N<sub>A</sub>, número de alelos, HO, heterocigosis observada; HE, heterocigosis esperada; PHW, valor P equilibrio de Hardey Weinberg; números de acceso de cada secuencia en GenBank.

Locus	Motivo	Tamaño (bp)	Ta (°C)	n	N <sub>A</sub>	HO	HE	PHW	No. Acceso
Ifus2-01	(AC)12	130	63	20	7	0.70	0.67	0.89648	KX525270
Ifus2-02	(AC)11	437	63	19	7	0.68	0.77	0.01083	KX525271
Ifus2-03	(AC)11	429	63	20	10	0.95	0.86	0.01791	KX525272
Ifus2-04	(AC)10	287	63	22	6	0.50	0.56	0.23828	KX525273
Ifus2-05	(AG)14	444	63	22	9	0.77	0.87	0.00009*	KX525274
Ifus2-06	(AG)13	365	63	20	6	0.35	0.64	0.00032*	KX525275
Ifus2-07	(AG)10	427	63	22	7	0.91	0.81	0.05913	KX525276
Ifus2-10	(AT)10	379	63	22	5	0.55	0.61	0.38527	KX525277
Ifus2-11	(AG)10	274	63	20	6	0.40	0.57	0.05599	KX525278
Ifus2-14	(AC)12	355	63	20	10	0.80	0.84	0.88271	KX525279
Ifus3-01	(AGG)11	240	63	20	9	0.65	0.88	0.00393	KX525280
Ifus3-02	(ATC)21	378	63	17	13	0.47	0.94	0.00000*	KX525281
Ifus3-04	(ATC)20	291	63	21	15	0.62	0.92	0.00302	KX525282
Ifus3-06	(ATC)11	171	63	19	10	0.68	0.82	0.07809	KX525283
Ifus4-01	(ACAG)11	360	63	20	9	0.60	0.85	0.04123	KX525284
Ifus4-02	(ACAG)18	421	63	15	12	0.73	0.91	0.23215	KX525285
Ifus4-03	(ACAT)12	294	63	20	22	1.00	0.97	1.00000	KX525286
Ifus4-04	(AGAT)18	405	63	12	15	0.42	0.97	0.00000*	KX525287
Ifus4-06	(AGAT)18	222	63	20	16	0.90	0.91	0.11836	KX525288

\* = marcadores en desequilibrio de HW después de la corrección de Bonferroni.

## 3.2 Evaluación de variabilidad genética

### 3.2.1 Experimentación y obtención de datos

Las condiciones resultantes de la optimización de la PCR de región control mitocondrial consistieron en reacciones de 12.5 µl. La concentración final de los reactivos por cada reacción fue la siguiente: 0.2 mM de dNTPs, buffer Kappa (1.5 mM), 0.5 µM de cada iniciador, 0.07 U Taq DNA pol (Kappa) y 35 ng de ADN plantilla.

A partir del gradiente de temperatura se definió una temperatura de anillamiento de 53 °C para la amplificación de este gen, con lo que el perfil de termociclado se estructuró de la siguiente manera: 1 min de desnaturalización inicial a 94 °C seguido de 30 ciclos de 30 s de desnaturalización a 94 °C, 30 s de anillamiento a 53 °C y 30 s de elongación a 72 °C, terminando con 15 min de elongación a 72 °C al final del último ciclo.

Para la amplificación en multiplex de los 8 microsatélites (Tabla 6) elegidos para el estudio poblacional, se siguieron las condiciones químicas y de termociclado establecidas en el apartado de desarrollo de

microsatélites. En algunos casos los marcadores de mayor tamaño dentro del multiplex no amplificaron, por lo que se enviaron por separado.

**Tabla 6** Microsatélites seleccionados, fluoróforo utilizado y tamaño esperado

Marcadores	Fluoróforo	Tamaño esperado
Ifus2-01 <sup>a</sup>	FAM	131-154
Ifus4-06 <sup>a</sup>	FAM	186-278
Ifus4-03	VIC	263-385
Ifus2-14	VIC	358-380
Ifus3-06 <sup>b</sup>	NED	161-233
Ifus4-01 <sup>b</sup>	NED	353-389
Ifus2-06	NED	370-390
Ifus2-11	PET	284-300

a y b, marcadores que se amplificaron en la misma reacción por utilizar el mismo fluoróforo y tener tamaños esperados que no se traslapan.

### 3.2.2 Diversidad genética

En total se obtuvieron 222 secuencias de la región control mitocondrial. Dada la baja calidad y el tamaño insuficiente para la alineación se descartaron un total de 71 secuencias. Finalmente se utilizaron 195 secuencias para la evaluación de genética poblacional incluyendo las secuencias de Lohr (2003), con una longitud en la alineación final de 428 sitios (incluyendo indels).

En un primer análisis en DNAsp v. 5 (Librado y Rozas, 2009) se definieron los haplotipos tomando en cuenta las deleciones en las secuencias, resultando en un total de 184 haplotipos en 195 secuencias con un valor de diversidad haplotípica de 0.9993. Para filtrar la hipervariabilidad se hizo un segundo análisis sin tomar en cuenta las deleciones para la definición de los haplotipos, resultando en un total de 44 haplotipos y una diversidad haplotípica de 0.7. Con los haplotipos de este segundo análisis se continuó la evaluación de estructura y conectividad genética.

En los resultados de diversidad genética en microsatélites se observa un número de alelos elevado en la mayoría de los marcadores y poblaciones, siendo el mínimo de dos alelos para Ifus2-11 en SFN y el máximo de 24 alelos para Ifus4-03 en EBP. Los valores de heterocigosis son en su mayoría medios y altos. Para  $H_0$  las estimaciones se encontraron entre 0.16 y 1, mientras que para  $H_E$  van de 0.32 a 0.97 (Tabla 2 del anexo). En la tabla 7 se observa en color azul los marcadores en desequilibrio de Hardy Weinberg para cada una de las subzonas, posterior a la corrección de Bonferroni. En esta tabla es evidente que no existe un marcador cuyo desequilibrio de HW sea consistente para todas las subzonas; sin embargo, las subzonas EBA y EBP albergan 4 loci en desequilibrio mientras que los loci con más subzonas en desequilibrio fueron

Ifus3-06, Ifus4-01 e Ifus4-06 con 6, 7 y 8. En la misma tabla podemos observar las celdas con déficit de heterocigotos (Fis) causante del desequilibrio de HW.

**Tabla 7** Marcadores en desequilibrio HW (en azul) y déficit de heterocigotos (\*) por subzona. TPS, total por subzona; TPL, total por locus.

Loci	Subzonas															TPL	
	BLA1	BLA2	BLA3	BLA4	BLA5	BLA6	AGN	AGS	EBA	EBP	SFN	SFC	SFS	SON	LPZ		JAL
Ifus2-01			*										*				2
Ifus2-06	*			*					*	*							4
Ifus2-11																	0
Ifus2-14											*	*					2
Ifus3-06					*				*	*		*		*	*		6
Ifus4-01	*	*	*						*	*	*		*				7
Ifus4-03	*											*			*		3
Ifus4-06		*			*	*		*	*	*			*	*			8
TPS	3	2	2	1	2	1	0	1	4	4	2	3	3	2	2	0	

\* = Fis > 0.1

**Tabla 8** Marcadores con presencia de alelos nulos (en rosa) para cada subzona. En gris celdas sin datos para el análisis.

Loci	Subzonas															
	BLA1	BLA2	BLA3	BLA4	BLA5	BLA6	AGN	AGS	EBA	EBP	SFN	SFC	SFS	SON	LPZ	JAL
Ifus2-01																
Ifus2-06																
Ifus2-11																
Ifus2-14																
Ifus3-06																
Ifus4-01																
Ifus4-03																
Ifus4-06																

Los resultados del análisis de alelos nulos (Tabla 8) indican que en la mayoría de los casos el déficit de heterocigotos está dado por la presencia de alelos nulos ocasionados por fallas en la amplificación de los marcadores. La única excepción fue en la subzona SFS con el marcador Ifus-2-01.

Las pruebas de desequilibrio de ligamiento mostraron que de las 28 combinaciones posibles entre los 8 marcadores, 24 presentaron desequilibrio de ligamiento en por lo menos una de las subzonas. Los pares Ifus4-01/Ifus4-03 y Ifus4-01/Ifus4-06 fueron los que resultaron en desequilibrio en mayor número de subzonas (5 y 6 respectivamente). Analizando los resultados por número de combinaciones en

desequilibrio por cada subzona se observó que la mayor parte de las subzonas se encuentran en DL en 6 pares (21%) o menos, sin embargo SON cuenta con 21 de 28 pares (75%) en desequilibrio de ligamiento.

### 3.2.3 Estructura genética

El primer AMOVA para región control mitocondrial se realizó de manera anidada conformando 3 grupos distintos, el primero que englobó todas las subzonas de México, el segundo las secuencias de Ecuador y el tercero las de Galápagos. Alrededor del 60% de la variación se encuentra entre grupos, el otro 40%, dentro de los grupos. El valor de  $\phi_{st}$  fue de 0.59 con un valor de  $p < 0.0001$  (Tabla 9).

**Tabla 9** Resultados del AMOVA con secuencias de región control (3 grupos Mex, ECU y GAP)

Fuente de variación	Varianza	% de variación	$\phi_{st}$	Valor-p
Entre grupos	0.00893	61.14	0.59681	<0.0001
Dentro de grupos	0.00589	40.32		

Además se realizó otro AMOVA global sin considerar las secuencias de Ecuador e Islas Galápagos para obtener los valores de diferenciación a escala nacional (Tabla 10), donde se observa que el 100% de la variación proviene de dentro de los grupos, resultando en la ausencia de estructura genética. Los valores pareados de  $\phi_{st}$  también reflejan ausencia de diferenciación entre las subzonas de México (Tabla 11).

**Tabla 10** Resultados del AMOVA con secuencias de región control (solo subzonas de México)

Fuente de variación	Varianza	% de variación	$\phi_{st}$	Valor-p
Entre grupos	-0.00001	-0.21	-0.00212	0.51906
Dentro de grupos	0.00399	100.21		

**Tabla 11** Matriz de  $\phi_{st}$  pareada, AMOVA región control mitocondrial sin considerar Sudamérica (inferior, valores de  $\phi_{st}$ ; superior, valor-p. \*= valores significativos posterior a la corrección de Bonferroni)

	AGN	AGS	BLA1	BLA2	BLA3	BLA4	BLA5	BLA6	CONC	EBA	EBP	JAL	LPZ	SFC	SFN	SFS	SON
AGN		0.874	0.514	0.270	0.423	0.739	0.568	0.387	0.315	0.991	0.189	0.991	0.721	0.577	0.027	0.811	0.243
AGS	-0.011		0.288	0.991	0.387	0.991	0.450	0.775	0.189	0.405	0.135	0.991	0.991	0.991	0.991	0.477	0.991
BLA1	-0.008	0.027		0.207	0.973	0.748	0.450	0.640	0.559	0.144	0.883	0.892	0.685	0.640	0.153	0.991	0.541
BLA2	0.015	-0.043	0.040		0.162	0.505	0.261	0.937	0.036	0.486	<b>0.000*</b>	0.991	0.838	0.883	0.595	0.099	0.658
BLA3	0.004	0.006	-0.048	0.028		0.829	0.477	0.937	0.450	0.315	0.928	0.748	0.631	0.595	0.432	0.883	0.189
BLA4	-0.040	-0.027	-0.037	-0.001	-0.049		0.784	0.829	0.270	0.234	0.622	0.991	0.991	0.820	0.586	0.991	0.991
BLA5	-0.018	-0.009	0.000	0.018	0.008	-0.025		0.423	0.126	0.405	0.153	0.991	0.910	0.568	0.315	0.793	0.369
BLA6	0.002	-0.038	-0.018	-0.022	-0.040	-0.057	-0.006		0.180	0.387	0.595	0.991	0.982	0.937	0.757	0.676	0.505
CONC	0.041	0.139	-0.018	0.124	-0.013	0.049	0.088	0.042		0.135	0.865	0.342	0.189	0.099	0.027	0.369	0.054
EBA	-0.022	0.053	0.040	0.017	0.020	0.034	0.021	0.008	0.110		0.063	0.568	0.703	0.532	0.126	0.450	0.153
EBP	0.016	0.087	-0.055	<b>0.080</b>	-0.060	-0.012	0.035	-0.019	-0.061	0.079		0.532	0.568	0.225	0.117	0.820	0.054
JAL	-0.102	0.000	-0.059	-0.123	-0.072	-0.113	-0.086	-0.115	0.038	-0.043	-0.006		0.991	0.991	0.991	0.757	0.991
LPZ	-0.045	-0.016	-0.016	-0.018	-0.022	-0.035	-0.065	-0.053	0.034	-0.046	-0.013	-0.103		0.901	0.081	0.991	0.550
SFC	-0.009	-0.040	-0.021	-0.043	-0.017	-0.025	-0.016	-0.037	0.061	-0.016	0.019	-0.122	-0.042		0.991	0.387	0.991
SFN	0.025	-0.040	0.030	-0.001	-0.006	-0.066	0.028	-0.043	0.144	0.066	0.073	-0.122	0.013	0.000		0.541	0.486
SFS	-0.040	0.023	-0.064	0.032	-0.061	-0.079	-0.051	-0.039	0.008	0.004	-0.048	-0.066	-0.059	-0.015	-0.010		0.342
SON	0.008	-0.031	0.013	-0.003	0.033	-0.002	0.022	0.001	0.130	0.043	0.088	-0.116	0.001	-0.031	0.003	0.031	

El AMOVA con microsatélites (Tabla 12) indica que toda la variabilidad proviene de dentro de los grupos de las muestras mexicanas, con un valor de  $\phi_{ST}$  de -0.03 no significativo. Para el AMOVA locus por locus (Tabla 13) se excluyeron los loci Ifus2-06 e Ifus4-06 por la falta de datos en algunas subzonas. De este análisis se obtuvo que la variación dentro de los grupos de casi el 100% con valores bajos de  $\phi_{ST}$  no significativos para los primeros cinco loci, sin embargo el locus Ifus4-03 mostró una variación significativa entre grupos de 1.09 % con un valor de  $\phi_{ST}$  de 0.01. En la matriz de  $\phi_{ST}$  pareadas (Tabla 14) se observan algunos valores bajos pero estadísticamente significativos, principalmente en la subzona BLA1. Tomando en cuenta esto, se efectuó un AMOVA utilizando todas las poblaciones y únicamente el locus Ifus4-03 para conocer de qué subzona provenía esta señal de diferenciación. En la matriz de este último AMOVA (Tabla 3 anexo) se aprecia una señal significativa de estructura proveniente principalmente de las subzonas El Barril Archipiélago (EBA) y La Paz (LPZ).

Asimismo, se realizó un AMOVA sin considerar los loci Ifus3-06, Ifus4-01 e Ifus4-06 para conocer si estos marcadores en desequilibrio de HW para la mayoría de las subzonas tenía un efecto en el análisis de varianza molecular. Los resultados fueron los mismos que en el AMOVA con todos los loci, con el 100 % de varianza dentro de los grupos y un valor de  $\phi_{ST}$  negativo no significativo. En los valores de  $\phi_{ST}$  pareados se observaron los mismos valores bajos significativos asociados a la subzona BLA1.

Por último se realizó un AMOVA utilizando los genotipos ajustados por Microchecker para las subzonas y loci en donde se detectó la presencia de alelos nulos. Prevalió el patrón de ausencia de estructura y la baja señal de BLA1 en las  $\phi_{ST}$  pareadas.

**Tabla 12** AMOVA de microsatélites

Fuente de variación	Varianza	% de variación	$\phi_{ST}$	Valor-p
Entre grupos	-0.07	-3.09	-0.03	1.00
Dentro de grupos	2.23	103.09		

**Tabla 13** AMOVA de microsatélites (locus por locus)

Locus	Entre grupos		Dentro de grupos		Índices de fijación	
	Varianza	% variación	Varianza	% variación	$\phi_{ST}$	Valor-p
Ifus2-01	0.0024	0.70461	0.33827	99.29539	0.00705	0.271
Ifus2-11	0.00624	2.24007	0.27234	97.75993	0.0224	0.043
Ifus2-14	0.00484	1.20949	0.39565	98.79051	0.01209	0.150
Ifus3-06	0.00565	1.23668	0.45161	98.76332	0.01237	0.042
Ifus4-01	0.01122	2.67654	0.408	97.32346	0.02677	0.262
Ifus4-03	0.00528	1.0967	0.47611	98.9033	0.01097	0.0068*

**Tabla 14** Matriz de  $\phi_{st}$  pareada, AMOVA microsátélites (inferior, valores de  $\phi_{st}$ ; superior, valores-p. \*= valores significativos posterior a la corrección de Bonferroni)

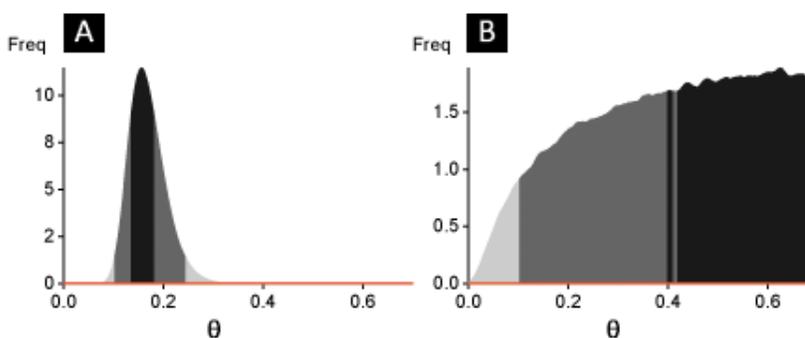
	BLA1	BLA2	BLA3	BLA4	BLA5	BLA6	AGN	AGS	EBA	EBP	SFN	SFC	SFS	SON	LPZ	JAL
<b>BLA1</b>		<b>0.000*</b>	<b>0.000*</b>	<b>0.000*</b>	0.991	0.991	0.991	0.991	<b>0.000*</b>	0.018	<b>0.000*</b>	0.883	0.477	0.964	0.991	0.099
<b>BLA2</b>	<b>0.041</b>		0.459	0.063	0.991	0.991	0.991	0.991	0.063	0.306	0.162	0.991	0.991	0.991	0.991	0.261
<b>BLA3</b>	<b>0.041</b>	0.004		0.586	0.991	0.991	0.991	0.991	0.351	0.739	0.631	0.991	0.982	0.982	0.991	0.550
<b>BLA4</b>	<b>0.035</b>	0.012	0.001		0.991	0.991	0.991	0.991	0.243	0.856	0.468	0.829	0.910	0.964	0.982	0.468
<b>BLA5</b>	-0.045	-0.050	-0.043	-0.047		0.730	0.991	0.964	0.955	0.991	0.991	0.964	0.991	0.973	0.991	0.964
<b>BLA6</b>	-0.049	-0.038	-0.045	-0.040	-0.005		0.991	0.018	0.045	0.991	0.991	0.658	0.928	0.802	0.964	0.982
<b>AGN</b>	-0.278	-0.235	-0.267	-0.242	-0.155	-0.077		0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991
<b>AGS</b>	-0.117	-0.104	-0.091	-0.096	-0.016	0.018	-0.115		0.991	0.991	0.991	0.829	0.982	0.937	0.937	0.973
<b>EBA</b>	<b>0.047</b>	0.019	0.007	0.008	-0.013	0.019	-0.167	-0.057		<b>0.000*</b>	0.018	0.162	0.279	0.541	0.973	0.414
<b>EBP</b>	0.020	0.005	-0.002	-0.006	-0.030	-0.026	-0.182	-0.050	<b>0.033</b>		0.721	0.883	0.613	0.694	0.991	0.649
<b>SFN</b>	<b>0.036</b>	0.013	0.001	0.002	-0.037	-0.043	-0.245	-0.061	0.027	-0.002		0.423	0.099	0.775	0.991	0.234
<b>SFC</b>	-0.007	-0.024	-0.023	-0.009	-0.015	-0.004	-0.161	-0.009	0.011	-0.006	0.004		0.333	0.613	0.883	0.910
<b>SFS</b>	0.002	-0.020	-0.015	-0.013	-0.031	-0.014	-0.189	-0.044	0.010	0.000	0.016	0.007		0.784	0.946	0.847
<b>SON</b>	-0.028	-0.059	-0.049	-0.033	-0.041	-0.011	-0.139	-0.035	0.004	-0.003	-0.011	-0.002	-0.005		0.838	0.838
<b>LPZ</b>	-0.078	-0.069	-0.084	-0.071	-0.046	-0.030	-0.246	-0.033	-0.031	-0.048	-0.041	-0.019	-0.021	-0.013		0.991
<b>JAL</b>	0.028	0.022	0.010	0.006	-0.035	-0.045	-0.294	-0.096	0.015	0.000	0.020	-0.015	-0.019	-0.030	-0.080	

### 3.2.4 Flujo genético y dispersión larvaria pasiva

Como se mencionó anteriormente, los resultados del análisis con el programa Migrate – n se expresan escalados por la tasa de mutación ( $\mu$ ), por lo que es necesario conocer dicha tasa para cada marcador para estimar los valores absolutos de los tamaños efectivos ( $N_e$ ). Sun y colaboradores (2010) en su trabajo sobre genómica mitocondrial comparativa del pepino de mar *Apostichopus japonicus* definen las tasas de mutación para diferentes regiones del mitogenoma, donde reportan una tasa de mutación del 7.3 %  $\text{Ma}^{-1}$  ( $7.3 \times 10^{-8} \text{ site}^{-1} \text{yr}^{-1}$ ) en las regiones no codificantes. Esta tasa de sustitución resulta conveniente para las estimaciones de  $N_e$  en *I. fuscus* dado que son organismos de la misma familia (Stichopodidae).

De manera general, las tasas de mutación en microsatélites en eucariotas se reportan entre  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  eventos por locus por generación (Hodel et al., 2016), sin embargo las tasas varían entre diferentes loci y especies. Dentro de la literatura no se encontraron estimaciones de  $\mu$  para microsatélites de equinodermos, por lo que se utilizó como referencia el trabajo de Chapuis y colaboradores (2015) donde se llevó a cabo la estimación de la tasa de mutación promedio de  $2.1 \times 10^{-4}$  por locus por generación en microsatélites dinucleótidos en una langosta de desierto (*Schistocerca gregaria*), al mismo tiempo presenta en su trabajo las tasas estimadas para otras especies de vertebrados e invertebrados (Tabla 4 del anexo). Con esto podemos observar que las tasas son variables incluso dentro de los invertebrados, por lo que se decidió tomar  $\mu = 10^{-4}$  para la estimación de  $N_e$  con microsatélites en el presente estudio, considerando dicha tasa como un valor conservador.

Dada la herencia matrilineal del mitogenoma, los resultados con RC mitocondrial representan los tamaños efectivos de la población de hembras. Se obtuvieron valores elevados con un máximo en el área de Canal de Ballenas (BC) de más de 9 millones de individuos, siendo el mínimo 700 mil en el área de remolinos peninsulares (PE) correspondiente a las muestras de San Felipe (Tabla 15). En cuanto al flujo genético podemos ver una diferenciación marcada en el número de migrantes por generación entre Sudamérica (SA) y las áreas de México. Otro patrón evidente es el bajo flujo de migrantes hacia PE (San Felipe) desde todas las áreas. Por último existe un flujo reducido desde Bahía de la Paz hacia Canal de Ballenas (Tabla 16). Hay que tomar en cuenta que las diferentes corridas en el programa arrojaron resultados variables, sin embargo el patrón de aislamiento de México respecto a Sudamérica se mantuvo en todos, no así el aparente aislamiento de San Felipe. En las tablas de  $N_e$  se señalan con \* los valores de  $\theta$  obtenidos de simulaciones no convergentes (ver Figura 4 B), por lo tanto no confiables, y consigo los valores de  $N_m$  asociados a dichas áreas.



**Figura 4** Distribuciones de  $\vartheta$  obtenidas en Migrate-n. A, distribución normal; B, distribución no convergente

**Tabla 15** Tamaños efectivos ( $N_e$  hembras) por área estimados con RC mitocondrial (IC = intervalos de confianza al 95%). \*= distribución mal representada

Área	$\Theta$ (IC 95%)	$N_{eh}$	$\mu$
BC	0.69* (0.25,0.7)	9400411	7.3E-08
PE	0.05 (0.01,0.11)	700000	
CC	0.62* (0.10,0.7)	8550274	
SP	0.13* (0.04,0.69)	1799589	
PB	0.59* (0.11,0.7)	8083562	
SA	0.16 (0.10,0.24)	2144795	

**Tabla 16** Número de migrantes por generación ( $N_m$ ) por área estimado con RC mitocondrial

	BC	PE	CC	SP	PB	SA
BC		0.03	1225	249	711	0.10
PE	323		443	43	332	0.10
CC	232	0.03		62	160	0.10
SP	498	0.03	583		57	0.10
PB	0.46	0.03	169	18		0.10
SA	0.46	0.03	0.42	0.09	0.40	

En el análisis con microsatélites los tamaños efectivos son similares en todas las áreas (Tabla 17). Los valores de migración también son uniformes, presentándose el menor flujo de San Felipe (PE) a la región continental central (CC) correspondiente a Sonora (Tabla 18).

Comparando los resultados de  $N_e$  para ambos marcadores es notorio que los tamaños efectivos estimados con RC mitocondrial son mayores que los estimados con microsatélites en las áreas en las que coinciden ambos análisis. Para lo anterior hay que considerar que varias de las estimaciones están basadas en valores  $\theta$  no confiables, sin embargo, tomando como referencia el área PE cuya estimación es confiable,  $N_e$  continua siendo muy superior al estimado para la misma área con microsatélites. Esta diferencia puede

ser el efecto de una disminución reciente del tamaño de la población o un error en las estimaciones ocasionado por una tasa mutacional incorrecta.

**Tabla 17** Tamaños efectivos ( $N_e$ ) por área estimados con microsatélites (IC = intervalos de confianza al 95%)

Área	$\Theta$ (IC 95%)	$N_e$	$\mu$
BC	0.69 (0.64,0.7)	1729	0.0001
PE	0.69 (0.62,0.7)	1728	
CC	0.69 (0.62,0.7)	1729	
PB	0.69 (0.61,0.7)	1729	

**Tabla 18** Número de migrantes por generación ( $N_m$ ) por área estimado con microsatélites

	BC	PE	CC	PB
BC	4.60	7.78	5.43	
PE	10.62		1.97	4.67
CC	5.64	3.97		6.19
PB		2.11	3.84	5.64

En cuanto a la dispersión larvaria pasiva simulada por el modelo, los resultados ordenados en forma de matriz muestran la conectividad entre áreas y entre estratos de profundidad. En ese sentido podemos observar los mismos patrones generales en ambas matrices independientemente del estrato de profundidad de liberación. Existe un porcentaje alto de retención en el plano horizontal, es decir, partículas que permanecieron en la misma área de liberación, o en sitios contiguos. La conectividad entre las áreas de liberación se observa con porcentajes bajos, de PE a BC aproximadamente 6 y 9 % para los estratos de liberación de 0 a 20 m y 20 a 60 m, en este mismo orden de BC a CC con 0.3 y 1.2 % y de CC a SP con 0 % en la profundidad de liberación somera y 3.2 % en la profunda. De SP a PB se tiene el porcentaje más alto de conectividad con cerca de 15 % en ambas profundidades. Por otra parte la conectividad vertical muestra que en la mayor parte de las áreas existe un flujo de partículas similar del estrato somero al profundo y viceversa, así como retención en el mismo estrato de liberación en una proporción similar, con porcentajes que van de 30 a 70 aproximadamente en la columna de %TP en ambas matrices. El sitio PE con una profundidad de origen de 0 a 20m (Tabla 19) es la excepción más marcada a lo establecido anteriormente, mostrando que el 100% de las partículas permanecen en el mismo estrato somero. Por último hay que agregar que el porcentaje de partículas que se pierde en profundidades mayores a 60 m a partir de la liberación en el estrato somero es cercano a cero. En contraste, en el estrato de liberación profundo una parte importante de las partículas liberadas finaliza en profundidades mayores a 60 m, siendo 41 % el valor más elevado correspondiente a Canal de Ballenas.

**Tabla 19** Matriz de conectividad. Estrato somero (profundidad de origen 0 a 20 m), los sitios de liberación se encuentran en blanco sobre negro. PF, profundidad final; %TA, porcentaje total por área; %TP, porcentaje total por profundidad final. Se omiten valores de conectividad = 0%.

<b>PF</b>	<b>UG</b>	<b>BZ</b>	<b>PE</b>	<b>SE</b>	<b>SO</b>	<b>DB</b>	<b>TI</b>	<b>AG</b>	<b>BC</b>	<b>SZ</b>	<b>CP</b>	<b>GB</b>	<b>CC</b>	<b>SC</b>	<b>FB</b>	<b>SP</b>	<b>PB</b>	<b>% TP</b>
20	11.2	3.7	9.7	33.4	11.6	9.0	0.9	2.3	5.3	0.5								100.0
60																		
>60																		
% TA	12.8	4.2	11.0	38.1	13.3	10.3	1.0	2.6	6.0	0.6								
<b>PF</b>	<b>UG</b>	<b>BZ</b>	<b>PE</b>	<b>SE</b>	<b>SO</b>	<b>DB</b>	<b>TI</b>	<b>AG</b>	<b>BC</b>	<b>SZ</b>	<b>CP</b>	<b>GB</b>	<b>CC</b>	<b>SC</b>	<b>FB</b>	<b>SP</b>	<b>PB</b>	<b>% TP</b>
20	0.7	0.8		8.0	16.8	0.5	4.7	4.3			0.2	0.4	0.1					38.0
60					5.8	0.2	7.9	8.0	7.9	11.5	0.9	0.2						44.2
>60									9.5	6.7	0.1	0.7	0.2					17.8
% TA	0.7	0.8		8.3	23.5	0.7	13.1	12.8	18.1	19.0	1.3	1.3	0.3					
<b>PF</b>	<b>UG</b>	<b>BZ</b>	<b>PE</b>	<b>SE</b>	<b>SO</b>	<b>DB</b>	<b>TI</b>	<b>AG</b>	<b>BC</b>	<b>SZ</b>	<b>CP</b>	<b>GB</b>	<b>CC</b>	<b>SC</b>	<b>FB</b>	<b>SP</b>	<b>PB</b>	<b>% TP</b>
20		0.3			6.9		8.0			5.3		17.8	8.0	0.8				68.8
60							4.1		0.2	12.5	1.2	1.2	2.1					31.2
>60																		
% TA		0.4			10.1		17.7		0.2	26.1	1.8	27.8	14.7	1.2				
<b>PF</b>	<b>UG</b>	<b>BZ</b>	<b>PE</b>	<b>SE</b>	<b>SO</b>	<b>DB</b>	<b>TI</b>	<b>AG</b>	<b>BC</b>	<b>SZ</b>	<b>CP</b>	<b>GB</b>	<b>CC</b>	<b>SC</b>	<b>FB</b>	<b>SP</b>	<b>PB</b>	<b>% TP</b>
20											0.3	5.8			32.2	12.9	11.1	77.9
60																16.3	1.4	22.1
>60																		
% TA											0.3	7.3			40.3	36.5	15.6	
<b>PF</b>	<b>UG</b>	<b>BZ</b>	<b>PE</b>	<b>SE</b>	<b>SO</b>	<b>DB</b>	<b>TI</b>	<b>AG</b>	<b>BC</b>	<b>SZ</b>	<b>CP</b>	<b>GB</b>	<b>CC</b>	<b>SC</b>	<b>FB</b>	<b>SP</b>	<b>PB</b>	<b>% TP</b>
20															12.3	0.5	13.7	50.1
60															0.7		23.3	45.4
>60																	2.4	4.5
% TA															24.5	0.9	74.5	

**Tabla 20** Matriz de conectividad. Estrato profundo (profundidad de origen 20 a 60 m), los sitios de liberación se encuentran en blanco sobre negro. PF, profundidad final; %TA, porcentaje total por área; %TP, porcentaje total por profundidad final. Se omiten valores de conectividad = 0%.

<b>PF</b>	<b>UG</b>	<b>BZ</b>	<b>PE</b>	<b>SE</b>	<b>SO</b>	<b>DB</b>	<b>TI</b>	<b>AG</b>	<b>BC</b>	<b>SZ</b>	<b>CP</b>	<b>GB</b>	<b>CC</b>	<b>SC</b>	<b>FB</b>	<b>SP</b>	<b>PB</b>	<b>% TP</b>	
20	4.1	2.2	7.7	9.7	3.9	0.5	0.5	1.2	1.1	0.1									35.4
60			25.4	0.8		8.9		0.5	3.7										45.1
>60			5.5			8.4			3.1										19.5
% TA	4.7	2.5	44.2	12.0	4.5	20.4	0.5	1.9	9.1	0.2									
<b>PF</b>	<b>UG</b>	<b>BZ</b>	<b>PE</b>	<b>SE</b>	<b>SO</b>	<b>DB</b>	<b>TI</b>	<b>AG</b>	<b>BC</b>	<b>SZ</b>	<b>CP</b>	<b>GB</b>	<b>CC</b>	<b>SC</b>	<b>FB</b>	<b>SP</b>	<b>PB</b>	<b>% TP</b>	
20		0.2		3.3	9.0	0.2		2.4	6.8	7.0									32.0
60				0.3	4.2	1.6	1.8	8.2		4.0	2.3	1.2	0.4			0.2			26.9
>60						0.5	7.5	3.3	14.7	7.3	2.2	0.6	0.7						41.0
% TA		0.2		3.9	14.6	2.5	10.3	15.6	24.0	20.3	5.0	2.0	1.2			0.2			
<b>PF</b>	<b>UG</b>	<b>BZ</b>	<b>PE</b>	<b>SE</b>	<b>SO</b>	<b>DB</b>	<b>TI</b>	<b>AG</b>	<b>BC</b>	<b>SZ</b>	<b>CP</b>	<b>GB</b>	<b>CC</b>	<b>SC</b>	<b>FB</b>	<b>SP</b>	<b>PB</b>	<b>% TP</b>	
20				0.3	3.5		3.7			2.9	2.0	8.9	11.2	1.9	0.2				40.3
60							0.7		0.2	3.4	5.1	27.4	9.5	0.4	0.3	2.8			58.0
>60													1.5						1.7
% TA				0.4	4.1		5.1		0.2	7.3	8.3	42.4	25.9	2.7	0.5	3.2			
<b>PF</b>	<b>UG</b>	<b>BZ</b>	<b>PE</b>	<b>SE</b>	<b>SO</b>	<b>DB</b>	<b>TI</b>	<b>AG</b>	<b>BC</b>	<b>SZ</b>	<b>CP</b>	<b>GB</b>	<b>CC</b>	<b>SC</b>	<b>FB</b>	<b>SP</b>	<b>PB</b>	<b>% TP</b>	
20											0.7	0.3			16.5	12.6			30.4
60															0.8	38.3	6.7		46.3
>60															0.9	13.9	8.2		23.2
% TA											0.7	0.3			18.5	65.4	15.1		
<b>PF</b>	<b>UG</b>	<b>BZ</b>	<b>PE</b>	<b>SE</b>	<b>SO</b>	<b>DB</b>	<b>TI</b>	<b>AG</b>	<b>BC</b>	<b>SZ</b>	<b>CP</b>	<b>GB</b>	<b>CC</b>	<b>SC</b>	<b>FB</b>	<b>SP</b>	<b>PB</b>	<b>% TP</b>	
20															4.9	0.8	28.8		62.0
60															0.5	0.8	18.0		34.6
>60																0.5	1.4		3.3
% TA															9.7	3.9	86.4		

## 4. Discusión

El descubrimiento de microsatélites a partir de bibliotecas de datos generados con NGS posibilita el trabajo con especies no modelo, de forma rápida y barata. Dado que las diferentes plataformas NGS producen diferentes resultados en términos de longitud y cantidad de secuencias (Hodel et al., 2016, Apéndice S1), la elección de la plataforma más adecuada para el estudio se vuelve menester. En cuestión del rendimiento de las plataformas, Hodel et al. (2016) menciona que de un análisis de 74 proyectos publicados en la revista *Applications in Plant Sciences*, donde se utilizó la plataforma 454 de Roche (454 Life Sciences, a Roche Company, Branford, Connecticut, USA), se obtuvieron en promedio 16 loci polimórficos de un promedio de 139,418 lecturas (reads). Dicha plataforma con un menor rendimiento que ILLUMINA (Illumina, San Diego, California) en términos de costo-beneficio, anunció su discontinuación para 2016 (Hodel et al., 2016). Así mismo para plataformas de ILLUMINA, en 34 estudios publicados en la misma revista, se obtuvo en promedio 15 loci polimórficos. En este contexto, el presente trabajo obtuvo un rendimiento notable considerando que se desarrollaron 19 loci polimórficos a partir de 4920 loci potenciales, relativamente pocos comparado con el promedio obtenido 15,539 en estudios que utilizaron ILLUMINA (Hodel et al., 2016).

Otro punto fundamental en el desarrollo de marcadores microsatelitales a partir de secuenciación masiva es el proceso de selección de los loci candidatos que serán sometidos a las pruebas de polimorfismo, para ello existen diferentes programas. El programa Msatcommander (Faircloth, 2008) si bien no es de los más amigables en cuanto a la forma de presentar los resultados, es un programa gratuito que no requiere de conocimientos de programación, por lo que es uno de los más utilizados (Hodel et al., 2016). Hasta donde conocemos el trabajo de Gardner et al. (2011) es el único que presenta recomendaciones para la selección de microsatélites a partir de los resultados de Msatcommander, sin embargo, sus recomendaciones se centran en el rendimiento de la secuenciación GS-FLX Titanium (Roche, 454).

Como se mencionó anteriormente, dependiendo de la plataforma de secuenciación los resultados de la secuenciación shotgun pueden ser variables en cuanto a la longitud de las secuencias y costo por megabase. En el presente estudio se trabajó en el desarrollo de microsatélites a partir de la secuenciación masiva con la plataforma ILLUMINA, donde se generaron lecturas de longitudes cortas que requirieron de un proceso de selección y ensamble para conformar contigs. De manera natural, en este proceso se pueden generar artefactos que deben evitarse al momento de seleccionar los microsatélites, cuestión que no es atendida en el trabajo de Gardner et al. (2011). Tomando en cuenta lo anterior y dada la cantidad

de microsatélites con iniciadores diseñados producto del análisis con Msatcommander (Faircloth, 2008), las recomendaciones de Gardner et al. (2011) resultaron insuficientes.

Con el objetivo de seleccionar los mejores marcadores, se utilizaron criterios de selección basados en la calidad de los contigs que albergaban los microsatélites. De esta manera se obtuvo un rendimiento aceptable en términos de costo y esfuerzo al lograr la caracterización de 19 loci microsatelitales polimórficos a partir de 30 pares de iniciadores (63 %), donde se identificó un número de alelos entre 5 a 22, y valores medios y altos de  $H_o$  y  $H_e$  (0.35 – 1 y 0.56 – 0.97).

Estos marcadores resultan útiles para la evaluación de variabilidad genética en el pepino de mar *I. fuscus*, una especie de alto valor comercial cuya explotación ha generado disminuciones importantes en poblaciones de México, Ecuador e Islas Galápagos detectadas desde hace más de dos décadas (Castro, 1995; Ibarra y Soberón, 2002; Toral-Granda, 2008). Actualmente *I. fuscus* se encuentra dentro de la lista roja de IUCN como especie en peligro (Hamel et al., 2013) y sujeta a protección especial por la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Dada la importancia económica y social de este recurso en el Pacífico mexicano, se vuelve necesario el conocimiento de su estado genético para la optimización de esfuerzos en conservación y manejo. En este sentido, en el presente trabajo se utilizaron 8 de los 19 microsatélites diseñados dada la limitación en el tiempo del proyecto. Si bien no está establecido un número específico de microsatélites para la obtención de buenos resultados en estudios poblacionales, se sugiere utilizar la mayor cantidad posible para tener una mejor representación del genoma. Aun cuando la evaluación de los diferentes parámetros con estos 8 loci arrojó resultados en su mayoría consistentes, sería útil la incorporación de más microsatélites al estudio a fin de esclarecer las pequeñas inconsistencias. Así mismo la homogenización del tamaño de muestra en todas las subzonas favorecería dicha causa.

Los ocho microsatélites más las secuencias de la región control mitocondrial se utilizaron como marcadores para la evaluación de diversidad, estructura y flujo genético. Las estimaciones de diversidad genética fueron consistentes para ambos marcadores. En el caso de las secuencias de la región control mitocondrial se obtuvo un número muy elevado de haplotipos resultando en una diversidad haplotípica de casi 1.0. Estos resultados coinciden con el trabajo de Lohr (2003), donde igualmente se encontró casi el mismo número de haplotipos que de individuos. Esta característica ha sido observada dentro de la región control mitocondrial mayormente en peces, tanto en especies pelágicas como las sardinas (Bowen y Grant, 1999), como en especies de arrecife (Terry et al., 2000; Bay et al., 2004; Klanten et al., 2007; Hobbs et al., 2013). También dentro de diferentes especies de holotúridos se han encontrado diversidades haplotípicas elevadas en los genes citocromo oxidasa 1 y citocromo b (Skillings et al., 2014; Yuan et al., 2013) y se asocia principalmente altas tasas de mutación, así como a un elevado flujo genético ocasionado por las corrientes y tamaños efectivos poblacionales grandes.

Por su parte los microsatélites arrojaron un número de alelos entre 4 y 24 en la mayoría de las subzonas con excepción de JAL en el marcador Ifus2-01 y SFN en el Ifus2-11 con valores de 3 y 2 respectivamente. Los resultados de heterocigosis fueron principalmente intermedios y altos, con valores promedio de 0.61 y 0.78 para  $H_o$  y  $H_e$  respectivamente. Varias poblaciones se encontraron en desequilibrio de HW, aunque no existe un marcador o población particular en total desequilibrio (Tabla 7). Asimismo, es evidente que el desequilibrio HW está ligado a un déficit de heterocigosis asociado a la presencia de alelos nulos, es decir que existe una posible subestimación de heterocigosis debido a fallas en la amplificación de microsatélites. Estos resultados son consistentes con lo encontrado en diferentes especies de holotúridos del Indo-Pacífico, donde se ha reportado riquezas alélicas elevadas y loci en desequilibrio de Hardy Weinberg debido a alelos nulos (Chang et al., 2009; Kang et al., 2011; Soliman et al., 2012; Yuan et al., 2013), siendo este un patrón usual en invertebrados. En el análisis de desequilibrio de ligamiento ninguna de las 28 combinaciones entre loci mostró un desequilibrio consistente en todas las subzonas, sin embargo, la subzona de Sonora mostró desequilibrio de ligamiento significativo en 21 combinaciones donde el locus Ifus2-01 fue el único que no se vio implicado.

El desequilibrio de ligamiento (DL) es un término mal forjado que suele generar confusiones en su significado (Elston, 1998). De manera general establece la asociación no azarosa de alelos en diferentes loci que se espera del ligamiento físico en un cromosoma y la ausencia de recombinación entre loci. Sin embargo, las manifestaciones de desequilibrio de ligamiento no son necesariamente el reflejo del ligamiento físico entre dos loci (Slatkin, 2008). Existen diversos causantes de DL entre loci no ligados físicamente, entre los que se encuentran la selección natural, deriva génica, subdivisión de poblaciones, reducción en el tamaño de la población. En el caso de la población de Sonora, la señal de DL entre diversos pares de loci puede estar asociada tanto a la deriva génica, por efectos de un muestreo pequeño de la población, como a una reciente disminución en el tamaño de la población, donde el efecto cuello de botella elimina algunos haplotipos, lo que genera DL (Slatkin, 2008). Tomando en cuenta lo anterior, y al no encontrar un patrón de desequilibrio consistente en las diferentes subzonas concluimos que la señal de DL detectada en Sonora está relacionada con la historia evolutiva de los individuos en ese sitio y que los loci utilizados en el estudio poblacional sí son independientes.

El análisis de estructuración genética permite conocer el grado de diferenciación entre diferentes grupos. Al llevar a cabo este análisis fueron evidentes dos patrones muy marcados. Primero, en el AMOVA con secuencias de región control en el que se incluyeron las secuencias del trabajo de Lohr (2003) correspondientes a las poblaciones de la costa de Ecuador, Islas Galápagos y Bahía Concepción, fue notoria la gran diferenciación genética entre las poblaciones de Sudamérica y México con un índice de fijación altamente significativo ( $\phi_{st} = 0.59$ ,  $p < 0.0001$ ). El segundo patrón fue una ausencia de estructura entre las

subzonas de México, misma que se manifestó tanto en las secuencias de la región control ( $\phi_{st} = -0.002$ ,  $p > 0.05$ ) como en los microsatélites ( $\phi_{st} = -0.03$ ,  $p > 0.05$ ). Estos resultados indican que dentro del Golfo de California se encuentra una sola población panmíctica de *I. fuscus* aislada genéticamente de las poblaciones de Sudamérica. Estas observaciones coinciden el trabajo de Lohr (2003) donde también fue evidente una diferenciación genética entre México y Sudamérica. (Bay et al., 2004) realizó un estudio de gran escala geográfica (Océano Índico- Océano Pacífico Central) utilizando la región control mitocondrial, en el que un pez de arrecifal (*Chlorurus sordidus*), al igual que *I. fuscus* (Lohr, 2003), se encontró diferenciado únicamente entre poblaciones muy distantes. A nivel regional, se ha reportado para varias especies de peces ausencia de diferenciación genética entre poblaciones dentro del Golfo de California (Bernardi et al., 2003).

Tanto la diversidad genética como la falta de estructura evidentes en este estudio están estrechamente relacionados con el flujo genético. El tamaño efectivo de una población definido de una manera sencilla, se refiere al número de individuos dentro de una población que influyen en las cuestiones genéticas evolutivas (Hellberg, 2009), de esta manera tamaños efectivos elevados y un alto flujo genético impiden la pérdida de diversidad por efecto de deriva génica.

En este sentido, las evaluaciones de tamaños efectivos y migrantes por generación evidencian dos patrones importantes. Por una parte la notoria diferencia entre las estimaciones de los parámetros mencionados en mtDNA y microsatélites podría ser el efecto de una disminución reciente de la población. Para esto hay que considerar que la herencia matrilineal del mtDNA nos permite conocer los tamaños efectivos de las hembras, por lo que en una población cuya proporción sexual ha sido estimada en 1:1 (Herrero-Perezrul et al., 1999) esperaríamos un tamaño efectivo de hembras ( $N_{e_f}$ ) inferior al estimado para ambos sexos con marcadores nucleares ( $N_e$ ). Lo anterior se cumple siempre que no hayan existido cambios demográficos que alcancen a reflejar diferencias en los dos tipos de marcadores dadas sus diferentes tasas de mutación. De esta manera, dado que la tasa de mutación en microsatélites es cuatro órdenes de magnitud mayor que la de mtDNA, y que las estimaciones de abundancia, así como el tamaño de las capturas han reflejado una disminución en el tamaño de la población desde hace más de 20 años (Vélez, 1991; Singh Cabanillas y Vélez Barajas, 1996; Glockner-Fagetti et al., 2016), es posible que los tamaños efectivos se hayan reducido recientemente. De la misma manera, los valores de flujo genético evidentemente menores en microsatélites podrían estar asociados a la reducción del tamaño poblacional o ser el resultado de una estimación errónea ocasionada por suponer una tasa de mutación incorrecta..

Independientemente del bajo flujo genético detectado en microsatélites respecto a mtDNA, las estimaciones son cercanas a las encontradas por Lohr (2003) utilizando la región control mitocondrial. En dicho trabajo, Lohr reporta un  $N_m = 18.81$  entre Ayangue en la costa de Ecuador y las Islas Galápagos.

Tomando en cuenta que entre Ecuador y Galápagos existe una distancia aproximada de 1,100 km, los valores de conectividad estimados entre 2 y 10 migrantes por generación entre áreas de México donde la distancia máxima entre si no rebasa los 750 km nos da una idea del grado de conectividad que aún se mantiene dentro del Golfo de California.

Esta conectividad está relacionada directamente con la circulación y la duración de la larva pelágica. Con el modelo numérico fue posible observar los patrones de conectividad a partir del flujo de partículas pasivas, donde además de una marcada retención, se detectó que el flujo horizontal se mantiene constante aunque con algunos porcentajes bajos entre las diferentes áreas. Este resultado es congruente con las estimaciones a nivel genético, donde el flujo se mantiene a través de todas las áreas, Siempre tomando en cuenta que el modelo numérico indica la conectividad promedio anual, tomando en cuenta los meses de mayor desove de *I. fuscus*, y que el flujo genético es la señal de conectividad de la historia evolutiva reciente.

Estos resultados de diversidad, estructura y flujo genético en una población cuya densidad estimada ha disminuido órdenes de magnitud a través de las últimas dos décadas (Glockner-Fagetti et al., 2016; Reyes-Bonilla et al., 2008) están explicados por varios factores. Primero la conectividad horizontal, que se relaciona directamente con la duración de la larva pelágica de *I. fuscus* y con los patrones de circulación dentro del Golfo de California. Esta conectividad es evidente en los resultados del modelo donde se aprecia un flujo gradual entre los diferentes sitios muestreados. Estos porcentajes bajos de conectividad durante los meses de reproducción de este pepino de mar sugieren que los valores de flujo genético ( $Nm$ ) estimados no forzosamente reflejan el flujo actual, sino una señal que es producto de un intercambio genético a lo largo de la historia evolutiva reciente de la especie en esta área geográfica. Segundo, posiblemente la alta diversidad genética y la ausencia de diferenciación a pesar de la reciente disminución en la densidad estén influenciados por la conectividad vertical. Se ha reportado que esta especie se encuentra principalmente entre 0 y 40 m (Reyes-Bonilla et al., 2008), sin embargo también hay reportes hasta los 60 m (Kerstitch, 1989). Dadas las limitaciones del buceo tanto autónomo como semiautónomo, la explotación comercial de los individuos así como los estudios de estimación de la densidad poblacional se ven limitados a profundidades inferiores a los 20-25 metros. En las matrices de conectividad se aprecia que independientemente del estrato de liberación, un porcentaje importante de partículas finaliza entre 20 y 60 m, lo que sugiere que una parte importante del reclutamiento se da a profundidades mayores a las accesibles por la pesquería.

Si bien la diversidad genética se ha mantenido alta y no hay señales de estructuración genética poblacional, el flujo genético estimado a partir de diferentes marcadores sugiere una disminución de los tamaños efectivos y del flujo genético. Lo anterior debe ser de gran consideración dada la disminución en la

densidad poblacional en varios órdenes de magnitud, que cobra especial importancia dados los antecedentes de densa dependencia en el éxito de la fertilización (Shepherd et al., 2004).

Finalmente, se debe tomar en cuenta que, como ha sucedido con diversas especies marinas sujetas a explotación, dado que difícilmente podemos competir con ellas por el territorio en el plano vertical, una sobreexplotación del recurso podría generar un colapso en la pesquería antes de detectar alteraciones en la variabilidad genética de *Isostichopus fuscus* en el Pacífico mexicano (Smith, 1996).

## 5. Conclusiones

El presente trabajo resulta de gran relevancia para el conocimiento del estado genético de *I. fuscus* en el Pacífico Mexicano, además de proveer herramientas moleculares de gran utilidad para futuros estudios a una mayor escala. Se presenta el primer listado de microsatélites polimórficos específicos para *I. fuscus*, que permiten el conocimiento de su historia evolutiva reciente, característica que los destaca de marcadores previamente utilizados, y que se vuelve sumamente importante dada la disminución de su tamaño poblacional debido a la sobreexplotación en diversos países a lo largo de su distribución.

La diversidad genética de una especie se toma como el potencial evolutivo de la misma, que permite una mayor capacidad de respuesta a cambios en el ambiente. Por lo tanto, el conocimiento generado respecto su variabilidad genética en el Pacífico mexicano es de suma importancia y debe ser considerado en los esfuerzos de conservación y manejo de la especie. Esto con la finalidad de, por una parte, no disminuir las poblaciones al punto en el que colapse la pesquería y, por la otra, no ocasionar erosión en la diversidad genética comprometiendo su potencial adaptativo, resaltando que esta especie de pepino de mar uno de los principales recursos pesqueros de la región, con un importante valor económico y social.

## 6. Recomendaciones

### Recomendaciones para estudios posteriores

Se recomienda aumentar el tamaño de la muestra en las localidades más distantes como Jalisco, y en su caso probar los diferentes marcadores con individuos de localidades más sureñas como Oaxaca, lo que permitiría una mejor estimación de los tamaños efectivos y las tasas de migración. De la misma manera, en cuanto al análisis con microsatélites, se recomienda probar una mayor cantidad de marcadores para aumentar la confiabilidad de los resultados.

## Literatura citada

- Andrews, S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Babraham Bioinformatics. Available at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk>.
- Avendaño Ceceña, L. 2007. Bases para el manejo de la pesquería del pepino de mar (*Isostichopus fuscus*) en Bahía de los Ángeles, Baja California, México. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma de Baja California. 120 pp.
- Bay, L. K., Choat, J. H., Van Herwerden, L., Robertson, D. R. 2004. High genetic diversities and complex genetic structure in an Indo-Pacific tropical reef fish (*Chlorurus sordidus*): Evidence of an unstable evolutionary past? *Marine Biology*, 144(4), 757–767. <http://doi.org/10.1007/s00227-003-1224-3>
- Beerli, P. 2006. Comparison of Bayesian and maximum-likelihood inference of population genetic parameters. *Bioinformatics*, 22(3), 341–5. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti803>
- Bernardi, G., Findley, L., Rocha-Olivares, A. 2003. Vicariance and dispersal across Baja California in disjunct marine fish populations. *Evolution*, 57(7), 1599–1609. <http://doi.org/10.1554/02-669>
- Bisbal Pardo, C. I. 2015. Secuenciación genómica masiva de *Panopea generosa* y *Panopea globosa* para el desarrollo de marcadores moleculares. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 55 pp.
- Bowen, B., Grant, W. 1999. Phylogeography of the Sardines (*Sardinops* spp.): Assessing Biogeographic Models and Population Histories in Temperate Upwelling Zones. *Evolution*, 51(5), 1601–1610. <http://doi.org/10.2307/2411212>
- Brusca, R. C., Brusca, G. J. 2003. *Invertebrates* (2nd ed.). Sunderland: Sinauer Associates.
- Brusca, R. C., Findley, L. T., Hastings, P. a, Hendrickx, M. E., Torre-Cosío, J., Van Der Heiden, A. M. 2005. Macrofaunal Diversity in the Gulf of California. En: J.-L. E. Cartron, G. Ceballos, R. S. Felger (Eds.), *Biodiversity, Ecosystems, and Conservation in Northern Mexico*. New York: Oxford University Press. pp. 179–203
- California Department of Fish and Game. 2008. Status of the fisheries report- an update through 2006. (K. Barsky, Ed.). Monterrey, CA: California Department of Fish and Game.
- Castro, L. R. S. 1995. Management options of the commercial dive fisheries for sea cucumbers in Baja California, Mexico. *SPC Beche-de-Mer Information Bulletin*, 7(June), 20.
- Castro, R., Mascarenhas, A. S., Durazo, R., Collins, C. A. 2000. Seasonal variation of the temperature and salinity at the entrance to the Gulf of California, Mexico. *Ciencias Marinas*, 26(August 2016), 561–583. <http://doi.org/10.7773/cm.v26i4.621>
- Chang, Y., Feng, Z., Yu, J., Ding, J. 2009. Genetic variability analysis in five populations of the sea cucumber *Stichopus (Apostichopus) japonicus* from China, Russia, South Korea and Japan as revealed by microsatellite markers. *Marine Ecology*, 30(4), 455–461. <http://doi.org/10.1111/j.1439-0485.2009.00292.x>
- Chapuis, M. P., Plantamp, C., Streiff, R., Blondin, L., Piou, C. 2015. Microsatellite evolutionary rate and pattern in *Schistocerca gregaria* inferred from direct observation of germline mutations. *Molecular Ecology*, 24(24), 6107–6119. <http://doi.org/10.1111/mec.13465>
- Conand, C. 1998. Holothurians (sea cucumbers, Class Holothuroidea). En: K. E. Carpenter, V. H. Niem (Eds.), *FAO species identification guide for fishery purposes. The living marine resources of the Western*

- Central Pacific. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Vol. 2, pp. 1157–1190
- De Miras, C., Marco, A., Carranza, C. 1996. Evaluación socioeconómica de la pesca experimental de pepino de mar en Galápagos: informe final. Quito, Ecuador.: Fundación Charles Darwin para las Islas Galápagos - ORSTOM.
- Deichmann, E. 1958. The Holothuroidea collected by the Velero III and IV during the years 1932 to 1954, part II Aspidochirotida. Allan Hancock Pacific Expeditions. Los Angeles: University of Southern California Press.
- Elston, R. C. 1998. Linkage and association. *Genetic Epidemiology*, 15(6), 565–76. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2272\(1998\)15:6<565::AID-GEPI2>3.0.CO;2-J](http://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2272(1998)15:6<565::AID-GEPI2>3.0.CO;2-J)
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S. 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47–50.
- Faircloth, B. C. 2008. MSATCOMMANDER: detection of microsatellite repeat arrays and automated, locus-specific primer design. *Molecular Ecology Resources*, 8(1), 92–94. <http://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01884.x>
- FAO. 2010. Marcadores moleculares: una herramienta para explorar la diversidad genética. En: B. Rischkowsky, D. Pilling (Eds.), *La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura*. Roma. pp. 393–416.
- Gardner, M. G., Fitch, A. J., Bertozzi, T., Lowe, A. J. 2011. Rise of the machines - recommendations for ecologists when using next generation sequencing for microsatellite development. *Molecular Ecology Resources*, 11(6), 1093–1101. <http://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03037.x>
- Glockner-Fagetti, A., Calderon-Aguilera, L. E., Herrero-Pérezrul, M. D. 2016. Density decrease in an exploited population of brown sea cucumber *Isostichopus fuscus* in a biosphere reserve from the Baja California peninsula, Mexico. *Ocean and Coastal Management*, 121, 49–59. <http://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2015.12.009>
- González, E. G. 2003. Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia*, 59, 377–388. <http://doi.org/10.3989/graellsia.2003.v59.i2-3.253>
- Hamel, J., Ycaza-Hidalgo, R., Mercier, a. 2003. Larval development and juvenile growth of the Galapagos sea cucumber *Isostichopus fuscus*. *SPC Beche-de-Mer Information*, 18(18), 3–8. <http://doi.org/10.1016/j.ptsp.2011.03.003>
- Hedrick, P. W. 2001. Conservation genetics: Where are we now? *Trends in Ecology and Evolution*, 16(11), 629–636. [http://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02282-0](http://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02282-0)
- Hellberg, M. E. 2009. Gene Flow and Isolation among Populations of Marine Animals. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40, 291–310. <http://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.110308.120223>
- Hellberg, M. E., Burton, R. S., Neigel, J. E., Palumbi, S. R. 2002. Genetic assessment of connectivity among marine populations. *Bulletin Of Marine Science*, 70(1), 273–290.
- Hendler, G. 1995. *Sea stars, sea urchins, and allies: echinoderms of Florida and the Caribbean*. Washington: Smithsonian Institution Press.
- Hernández-Ayón, J. M., Chapa-Balcorta, C., Delgadillo-Hinojosa, F., Camacho-Ibar, Víctor Froylan Huerta-Díaz, Miguel Angel Santamaría-del-Angel, E., Galindo-Bect, S., Segovia-Zavala, J. A. 2013. Dynamics

- of dissolved inorganic carbon in the Midriff Islands region of the Gulf of California: Influence of water masses. *Ciencias Marinas*, 39(2), 183–201. <http://doi.org/10.7773/cm.v39i2.2243>
- Herrero Perezrul, D. 2004. Analisis de la pesqueria de pepino de mar en la Peninsula de Baja California, Mexico. Tesis de Doctorado en Ciencias. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Instituto Politécnico Nacional. 143 pp.
- Herrero Pérezrul, M. D., Chávez, E. 2005. Optimum fishing strategies for *Isostichopus fuscus* (Echinodermata: Holothuroidea) in the Gulf of California, México. *Revista de Biología Tropical*, 53, 357–366.
- Herrero-Perezrul, M. D., Reyes Bonilla, H., García-Dominguez, F., Cintra-Buenrostro, C. E. 1999. Reproduction and growth of *Isostichopus fuscus* (Echinodermata: Holothuroidea) in the southern Gulf of California, Mexico. *Marine Biology*, 135, 521–532. <http://doi.org/10.1007/s002270050653>
- Herrero-Pérezrul, M. D., Reyes-Bonilla, H. 2008. Weight-Length relationship and relative condition of the holothurian *Isostichopus fuscus* at Espíritu Santo Island, Gulf of California, México. *Revista de Biología Tropical*, 56(December), 273–280.
- Herrero-Pérezrul, M. D., Reyes-Bonilla, H., García-Domínguez, F. 1998. Casual Hermaphroditism in Gonochoric *Isostichopus Fuscus* (Ludwig, 1875) (Echinodermata: Holothuroidea) of the Southern Gulf of California, Mexico. *Bulletin of Marine Science*, 63(3), 611–615.
- Hobbs, J. P. A., Herwerden, L. van, Jerry, D. R., Jones, G. P., Munday, P. L. 2013. High genetic diversity in geographically remote populations of endemic and widespread coral reef angelfishes (genus: *Centropyge*). *Diversity*, 5(1), 39–50. <http://doi.org/10.3390/d5010039>
- Hodel, R. G. J., Segovia-Salcedo, M. C., Landis, J. B., Crowl, A. A., Sun, M., Liu, X., Gitzendanner, M. A., Douglas, N. A., Germain-Aubrey, C. C., Chen, S., Soltis, D. E., Soltis, P. S. 2016. The Report of My Death was an Exaggeration: A Review for Researchers Using Microsatellites in the 21st Century. *Applications in Plant Sciences*, 4(6). <http://doi.org/10.3732/apps.1600025>
- Hurtado, L. A., Mateos, M., Santamaria, C. A. 2010. Phylogeography of Supralittoral Rocky Intertidal *Ligia* Isopods in the Pacific Region from Central California to Central Mexico. *PLoS ONE*, 5(7), e11633. <http://doi.org/10.1371/Journal.Pone.0011633>
- Ibarra, A. A., Soberón, G. R. 2002. Economic reasons, ecological actions and social consequences in the Mexican sea cucumber fishery. *SPC Beche-de-Mer Information Bulletin*, 17(October), 33–36.
- Kang, J. H., Kim, Y. K., Kim, M. J., Park, J. Y., An, C. M., Kim, B. S., Jun, J. C., Kim, S. K. 2011. Genetic differentiation among populations and color variants of sea cucumbers (*Stichopus japonicus*) from Korea and China. *International Journal of Biological Sciences*, 7(3), 323–332. <http://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2007.00781.x>
- Kerstitch, A. 1989. Sea of Cortez marine invertebrates: A guide for the Pacific coast, Mexico to Ecuador. Monterey, CA: Sea Challenger.
- Klanten, O. S., Choat, J. H., Van Herwerden, L. 2007. Extreme genetic diversity and temporal rather than spatial partitioning in a widely distributed coral reef fish. *Marine Biology*, 150(4), 659–670. <http://doi.org/10.1007/s00227-006-0372-7>
- Lavin, M. F., Marinone, S. G. 2003. An overview of the physical oceanography of the Gulf of California. En: Velasco Fuentes, O. U., Sheinbaum, J. Ochoa, J. (Eds.), *Nonlinear Processes in Geophysical Fluid Dynamics*. Springer Netherlands, Dodrecht. pp. 173-204.
- Librado, P., Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data.

- Bioinformatics, 25(11), 1451–1452. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
- Lohr, H. 2003. Genetic variation among geographically isolated populations of the commercially important sea cucumber, *Isostichopus fuscus*, in the eastern Pacific. Tesis de Maestría en Ciencias. San Francisco State University. 112 pp.
- Mercier, A., Ycaza, R. H., Hamel, J. F. 2007. Long-term study of gamete release in a broadcast-spawning holothurian: Predictable lunar and diel periodicities. *Marine Ecology Progress Series*, 329, 179–189. <http://doi.org/10.3354/meps329179>
- Mercier Hamel, J.-F., Toral-Granda, T.-G., Alvarado, J. J., Paola Ortiz, E., Benavides, M. 2013. *Isostichopus fuscus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2013.
- Montaño Cortés, C. 2015. Conectividad tridimensional durante verano en el Norte del Golfo de California. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 61 pp.
- Nix, R. K. 2013. The Gulf of California. A Physical, Geological & Biological Study. Dallas, Texas: University of Dallas, Texas.
- Pañola Madrigal, A. 2016. Caracterización del ciclo gonádico del pepino de mar (*Isostichopus fuscus*) en la costa oriental de Baja California. Tesis de Maestría en Ciencias. 70 pp.
- Park, S. 2001. MSTOOLS (Excel spreadsheet toolkit for data conversion). Dublin: Smurfit Institute of Genetics, Trinity College.
- Purcell, S. W., Samyn, Y., Conand, C. 2012. Commercially important sea cucumbers of the world. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes No. 6. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Reyes-Bonilla, H., Herrero-Pérezrul, M. D., González-Romero, S., González-Peralta, A., Ramírez-Hernández, Y. 2008. Abundance of the brown sea cucumber *Isostichopus fuscus* at the National Park Bahía de Loreto, México. *Revista de Biología Tropical*, 56, 265–271.
- Riddle, B. R., Hafner, D. J., Alexander, L. F., Jaeger, J. R. (2000). Cryptic vicariance in the historical assembly of a Baja California Peninsular Desert biota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (26).
- Riginos, C. 2005. Cryptic vicariance in Gulf of California fishes parallels vicariant patterns found in Baja California mammals and reptiles. *Evolution*, 59(12), 2678–2690.
- Riginos, C., Douglas, K. E., Jin, Y., Shanahan, D. F., Tremblay, E. a. 2011. Effects of geography and life history traits on genetic differentiation in benthic marine fishes. *Ecography*, 34(August 2010), 566–575. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0587.2010.06511.x>
- Riginos, C., Nachman, M. W. 2001. Population subdivision in marine environments: the contributions of biogeography, geographical distance and discontinuous habitat to genetic differentiation in a blennioid fish, *Axoclinus nigricaudus*. *Molecular Ecology*, 10(6), 1439–1453.
- Rocha, M., Gasca, J. 2007. Ecología molecular de la conservación. En: L. E. Eguiarte, V. Souza, X. Aguirre (Eds.), *Ecología Molecular*. México, D. F.: Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT. pp. 251–278
- Roden, G. I. 1958. Oceanographic and Meteorological Aspects of the Gulf of California. *Pacific Science*, 12(1), 21–45.
- Rousset, F. 2008. genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8(1), 103–106. <http://doi.org/10.1111/j.1471->

8286.2007.01931.x

- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18(2), 233–234. <http://doi.org/10.1038/72708>
- Shepherd, S. A., Martinez, P., Toral-Granda, M. V., Edgar, G. J. 2004. The Galapagos sea cucumber fishery: management improves as stocks decline. *Environmental Conservation*, 31(2), 102–110. <http://doi.org/10.1017/S0376892903001188>
- Sherwin, W. B., Moritz, C. 2000. Managing and monitoring genetic erosion. En: A. G. Young (Ed.), *Genetics, Demography, and Viability of Fragmented Populations*. Cambridge University Press. pp. 9–34
- Singh Cabanillas, J., Vélez Barajas, A. 1996. La pesquería del pepino de mar *Isostichopus fuscus* en la costa oriental de Baja California Sur y propuestas de regulación. *Ciencia Pesquera*. 1(12):13-18.
- Skillings, D. J., Bird, C. E., Toonen, R. J. 2014. Comparative population structure of two edible Indo-Pacific coral reef sea cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea). *Bulletin of Marine Science*, 90(1), 359–378. <http://doi.org/10.5343/bms.2013.1001>
- Slatkin, M. 1993. Isolation by Distance in Equilibrium and Non-Equilibrium Populations. *Evolution*, 47(1), 264–279. <http://doi.org/10.2307/2410134>
- Slatkin, M. 2008. Linkage disequilibrium — understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nature Reviews Genetics*, 9(6), 477–485. <http://doi.org/10.1038/nrg2361>
- Smith, P. J. 1996. La diversidad genética de los recursos pesqueros marinos: posibles repercusiones de la pesca. Roma: FAO, Documento Técnico de Pesca.
- Soliman, T., Kanno, M., Kijima, A., Yamazaki, Y. 2012. Population genetic structure and gene flow in the Japanese sea cucumber *Apostichopus japonicus* across Toyama Bay, Japan. *Fisheries Science*, 78, 775–783. <http://doi.org/10.1007/s12562-012-0509-1>
- Sun, X. J., Li, Q., Kong, L. F. 2010. Comparative mitochondrial genomics within sea cucumber (*Apostichopus japonicus*): Provide new insights into relationships among color variants. *Aquaculture*, 309(1–4), 280–285. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.08.001>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–9. <http://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Terry, A., Bucciarelli, G., Bernardi, G. 2000. Restricted gene flow and incipient speciation in disjunct Pacific Ocean and Sea of Cortez populations of a reef fish species, *Girella nigricans*. *Evolution*, 54(2), 652–659. [http://doi.org/10.1554/0014-3820\(2000\)054](http://doi.org/10.1554/0014-3820(2000)054)
- Toral-Granda, V. 2008. Galapagos Islands: a hotspot of sea cucumber fisheries in Latin America and the Caribbean. En: V. Toral-Granda, A. Lovatelli, M. Vasconcellos (Eds.), *Sea cucumbers. A global review of fisheries and trade*. Rome: FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper. pp. 231–253
- Toral-Granda, V. 2008. Population status, fisheries and trade of sea cucumbers in Latin America and the Caribbean. *A Global Review of Fisheries and Trade*, 213–229.
- van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M., Shipley, P. 2004. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4(3), 535–538. <http://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>
- Vélez, B. 1991. Evaluación del recurso pepino de mar en el área de El Conejo y Punta Benita, Baja California Sur. Reporte técnico (inédito). Centro Regional de Investigación Pesquera (CRIP), La Paz.

- Walsh, P. S., Metzger, D. A., Higuchi, R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*, 10(4), 506–13.
- Yuan, L., Hu, C., Zhang, L., Xia, J. 2013. Population genetics of a tropical sea cucumber species (*Stichopus monotuberculatus*) in China. *Conservation Genetics*, 14(6), 1279–1284. <http://doi.org/10.1007/s10592-013-0506-7>

## Anexos

**Anexo Tabla 1** Listado de individuos de *I. fuscus* utilizados en el proyecto

Zona	Subzona	ID	Localidad	Latitud (°N)	Longitud (°O)	Fecha
San Felipe	SFN	483	Gonzaga 8	29°48'18.07"	114°22'19.41"	22/04/2015
San Felipe	SFN	484	Gonzaga 8	29°48'18.07"	114°22'19.41"	22/04/2015
San Felipe	SFN	486	Gonzaga 8	29°48'18.07"	114°22'19.41"	22/04/2015
San Felipe	SFN	487	Gonzaga 8	29°48'18.07"	114°22'19.41"	22/04/2015
San Felipe	SFN	488	Gonzaga 8	29°48'18.07"	114°22'19.41"	22/04/2015
San Felipe	SFN	324	Gonzaga 6	29°48'19.51"	114°22'20.27"	11/02/2015
San Felipe	SFN	325	Gonzaga 6	29°48'19.51"	114°22'20.27"	11/02/2015
San Felipe	SFN	326	Gonzaga 6	29°48'19.51"	114°22'20.27"	11/02/2015
San Felipe	SFN	327	Gonzaga 6	29°48'19.51"	114°22'20.27"	11/02/2015
San Felipe	SFN	328	Gonzaga 6	29°48'19.51"	114°22'20.27"	11/02/2015
San Felipe	SFN	329	Gonzaga 6	29°48'19.51"	114°22'20.27"	11/02/2015
San Felipe	SFN	330	Gonzaga 6	29°48'19.51"	114°22'20.27"	11/02/2015
San Felipe	SFN	331	Gonzaga 6	29°48'19.51"	114°22'20.27"	11/02/2015
San Felipe	SFN	332	Gonzaga 7	29°48'19.47"	114°22'20.24"	11/02/2015
San Felipe	SFN	333	Gonzaga 7	29°48'19.47"	114°22'20.24"	11/02/2015
San Felipe	SFN	334	Gonzaga 7	29°48'19.47"	114°22'20.24"	11/02/2015
San Felipe	SFN	335	Gonzaga 7	29°48'19.47"	114°22'20.24"	11/02/2015
San Felipe	SFN	336	Gonzaga 7	29°48'19.47"	114°22'20.24"	11/02/2015
San Felipe	SFN	337	Gonzaga 7	29°48'19.47"	114°22'20.24"	11/02/2015
San Felipe	SFC	518	Gonzaga 11	29°46'2.6"	114°17'27.99"	25/04/2015
San Felipe	SFC	519	Gonzaga 11	29°46'2.6"	114°17'27.99"	25/04/2015
San Felipe	SFC	520	Gonzaga 11	29°46'2.6"	114°17'27.99"	25/04/2015
San Felipe	SFC	521	Gonzaga 11	29°46'2.6"	114°17'27.99"	25/04/2015
San Felipe	SFC	522	Gonzaga 11	29°46'2.6"	114°17'27.99"	25/04/2015
San Felipe	SFC	511	Gonzaga 4	29°48'29.51"	114°23'21.48"	24/04/2015
San Felipe	SFC	512	Gonzaga 4	29°48'29.51"	114°23'21.48"	24/04/2015
San Felipe	SFC	513	Gonzaga 4	29°48'29.51"	114°23'21.48"	24/04/2015
San Felipe	SFC	514	Gonzaga 4	29°48'29.51"	114°23'21.48"	24/04/2015
San Felipe	SFC	515	Gonzaga 4	29°48'29.51"	114°23'21.48"	24/04/2015
San Felipe	SFC	516	Gonzaga 4	29°48'29.51"	114°23'21.48"	24/04/2015
San Felipe	SFC	517	Gonzaga 4	29°48'29.51"	114°23'21.48"	24/04/2015
San Felipe	SFC	338	Gonzaga 10	29°46'9.44"	114°16'59.77"	12/02/2015
San Felipe	SFC	339	Gonzaga 10	29°46'9.44"	114°16'59.77"	12/02/2015
San Felipe	SFC	340	Gonzaga 10	29°46'9.44"	114°16'59.77"	12/02/2015
San Felipe	SFC	341	Gonzaga 11	29°46'3.75"	114°17'26.84"	12/02/2015
San Felipe	SFC	342	Gonzaga 11	29°46'3.75"	114°17'26.84"	12/02/2015
San Felipe	SFC	343	Gonzaga 11	29°46'3.75"	114°17'26.84"	12/02/2015
San Felipe	SFC	344	Gonzaga 11	29°46'3.75"	114°17'26.84"	12/02/2015
San Felipe	SFC	345	Gonzaga 11	29°46'3.75"	114°17'26.84"	12/02/2015

San Felipe	SFS	348	Calamajue 8	29°40'46.92"	114°8'7.47"	13/02/2015
San Felipe	SFS	349	Calamajue 8	29°40'46.92"	114°8'7.47"	13/02/2015
San Felipe	SFS	350	Calamajue 8	29°40'46.92"	114°8'7.47"	13/02/2015
San Felipe	SFS	351	Calamajue 8	29°40'46.92"	114°8'7.47"	13/02/2015
San Felipe	SFS	352	Calamajue 8	29°40'46.92"	114°8'7.47"	13/02/2015
San Felipe	SFS	353	Calamajue 8	29°40'46.92"	114°8'7.47"	13/02/2015
San Felipe	SFS	354	Calamajue 10	29°41'38.11"	114°9'9.39"	13/02/2015
San Felipe	SFS	355	Calamajue 10	29°41'38.11"	114°9'9.39"	13/02/2015
San Felipe	SFS	356	Calamajue 10	29°41'38.11"	114°9'9.39"	13/02/2015
San Felipe	SFS	357	Calamajue 10	29°41'38.11"	114°9'9.39"	13/02/2015
San Felipe	SFS	359	Calamajue 10	29°41'38.11"	114°9'9.39"	13/02/2015
San Felipe	SFS	360	Calamajue 10	29°41'38.11"	114°9'9.39"	13/02/2015
San Felipe	SFS	361	Calamajue 10	29°41'38.11"	114°9'9.39"	13/02/2015
San Felipe	SFS	362	Calamajue 10	29°41'38.11"	114°9'9.39"	13/02/2015
San Felipe	SFS	363	Calamajue 10	29°41'38.11"	114°9'9.39"	13/02/2015
San Felipe	SFS	364	Calamajue 10	29°41'38.11"	114°9'9.39"	13/02/2015
San Felipe	SFS	365	Calamajue 10	29°41'38.11"	114°9'9.39"	13/02/2015
San Felipe	SFS	366	Calamajue 10	29°41'38.11"	114°9'9.39"	13/02/2015
San Felipe	SFS	367	Calamajue 10	29°41'38.11"	114°9'9.39"	13/02/2015
B. de los Ángeles	BLA1	395	Nido-Nbla	29°9'7.56"	113°36'23.21"	10/03/2015
B. de los Ángeles	BLA1	396	Nido-Nbla	29°9'7.56"	113°36'23.21"	10/03/2015
B. de los Ángeles	BLA1	397	Nido-Nbla	29°9'7.56"	113°36'23.21"	10/03/2015
B. de los Ángeles	BLA1	398	Nido-Nbla	29°9'7.56"	113°36'23.21"	10/03/2015
B. de los Ángeles	BLA1	399	Nido-Nbla	29°9'7.56"	113°36'23.21"	10/03/2015
B. de los Ángeles	BLA1	400	Nido-Nbla	29°9'7.56"	113°36'23.21"	10/03/2015
B. de los Ángeles	BLA1	401	Cardón Norte	29°6'24.55"	113°33'59.07"	10/03/2015
B. de los Ángeles	BLA1	402	Cardón Norte	29°6'24.55"	113°33'59.07"	10/03/2015
B. de los Ángeles	BLA1	403	Cardón Norte	29°6'24.55"	113°33'59.07"	10/03/2015
B. de los Ángeles	BLA1	404	Cardón Norte	29°6'24.55"	113°33'59.07"	10/03/2015
B. de los Ángeles	BLA1	405	Cardón Norte	29°6'24.55"	113°33'59.07"	10/03/2015
B. de los Ángeles	BLA1	406	Cardón Norte	29°6'24.55"	113°33'59.07"	10/03/2015
B. de los Ángeles	BLA1	407	Cardón Norte	29°6'24.55"	113°33'59.07"	10/03/2015
B. de los Ángeles	BLA1	88	Cardón Sur	29°6'8.78"	113°33'57.52"	12/11/2014
B. de los Ángeles	BLA1	89	Cardón Sur	29°6'8.78"	113°33'57.52"	12/11/2014
B. de los Ángeles	BLA1	90	Cardón Sur	29°6'8.78"	113°33'57.52"	12/11/2014
B. de los Ángeles	BLA1	92	Cardón Sur	29°6'8.78"	113°33'57.52"	12/11/2014
B. de los Ángeles	BLA1	93	Cardón Sur	29°6'8.78"	113°33'57.52"	12/11/2014
B. de los Ángeles	BLA1	94	Cardón Sur	29°6'8.78"	113°33'57.52"	12/11/2014
B. de los Ángeles	BLA1	95	Cardón Sur	29°6'8.78"	113°33'57.52"	12/11/2014
B. de los Ángeles	BLA1	96	Cardón Sur	29°6'8.78"	113°33'57.52"	12/11/2014
B. de los Ángeles	BLA2	583	Coronadito Sur	29°4'39.72"	113°31'16.49"	13/05/2015
B. de los Ángeles	BLA2	584	Coronadito Sur	29°4'39.72"	113°31'16.49"	13/05/2015
B. de los Ángeles	BLA2	585	Coronadito Sur	29°4'39.72"	113°31'16.49"	13/05/2015

B. de los Ángeles	BLA2	586	Coronadito Sur	29°4'39.72"	113°31'16.49"	13/05/2015
B. de los Ángeles	BLA2	587	Coronadito Sur	29°4'39.72"	113°31'16.49"	13/05/2015
B. de los Ángeles	BLA2	588	Coronadito Sur	29°4'39.72"	113°31'16.49"	13/05/2015
B. de los Ángeles	BLA2	313	Coronadito Sur	29°4'37.37"	113°31'13.87"	24/01/2015
B. de los Ángeles	BLA2	314	Coronadito Sur	29°4'37.37"	113°31'13.87"	24/01/2015
B. de los Ángeles	BLA2	315	Coronadito Sur	29°4'37.37"	113°31'13.87"	24/01/2015
B. de los Ángeles	BLA2	316	Coronadito Sur	29°4'37.37"	113°31'13.87"	24/01/2015
B. de los Ángeles	BLA2	38	Coronadito Norte	29°5'46.17"	113°31'47.92"	20/10/2014
B. de los Ángeles	BLA2	39	Coronadito Norte	29°5'46.42"	113°31'47.63"	20/10/2014
B. de los Ángeles	BLA2	40	Coronadito Norte	29°5'46.17"	113°31'47.92"	20/10/2014
B. de los Ángeles	BLA2	41	Coronadito Norte	29°5'46.17"	113°31'47.92"	20/10/2014
B. de los Ángeles	BLA2	42	Coronadito Norte	29°5'46.17"	113°31'47.92"	20/10/2014
B. de los Ángeles	BLA2	43	Coronadito Norte	29°5'46.17"	113°31'47.92"	20/10/2014
B. de los Ángeles	BLA2	44	Coronadito Norte	29°5'46.17"	113°31'47.92"	20/10/2014
B. de los Ángeles	BLA2	18	Polilla Norte	29°5'23.38"	113°31'35.29"	17/10/2014
B. de los Ángeles	BLA2	19	Polilla Norte	29°5'23.13"	113°31'34.71"	17/10/2014
B. de los Ángeles	BLA2	20	Polilla Norte	29°5'23.38"	113°31'35.29"	17/10/2014
B. de los Ángeles	BLA3	557	Borrego	29°0'13.82"	113°31'19.02"	11/05/2015
B. de los Ángeles	BLA3	558	Borrego	29°0'13.82"	113°31'19.02"	11/05/2015
B. de los Ángeles	BLA3	559	Borrego	29°0'13.82"	113°31'19.02"	11/05/2015
B. de los Ángeles	BLA3	560	Borrego	29°0'13.82"	113°31'19.02"	11/05/2015
B. de los Ángeles	BLA3	561	Borrego	29°0'13.82"	113°31'19.02"	11/05/2015
B. de los Ángeles	BLA3	562	Borrego	29°0'13.82"	113°31'19.02"	11/05/2015
B. de los Ángeles	BLA3	563	Borrego	29°0'13.82"	113°31'19.02"	11/05/2015
B. de los Ángeles	BLA3	468	Borrego	29°0'14.07"	113°31'19.41"	14/03/2015
B. de los Ángeles	BLA3	469	Borrego	29°0'14.07"	113°31'19.41"	14/03/2015
B. de los Ángeles	BLA3	470	Borrego	29°0'14.07"	113°31'19.41"	14/03/2015
B. de los Ángeles	BLA3	471	Borrego	29°0'14.07"	113°31'19.41"	14/03/2015
B. de los Ángeles	BLA3	472	Borrego	29°0'14.07"	113°31'19.41"	14/03/2015
B. de los Ángeles	BLA3	305	Borrego	29°0'12.95"	113°31'18.94"	23/01/2015
B. de los Ángeles	BLA3	306	Borrego	29°0'12.95"	113°31'18.94"	23/01/2015
B. de los Ángeles	BLA3	307	Borrego	29°0'12.95"	113°31'18.94"	23/01/2015
B. de los Ángeles	BLA3	308	Borrego	29°0'12.95"	113°31'18.94"	23/01/2015
B. de los Ángeles	BLA3	309	Borrego	29°0'12.95"	113°31'18.94"	23/01/2015
B. de los Ángeles	BLA3	310	Borrego	29°0'12.95"	113°31'18.94"	23/01/2015
B. de los Ángeles	BLA4	238	Gemelos 2 Norte	28°57'25.66"	113°28'31.46"	21/01/2015
B. de los Ángeles	BLA4	239	Gemelos 2 Norte	28°57'25.66"	113°28'31.46"	21/01/2015
B. de los Ángeles	BLA4	240	Gemelos 2 Norte	28°57'25.66"	113°28'31.46"	21/01/2015
B. de los Ángeles	BLA4	241	Gemelos 2 Norte	28°57'25.66"	113°28'31.46"	21/01/2015
B. de los Ángeles	BLA4	242	Gemelos 2 Norte	28°57'25.66"	113°28'31.46"	21/01/2015
B. de los Ángeles	BLA4	243	Gemelos 2 Norte	28°57'25.66"	113°28'31.46"	21/01/2015
B. de los Ángeles	BLA4	244	Gemelos 2 Norte	28°57'25.66"	113°28'31.46"	21/01/2015
B. de los Ángeles	BLA4	245	Gemelos 2 Norte	28°57'25.66"	113°28'31.46"	21/01/2015

B. de los Ángeles	BLA4	246	Gemelos 2 Norte	28°57'25.66"	113°28'31.46"	21/01/2015
B. de los Ángeles	BLA4	247	Gemelos 2 Norte	28°57'25.66"	113°28'31.46"	21/01/2015
B. de los Ángeles	BLA4	248	Gemelos 2 Norte	28°57'25.66"	113°28'31.46"	21/01/2015
B. de los Ángeles	BLA4	249	Gemelos 2 Norte	28°57'25.66"	113°28'31.46"	21/01/2015
B. de los Ángeles	BLA4	250	Gemelos 2 Norte	28°57'25.66"	113°28'31.46"	21/01/2015
B. de los Ángeles	BLA4	251	Gemelos 2 Norte	28°57'25.66"	113°28'31.46"	21/01/2015
B. de los Ángeles	BLA4	252	Gemelos 2 Norte	28°57'25.66"	113°28'31.46"	21/01/2015
B. de los Ángeles	BLA4	253	Gemelos 2 Norte	28°57'25.66"	113°28'31.46"	21/01/2015
B. de los Ángeles	BLA4	254	Gemelos 2 Norte	28°57'25.66"	113°28'31.46"	21/01/2015
B. de los Ángeles	BLA4	255	Gemelos 2 Norte	28°57'25.66"	113°28'31.46"	21/01/2015
B. de los Ángeles	BLA4	256	Gemelos 2 Norte	28°57'25.66"	113°28'31.46"	21/01/2015
B. de los Ángeles	BLA4	257	Gemelos 2 Norte	28°57'25.66"	113°28'31.46"	21/01/2015
B. de los Ángeles	BLA4	258	Gemelos 2 Norte	28°57'25.66"	113°28'31.46"	21/01/2015
B. de los Ángeles	BLA4	259	Gemelos 2 Norte	28°57'25.66"	113°28'31.46"	21/01/2015
B. de los Ángeles	BLA5	576	Quemado Norte	28°56'43.62"	113°25'28.23"	12/05/2015
B. de los Ángeles	BLA5	577	Quemado Norte	28°56'43.62"	113°25'28.23"	12/05/2015
B. de los Ángeles	BLA5	578	Quemado Norte	28°56'43.62"	113°25'28.23"	12/05/2015
B. de los Ángeles	BLA5	579	Quemado Norte	28°56'43.62"	113°25'28.23"	12/05/2015
B. de los Ángeles	BLA5	580	Quemado Norte	28°56'43.62"	113°25'28.23"	12/05/2015
B. de los Ángeles	BLA5	581	Quemado Norte	28°56'43.62"	113°25'28.23"	12/05/2015
B. de los Ángeles	BLA5	168	Quemado Norte	28°56'43.58"	113°25'25.6"	20/01/2015
B. de los Ángeles	BLA5	169	Quemado Norte	28°56'43.58"	113°25'25.6"	20/01/2015
B. de los Ángeles	BLA5	170	Quemado Norte	28°56'43.58"	113°25'25.6"	20/01/2015
B. de los Ángeles	BLA5	171	Quemado Norte	28°56'43.58"	113°25'25.6"	20/01/2015
B. de los Ángeles	BLA5	173	Quemado Norte	28°56'43.58"	113°25'25.6"	20/01/2015
B. de los Ángeles	BLA5	174	Quemado Norte	28°56'43.58"	113°25'25.6"	20/01/2015
B. de los Ángeles	BLA5	175	Quemado Norte	28°56'43.58"	113°25'25.6"	20/01/2015
B. de los Ángeles	BLA5	176	Quemado Norte	28°56'43.58"	113°25'25.6"	20/01/2015
B. de los Ángeles	BLA5	177	Punta Herradura	28°56'46.13"	113°25'44.68"	20/01/2015
B. de los Ángeles	BLA5	178	Punta Herradura	28°56'46.13"	113°25'44.68"	20/01/2015
B. de los Ángeles	BLA5	179	Punta Herradura	28°56'46.13"	113°25'44.68"	20/01/2015
B. de los Ángeles	BLA5	52	Quemado Sur	28°56'1.01"	113°25'23.34"	11/11/2014
B. de los Ángeles	BLA5	53	Quemado Sur	28°56'1.01"	113°25'23.34"	11/11/2014
B. de los Ángeles	BLA5	54	Quemado Sur	28°56'1.01"	113°25'23.34"	11/11/2014
B. de los Ángeles	BLA5	55	Quemado Sur	28°56'1.01"	113°25'23.34"	11/11/2014
B. de los Ángeles	BLA5	56	Quemado Sur	28°56'1.01"	113°25'23.34"	11/11/2014
B. de los Ángeles	BLA5	57	Quemado Sur	28°56'1.01"	113°25'23.34"	11/11/2014
B. de los Ángeles	BLA5	58	Quemado Sur	28°56'1.01"	113°25'23.34"	11/11/2014
B. de los Ángeles	BLA6	443	Ánimas Norte 2	28°49'32.41"	113°21'28.04"	13/03/2015
B. de los Ángeles	BLA6	444	Ánimas Norte 2	28°49'32.41"	113°21'28.04"	13/03/2015
B. de los Ángeles	BLA6	445	Ánimas Norte 2	28°49'32.41"	113°21'28.04"	13/03/2015
B. de los Ángeles	BLA6	446	Ánimas Norte 2	28°49'32.41"	113°21'28.04"	13/03/2015
B. de los Ángeles	BLA6	447	Ánimas Norte 2	28°49'32.41"	113°21'28.04"	13/03/2015

B. de los Ángeles	BLA6	448	Ánimas Norte 2	28°49'32.41"	113°21'28.04"	13/03/2015
B. de los Ángeles	BLA6	449	Ánimas Norte 2	28°49'32.41"	113°21'28.04"	13/03/2015
B. de los Ángeles	BLA6	450	Soldado Norte	28°52'19.23"	113°21'36.36"	13/03/2015
B. de los Ángeles	BLA6	451	Soldado Norte	28°52'19.23"	113°21'36.36"	13/03/2015
B. de los Ángeles	BLA6	452	Soldado Norte	28°52'19.23"	113°21'36.36"	13/03/2015
B. de los Ángeles	BLA6	453	Soldado Norte	28°52'19.23"	113°21'36.36"	13/03/2015
B. de los Ángeles	BLA6	454	Soldado Norte	28°52'19.23"	113°21'36.36"	13/03/2015
B. de los Ángeles	BLA6	455	Soldado Norte	28°52'19.23"	113°21'36.36"	13/03/2015
B. de los Ángeles	BLA6	456	Soldado Norte	28°52'19.23"	113°21'36.36"	13/03/2015
B. de los Ángeles	BLA6	76	Soldado Sur	28°48'53.7"	113°20'57.9"	11/11/2014
B. de los Ángeles	BLA6	77	Soldado Sur	28°48'53.7"	113°20'57.9"	11/11/2014
B. de los Ángeles	BLA6	78	Soldado Sur	28°48'53.7"	113°20'57.9"	11/11/2014
B. de los Ángeles	BLA6	79	Soldado Sur	28°48'53.7"	113°20'57.9"	11/11/2014
B. de los Ángeles	BLA6	80	Soldado Sur	28°48'53.7"	113°20'57.9"	11/11/2014
B. de los Ángeles	BLA6	81	Soldado Sur	28°48'53.7"	113°20'57.9"	11/11/2014
B. de los Ángeles	BLA6	82	Soldado Sur	28°48'53.7"	113°20'57.9"	11/11/2014
B. de los Ángeles	BLA6	83	Soldado Sur	28°48'53.7"	113°20'57.9"	11/11/2014
B. de los Ángeles	AGN	408	Nido-Niag	29°27'41.14"	113°35'11.03"	11/03/2015
B. de los Ángeles	AGN	409	Nido-Niag	29°27'41.14"	113°35'11.03"	11/03/2015
B. de los Ángeles	AGN	410	Nido-Niag	29°27'41.14"	113°35'11.03"	11/03/2015
B. de los Ángeles	AGN	411	Nido-Niag	29°27'41.14"	113°35'11.03"	11/03/2015
B. de los Ángeles	AGN	412	Nido-Niag	29°27'41.14"	113°35'11.03"	11/03/2015
B. de los Ángeles	AGN	414	Nido-Niag	29°27'41.14"	113°35'11.03"	11/03/2015
B. de los Ángeles	AGN	415	Islote-Niag	29°30'47.05"	113°30'48.92"	11/03/2015
B. de los Ángeles	AGN	416	Islote-Niag	29°30'47.05"	113°30'48.92"	11/03/2015
B. de los Ángeles	AGN	417	Islote-Niag	29°30'47.05"	113°30'48.92"	11/03/2015
B. de los Ángeles	AGN	418	Islote-Niag	29°30'47.05"	113°30'48.92"	11/03/2015
B. de los Ángeles	AGN	419	Punta Refugio-Niag	29°33'13.78"	113°33'33.69"	11/03/2015
B. de los Ángeles	AGN	420	Punta Refugio-Niag	29°33'13.78"	113°33'33.69"	11/03/2015
B. de los Ángeles	AGN	421	Punta Refugio-Niag	29°33'13.78"	113°33'33.69"	11/03/2015
B. de los Ángeles	AGN	422	Punta Refugio-Niag	29°33'13.78"	113°33'33.69"	11/03/2015
B. de los Ángeles	AGN	423	Punta Refugio-Niag	29°33'13.78"	113°33'33.69"	11/03/2015
B. de los Ángeles	AGN	424	Punta Refugio-Niag	29°33'13.78"	113°33'33.69"	11/03/2015
B. de los Ángeles	AGS	101	Statón	29°9'24.12"	113°19'24.34"	15/11/2014
B. de los Ángeles	AGS	102	Cantiles Norte	29°7'6.31"	113°16'38.42"	15/11/2014
B. de los Ángeles	AGS	103	Cantiles Norte	29°7'6.31"	113°16'38.42"	15/11/2014
B. de los Ángeles	AGS	104	Cantiles Norte	29°7'6.31"	113°16'38.42"	15/11/2014
B. de los Ángeles	AGS	105	Cantiles Norte	29°7'6.31"	113°16'38.42"	15/11/2014
B. de los Ángeles	AGS	106	Statón	29°9'24.12"	113°19'24.34"	15/11/2014
B. de los Ángeles	AGS	107	Statón	29°9'24.12"	113°19'24.34"	15/11/2014
B. de los Ángeles	AGS	108	Cantiles Norte	29°7'6.31"	113°16'38.42"	15/11/2014
B. de los Ángeles	AGS	109	Cantiles Norte	29°7'6.31"	113°16'38.42"	15/11/2014
B. de los Ángeles	AGS	110	Cantiles Sur	29°7'5.88"	113°16'39.14"	15/11/2014

B. de los Ángeles	AGS	111	Cantiles Sur	29°7'5.88"	113°16'39.14"	15/11/2014
B. de los Ángeles	AGS	112	Cantiles Sur	29°7'5.88"	113°16'39.14"	15/11/2014
B. de los Ángeles	AGS	113	Cantiles Sur	29°7'5.88"	113°16'39.14"	15/11/2014
B. de los Ángeles	AGS	114	Cantiles Sur	29°7'5.88"	113°16'39.14"	15/11/2014
B. de los Ángeles	AGS	115	Cantiles Sur	29°7'5.88"	113°16'39.14"	15/11/2014
B. de los Ángeles	AGS	116	Cantiles Sur	29°7'5.88"	113°16'39.14"	15/11/2014
El Barril	EBA	624	San Lorenzo 4	28°37'24.31"	112°49'21.53"	12/06/2015
El Barril	EBA	625	San Lorenzo 5	28°36'43.84"	112°48'16.7"	12/06/2015
El Barril	EBA	626	San Lorenzo 5	28°36'43.84"	112°48'16.7"	12/06/2015
El Barril	EBA	627	San Lorenzo 5	28°36'43.84"	112°48'16.7"	12/06/2015
El Barril	EBA	628	San Lorenzo 5	28°36'43.84"	112°48'16.7"	12/06/2015
El Barril	EBA	629	San Lorenzo 6	28°35'39.84"	112°47'27.77"	12/06/2015
El Barril	EBA	630	San Lorenzo 6	28°35'39.84"	112°47'27.77"	12/06/2015
El Barril	EBA	631	San Lorenzo 6	28°35'39.84"	112°47'27.77"	12/06/2015
El Barril	EBA	632	San Lorenzo 6	28°35'39.84"	112°47'27.77"	12/06/2015
El Barril	EBA	145	San Lorenzo 1	28°40'25.86"	112°53'23.27"	11/12/2014
El Barril	EBA	146	San Lorenzo 1	28°40'25.86"	112°53'23.27"	11/12/2014
El Barril	EBA	147	San Lorenzo 2	28°38'42.82"	112°52'3.64"	11/12/2014
El Barril	EBA	148	San Lorenzo 2	28°38'42.82"	112°52'3.64"	11/12/2014
El Barril	EBA	149	San Lorenzo 2	28°38'42.82"	112°52'3.64"	11/12/2014
El Barril	EBA	150	San Lorenzo 2	28°38'42.82"	112°52'3.64"	11/12/2014
El Barril	EBA	151	San Lorenzo 2	28°38'42.82"	112°52'3.64"	11/12/2014
El Barril	EBA	152	San Lorenzo 2	28°38'42.82"	112°52'3.64"	11/12/2014
El Barril	EBA	153	San Lorenzo 2	28°38'42.82"	112°52'3.64"	11/12/2014
El Barril	EBA	154	San Lorenzo 3	28°38'38.03"	112°51'42.33"	11/12/2014
El Barril	EBA	155	San Lorenzo 3	28°38'38.03"	112°51'42.33"	11/12/2014
El Barril	EBP	610	San Francisquito 8	28°25'18.26"	112°50'37.82"	11/06/2015
El Barril	EBP	611	San Francisquito 3	28°26'24.86"	112°50'40.23"	11/06/2015
El Barril	EBP	612	San Francisquito 3	28°26'24.86"	112°50'40.23"	11/06/2015
El Barril	EBP	613	San Francisquito 3	28°26'24.86"	112°50'40.23"	11/06/2015
El Barril	EBP	614	San Francisquito 3	28°26'24.86"	112°50'40.23"	11/06/2015
El Barril	EBP	615	San Francisquito 3	28°26'24.86"	112°50'40.23"	11/06/2015
El Barril	EBP	616	San Francisquito 3	28°26'24.86"	112°50'40.23"	11/06/2015
El Barril	EBP	617	San Francisquito 5	28°26'19.57"	112°51'36.64"	11/06/2015
El Barril	EBP	618	San Francisquito 5	28°26'19.57"	112°51'36.64"	11/06/2015
El Barril	EBP	619	San Francisquito 5	28°26'19.57"	112°51'36.64"	11/06/2015
El Barril	EBP	620	San Francisquito 5	28°26'19.57"	112°51'36.64"	11/06/2015
El Barril	EBP	621	San Francisquito 5	28°26'19.57"	112°51'36.64"	11/06/2015
El Barril	EBP	622	San Francisquito 5	28°26'19.57"	112°51'36.64"	11/06/2015
El Barril	EBP	623	San Francisquito 5	28°26'19.57"	112°51'36.64"	11/06/2015
El Barril	EBP	156	San Francisquito 6	28°25'59.37"	112°51'53.56"	12/12/2014
El Barril	EBP	157	San Francisquito 6	28°25'59.37"	112°51'53.56"	12/12/2014
El Barril	EBP	158	San Francisquito 6	28°25'59.37"	112°51'53.56"	12/12/2014

El Barril	EBP	159	San Francisquito 6	28°25'59.37"	112°51'53.56"	12/12/2014
El Barril	EBP	160	San Francisquito 6	28°25'59.37"	112°51'53.56"	12/12/2014
El Barril	EBP	161	San Francisquito 6	28°25'59.37"	112°51'53.56"	12/12/2014
El Barril	EBP	163	San Francisquito 4	28°26'19.82"	112°51'36.32"	12/12/2014
El Barril	EBP	164	San Francisquito 5	28°26'18.77"	112°50'45.09"	12/12/2014
El Barril	EBP	165	San Francisquito 5	28°26'18.77"	112°50'45.09"	12/12/2014
El Barril	EBP	166	San Francisquito 5	28°26'18.77"	112°50'45.09"	12/12/2014
Sonora	SON	S1	El Colorado	28°28'0"	111°41'0"	06/01/2016
Sonora	SON	S2	El Colorado	28°28'0"	111°41'0"	06/01/2016
Sonora	SON	S3	El Colorado	28°28'0"	111°41'0"	06/01/2016
Sonora	SON	S4	El Colorado	28°28'0"	111°41'0"	06/01/2016
Sonora	SON	S5	El Colorado	28°28'0"	111°41'0"	06/01/2016
Sonora	SON	S6	El Colorado	28°28'0"	111°41'0"	06/01/2016
Sonora	SON	S7	El Colorado	28°28'0"	111°41'0"	06/01/2016
Sonora	SON	S8	El Colorado	28°28'0"	111°41'0"	06/01/2016
Sonora	SON	S9	El Colorado	28°28'0"	111°41'0"	06/01/2016
Sonora	SON	S10	El Colorado	28°28'0"	111°41'0"	06/01/2016
Sonora	SON	S11	El Colorado	28°28'0"	111°41'0"	06/01/2016
Sonora	SON	S12	El Colorado	28°28'0"	111°41'0"	06/01/2016
Sonora	SON	S13	El Colorado	28°28'0"	111°41'0"	06/01/2016
Sonora	SON	S14	El Colorado	28°28'0"	111°41'0"	06/01/2016
Sonora	SON	S15	El Colorado	28°28'0"	111°41'0"	06/01/2016
Sonora	SON	S16	El Colorado	28°28'0"	111°41'0"	06/01/2016
Sonora	SON	S17	El Colorado	28°28'0"	111°41'0"	06/01/2016
Sonora	SON	S18	El Colorado	28°28'0"	111°41'0"	06/01/2016
Sonora	SON	S19	El Colorado	28°28'0"	111°41'0"	06/01/2016
Sonora	SON	S20	El Colorado	28°28'0"	111°41'0"	06/01/2016
La Paz	LPZ	L1	El Saldito	24°44'48.58"	110°40'36.27"	05/12/2015
La Paz	LPZ	L2	El Saldito	24°44'48.58"	110°40'36.27"	05/12/2015
La Paz	LPZ	L3	El Saldito	24°44'48.58"	110°40'36.27"	05/12/2015
La Paz	LPZ	L4	El Saldito	24°44'48.58"	110°40'36.27"	05/12/2015
La Paz	LPZ	L5	El Saldito	24°44'48.58"	110°40'36.27"	05/12/2015
La Paz	LPZ	L6	El Saldito	24°44'48.58"	110°40'36.27"	05/12/2015
La Paz	LPZ	L7	El Saldito	24°44'48.58"	110°40'36.27"	05/12/2015
La Paz	LPZ	L8	El Saldito	24°44'48.58"	110°40'36.27"	05/12/2015
La Paz	LPZ	L9	El Saldito	24°44'48.58"	110°40'36.27"	05/12/2015
La Paz	LPZ	L10	El Saldito	24°44'48.58"	110°40'36.27"	05/12/2015
La Paz	LPZ	L11	El Saldito	24°44'48.58"	110°40'36.27"	05/12/2015
La Paz	LPZ	L12	El Saldito	24°44'48.58"	110°40'36.27"	05/12/2015
La Paz	LPZ	L13	El Saldito	24°44'48.58"	110°40'36.27"	05/12/2015
La Paz	LPZ	L14	El Saldito	24°44'48.58"	110°40'36.27"	05/12/2015
La Paz	LPZ	L15	El Saldito	24°44'48.58"	110°40'36.27"	05/12/2015
La Paz	LPZ	L16	El Saldito	24°44'48.58"	110°40'36.27"	05/12/2015

La Paz	LPZ	L17	El Saldito	24°44'48.58"	110°40'36.27"	05/12/2015
La Paz	LPZ	L18	El Saldito	24°44'48.58"	110°40'36.27"	05/12/2015
La Paz	LPZ	L19	El Saldito	24°44'48.58"	110°40'36.27"	05/12/2015
La Paz	LPZ	L20	El Saldito	24°44'48.58"	110°40'36.27"	05/12/2015
Jalisco	JAL	J03	Majahuitas	20°30'21.31"	105°23'25.41"	08/03/2016
Jalisco	JAL	J04	Majahuitas	20°30'21.31"	105°23'25.41"	08/03/2016
Jalisco	JAL	J07	Majahuitas	20°30'21.31"	105°23'25.41"	08/03/2016
Jalisco	JAL	J08	Majahuitas	20°30'21.31"	105°23'25.41"	08/03/2016
Jalisco	JAL	J16	Majahuitas	20°30'21.31"	105°23'25.41"	08/03/2016
Jalisco	JAL	J12	Majahuitas	20°30'21.31"	105°23'25.41"	08/03/2016

**Anexo Tabla 2** Heterocigosis y equilibrio de HW para 8 loci microsatelitales en todas las subzonas (\* locus en desequilibrio de HW)

Subzona	Locus	N	Na	Ho	He	P <sub>HW</sub>
BLA1	Ifus2-01	21	8	0.67	0.70	0.38883
	Ifus2-06	20	10	0.50	0.87	<b>0.00000*</b>
	Ifus2-11	21	4	0.38	0.48	0.49959
	Ifus2-14	21	10	0.86	0.81	0.79715
	Ifus3-06	21	15	0.81	0.89	0.49056
	Ifus4-01	20	8	0.50	0.73	<b>0.00173*</b>
	Ifus4-03	17	15	0.65	0.94	<b>0.00000*</b>
	Ifus4-06	21	17	0.76	0.94	0.02000
BLA2	Ifus2-01	20	6	0.65	0.77	0.02550
	Ifus2-06	20	7	0.55	0.68	0.05136
	Ifus2-11	20	6	0.50	0.57	0.60029
	Ifus2-14	17	7	0.71	0.81	0.16684
	Ifus3-06	20	17	0.90	0.94	0.20572
	Ifus4-01	16	8	0.38	0.85	<b>0.00078*</b>
	Ifus4-03	19	19	0.95	0.96	0.79858
	Ifus4-06	20	14	0.65	0.93	<b>0.00207*</b>
BLA3	Ifus2-01	18	5	0.33	0.60	<b>0.00223*</b>
	Ifus2-06	16	4	0.50	0.63	0.29607
	Ifus2-11	18	5	0.50	0.61	0.59810
	Ifus2-14	15	10	0.73	0.89	0.25813
	Ifus3-06	18	15	0.89	0.92	0.90827
	Ifus4-01	16	9	0.50	0.90	<b>0.00025*</b>
	Ifus4-03	16	19	0.81	0.95	0.01691
	Ifus4-06	18	15	0.78	0.94	0.03932
BLA4	Ifus2-01	20	7	0.70	0.67	0.89975
	Ifus2-06	20	6	0.35	0.64	<b>0.00005*</b>
	Ifus2-11	20	6	0.40	0.57	0.05302

	Ifus2-14	20	10	0.80	0.84	0.88419
	Ifus3-06	19	10	0.68	0.82	0.08662
	Ifus4-01	20	9	0.60	0.85	0.04546
	Ifus4-03	20	22	1.00	0.97	1.00000
	Ifus4-06	20	16	0.90	0.91	0.16389
<b>BLA5</b>	Ifus2-01	17	8	0.71	0.73	0.38017
	Ifus2-06	10	4	0.40	0.66	0.07885
	Ifus2-11	23	8	0.65	0.63	0.96776
	Ifus2-14	19	6	0.63	0.70	0.04880
	Ifus3-06	24	16	0.71	0.94	<b>0.00419*</b>
	Ifus4-01	7	5	0.57	0.78	0.26675
	Ifus4-03	22	20	0.95	0.95	0.12155
	Ifus4-06	24	19	0.79	0.96	<b>0.00291*</b>
<b>BLA6</b>	Ifus2-01	21	7	0.52	0.60	0.21687
	Ifus2-06	8	5	0.75	0.73	0.30718
	Ifus2-11	22	6	0.55	0.47	0.52733
	Ifus2-14	17	9	0.65	0.83	0.03306
	Ifus3-06	22	19	0.77	0.90	0.03735
	Ifus4-01	10	7	0.50	0.80	0.03697
	Ifus4-03	20	20	0.90	0.95	0.53824
	Ifus4-06	14	14	0.57	0.94	<b>0.00039*</b>
<b>AGN</b>	Ifus2-01	16	5	0.56	0.57	0.64148
	Ifus2-06	Sin datos	0			
	Ifus2-11	15	5	0.53	0.60	0.68339
	Ifus2-14	15	9	0.67	0.81	0.16490
	Ifus3-06	15	15	0.73	0.92	0.01119
	Ifus4-01	3	4	0.33	0.87	0.06634
	Ifus4-03	15	17	0.87	0.95	0.09428
	Ifus4-06	Sin datos	0			
<b>AGS</b>	Ifus2-01	16	6	0.56	0.72	0.18803
	Ifus2-06	Sin datos	0			
	Ifus2-11	11	6	0.64	0.68	0.60061
	Ifus2-14	10	7	0.70	0.80	0.68913
	Ifus3-06	14	12	0.71	0.94	0.05949
	Ifus4-01	5	4	0.60	0.53	1.00000
	Ifus4-03	14	18	0.79	0.97	0.02696
	Ifus4-06	14	12	0.57	0.90	<b>0.00157*</b>
<b>EBA</b>	Ifus2-01	19	5	0.63	0.70	0.69052
	Ifus2-06	16	4	0.38	0.65	<b>0.00728*</b>
	Ifus2-11	16	4	0.50	0.59	0.06062
	Ifus2-14	17	8	0.59	0.76	0.04326
	Ifus3-06	18	11	0.67	0.90	<b>0.00227*</b>

	Ifus4-01	12	6	0.33	0.81	<b>0.00069*</b>
	Ifus4-03	18	16	0.83	0.93	0.20052
	Ifus4-06	17	12	0.35	0.93	<b>0.00000*</b>
<b>EBP</b>	Ifus2-01	24	5	0.42	0.58	0.23534
	Ifus2-06	21	7	0.33	0.71	<b>0.00060*</b>
	Ifus2-11	22	5	0.41	0.36	1.00000
	Ifus2-14	23	7	0.65	0.73	0.62776
	Ifus3-06	24	13	0.71	0.91	<b>0.00062*</b>
	Ifus4-01	14	7	0.43	0.84	<b>0.00171*</b>
	Ifus4-03	19	24	1.00	0.97	1.00000
	Ifus4-06	20	15	0.60	0.93	<b>0.00090*</b>
<b>SFN</b>	Ifus2-01	18	7	0.61	0.64	0.11245
	Ifus2-06	16	5	0.50	0.66	0.15533
	Ifus2-11	13	2	0.23	0.32	0.37505
	Ifus2-14	16	9	0.50	0.86	<b>0.00080*</b>
	Ifus3-06	19	13	0.79	0.90	0.08517
	Ifus4-01	16	9	0.38	0.80	<b>0.00000*</b>
	Ifus4-03	16	19	0.81	0.96	0.05826
	Ifus4-06	18	12	0.83	0.91	0.23152
<b>SFC</b>	Ifus2-01	17	7	0.65	0.69	0.05699
	Ifus2-06	10	5	0.70	0.68	0.05510
	Ifus2-11	14	4	0.43	0.52	0.40728
	Ifus2-14	15	9	0.53	0.80	<b>0.00198*</b>
	Ifus3-06	20	13	0.70	0.91	<b>0.00273*</b>
	Ifus4-01	12	8	0.58	0.88	0.12544
	Ifus4-03	18	16	0.61	0.92	<b>0.00230*</b>
	Ifus4-06	18	16	0.78	0.94	0.03304
<b>SFS</b>	Ifus2-01	18	7	0.61	0.77	<b>0.00528*</b>
	Ifus2-06	13	4	0.54	0.70	0.28779
	Ifus2-11	10	4	0.30	0.59	0.02476
	Ifus2-14	16	5	0.69	0.71	0.75947
	Ifus3-06	18	14	0.67	0.87	0.08666
	Ifus4-01	11	6	0.18	0.83	<b>0.00000*</b>
	Ifus4-03	16	17	0.81	0.96	0.08715
	Ifus4-06	17	14	0.65	0.93	<b>0.00141*</b>
<b>SON</b>	Ifus2-01	20	8	0.75	0.79	0.89110
	Ifus2-06	12	5	0.33	0.71	0.01234
	Ifus2-11	12	5	0.50	0.61	0.21954
	Ifus2-14	15	6	0.53	0.72	0.16351
	Ifus3-06	15	15	0.53	0.92	<b>0.00000*</b>
	Ifus4-01	9	7	0.56	0.80	0.08413
	Ifus4-03	15	20	1.00	0.97	1.00000

	<b>Ifus4-06</b>	14	17	0.50	0.96	<b>0.00000*</b>
<b>LPZ</b>	<b>Ifus2-01</b>	18	8	0.67	0.67	0.08830
	<b>Ifus2-06</b>	12	5	0.50	0.70	0.53873
	<b>Ifus2-11</b>	11	5	0.55	0.65	0.29830
	<b>Ifus2-14</b>	7	5	0.43	0.79	0.07364
	<b>Ifus3-06</b>	15	14	0.67	0.91	<b>0.00696*</b>
	<b>Ifus4-01</b>	8	4	0.50	0.79	0.54779
	<b>Ifus4-03</b>	17	16	0.59	0.93	<b>0.00005*</b>
	<b>Ifus4-06</b>	16	18	0.81	0.96	0.06176
<b>JAL</b>	<b>Ifus2-01</b>	6	3	0.17	0.53	0.03094
	<b>Ifus2-06</b>	6	4	0.83	0.74	1.00000
	<b>Ifus2-11</b>	6	4	0.50	0.65	0.27292
	<b>Ifus2-14</b>	5	7	0.80	0.87	0.61523
	<b>Ifus3-06</b>	6	6	0.67	0.82	0.46960
	<b>Ifus4-01</b>	6	5	0.33	0.80	0.01871
	<b>Ifus4-03</b>	6	8	0.67	0.94	0.07882
	<b>Ifus4-06</b>	6	8	0.67	0.85	0.16013

**Anexo Tabla 3** Matriz de Fst pareada, AMOVA microsátélites utilizando solo el marcador Ifus4-03, (inferior, valores de Fst; superior, valores-p. \*= valores significativos posterior a la corrección de Bonferroni)

	BLA1	BLA2	BLA3	BLA4	BLA5	BLA6	AGN	AGS	EBA	EBP	SFN	SFC	SFS	SON	LPZ	JAL
<b>BLA1</b>		0.018	0.207	0.360	0.045	0.099	0.234	0.649	<b>0.000*</b>	0.342	0.694	0.009	0.306	0.333	0.306	0.297
<b>BLA2</b>	0.022		0.757	0.640	0.369	0.198	0.081	0.946	0.099	0.973	0.126	0.441	0.387	0.928	0.027	0.559
<b>BLA3</b>	0.016	-0.005		0.505	0.180	0.063	0.378	0.613	0.027	0.973	0.631	0.207	0.099	0.775	0.072	0.324
<b>BLA4</b>	0.009	-0.004	0.000		0.459	0.180	0.126	0.973	0.270	0.604	0.396	0.018	0.198	0.973	<b>0.000*</b>	0.144
<b>BLA5</b>	0.021	0.002	0.009	-0.001		0.027	0.018	0.550	0.054	0.459	0.216	0.018	0.252	0.405	0.063	0.108
<b>BLA6</b>	0.017	0.004	0.018	0.006	0.016		0.261	0.793	<b>0.000*</b>	0.369	0.099	0.279	0.234	0.613	<b>0.000*</b>	0.306
<b>AGN</b>	0.015	0.014	0.006	0.008	0.027	0.009		0.486	<b>0.000*</b>	0.153	0.027	0.009	0.018	0.306	0.117	0.054
<b>AGS</b>	0.006	-0.009	0.004	-0.013	0.000	-0.003	0.006		0.441	0.847	0.622	0.117	0.901	0.910	0.090	0.333
<b>EBA</b>	<b>0.041</b>	0.015	0.025	0.005	0.014	<b>0.029</b>	<b>0.030</b>	0.003		0.090	0.027	0.072	0.432	0.207	<b>0.000*</b>	0.189
<b>EBP</b>	0.009	-0.014	-0.012	-0.003	-0.001	0.002	0.009	-0.009	0.014		0.532	0.477	0.595	0.937	0.117	0.414
<b>SFN</b>	0.003	0.011	0.001	0.001	0.008	0.015	0.026	0.000	0.023	0.001		0.045	0.396	0.856	0.270	0.577
<b>SFC</b>	0.049	0.004	0.020	0.027	0.021	0.012	0.036	0.020	0.027	0.004	0.026		0.414	0.378	0.018	0.874
<b>SFS</b>	0.013	0.003	0.020	0.008	0.007	0.010	0.023	-0.010	0.004	-0.003	0.009	0.008		0.279	0.225	0.649
<b>SON</b>	0.008	-0.011	-0.005	-0.011	0.001	-0.002	0.007	-0.012	0.012	-0.012	-0.008	0.006	0.006		0.036	0.523
<b>LPZ</b>	0.015	0.026	0.027	<b>0.031</b>	0.019	<b>0.033</b>	0.022	0.025	<b>0.043</b>	0.018	0.016	0.039	0.013	0.024		0.496
<b>JAL</b>	0.032	0.003	0.020	0.021	0.022	0.013	0.040	0.019	0.024	0.006	0.006	-0.007	0.002	0.003	0.020	